

**Anordnung und Struktur von
Chromosomenterritorien in
Mauszellen:
Zelltypspezifische Unterschiede
und Gemeinsamkeiten**

Dissertation

an der Fakultät für Biologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Robert Mayer
Februar 2006

Anordnung und Struktur von Chromosomenterritorien in Mauszellen: Zelltypspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Dissertation an der Fakultät für Biologie, Department II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von
Dipl. Biol. Robert Mayer
aus Ingolstadt

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Cremer
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Schliwa

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.2006

*Die Neigung der Menschen,
kleine Dinge für wichtig zu halten,
hat schon viel Großes hervorgebracht.*

(Georg Christoph Lichtenberg)

Bei meinem Doktorvater Thomas Cremer möchte ich mich zuallererst dafür bedanken, dass ich meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Seine vorurteilsfreie und erfrischende Art zu Denken gab mir Vertrauen in mich, bestärkte mich und zeigte mir zugleich meine zukünftige Richtung auf.

Meiner Bezugsperson ersten Ranges, Steffen Dietzel, danke ich dafür, dass er immer den Überblick über die Möglichkeiten der Auswertung behielt, vielfältige Software an menschliche Maßstäbe anpasste und nimmermüde mit offenen Ohren das Erklären und Beheben von Problemchen aller Art übernahm. Zusätzlich dazu musste er auch noch meinen Zynismus ertragen.

Herrn Prof. Schliwa danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Timm Schröder möchte ich für die Bereitstellung der EB5-H2B-GFP Stammzellen danken, sowie für die Einführung in Differenzierungsmethoden und die großzügig überlassenen Materialien. Manuela Mohr von Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU stellte mir mehrmals frisches Mausblut zur Verfügung, hierfür sage ich auch Danke.

An dieser Stelle nicht unerwähnt möchte ich das phänomenale Gedächtnis von Sandro Brero lassen, der mir auch im Labor beistand und dessen Datensatz diese Arbeit abzurunden half. Marion Cremer sage ich nochmals Dank für geduldiges Korrekturlesen und die gewisse „Inspiration“. Irina Solovei schätzte meine Ironie und ich ihre Hilfsbereitschaft jederzeit.

Damit gelange ich an einem für mich sehr wichtigen Punkt an. Die Menschen in dieser Arbeitsgruppe machten es möglich, wunderbare Stimmungen zu erzeugen. So gab es jeden Tag mehr als eine Gelegenheit, miteinander zu lachen. Diese positive Grundstimmung und ein guter Zusammenhalt kommen idealen menschlichen Arbeitsbedingungen sehr nahe und helfen so leichter über Schlaglöcher und Stolpersteine auf dem Forschungsweg hinweg.

Claudia Hepperger, Katrin Küpper, Kathrin Teller, Claudia Weierich, Heiner Albiez, Dani Köhler, Roman Zinner, Stefan Müller und Michaela Neusser stellten für mich die Kerncrew dar (seit Anbeginn der Zeit...), in ihrer Gesellschaft kann man die Wissenschaft auch ruhig mal für einen Abend vergessen. Alle anderen Mitarbeiter und Mitstreiter der AG Cremer sollten sich aber nicht vergessen fühlen, ihre Zahl ist nur so groß und unübersichtlich (ehe ich jemanden vergesse...) und von einer höheren Fluktuationsrate geprägt als die „Kerncrew“. Man kann Euch nicht alle nennen. Also seid begrüßt und bedankt, aber bitte nicht beleidigt!

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich noch einmal für die lange und andauernde Unterstützung im mentalen wie pekuniärem Sinne ausdrücklichen Dank sagen.

Diese Arbeit widme ich auch dem Andenken an meinen Onkel Ludwig Meixner. Auf eine wunderschöne Zukunft mit meinem Thomas.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Der Einfluss der Epigenetik	1
1.2. Die Architektur des Zellkerns	4
1.3. Ordnungsprinzipien der Chromosomenanordnungen im Interphasezellkern	8
1.4. Ziele dieser Arbeit	9
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Verwendete Zellen	15
2.2. Zellkultur	15
2.2.1. Die Zählkammer Fuchs-Rosenthal	16
2.2.2. Isolation und Fixierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut	17
2.2.3. Fixierung von adhären wachsenden Zellen	19
2.2.4. Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen	21
2.2.5. Präparation von Metaphase-Chromosomen	25
2.2.6. Menschliche Zellen	27
2.3. Transfektion von Stammzellen	28
2.3.1. Verwendeten Plasmide	28
2.3.2. Transfektionsansatz	29
2.3.3. Selektion	30
2.3.4. Nachweis der Integration	30
2.4. Immunofluoreszenz	32
2.4.1. ES-Zellen mit Oct-3 Antikörper	32
2.4.2. Makrophagen mit Cd11b	33
2.5. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)	33
2.5.1. Markierung der Sonden	34
2.5.2. Herstellung der Hybridisierungsmixe	36
2.5.3. Hybridisierung auf Metaphasepräparaten (2D FISH):	37
2.5.4. Hybridisierung auf Zellpräparaten (3D FISH):	38
2.5.5. Detektion der FISH-Signale:	39
2.6. Kombination von FISH mit Immunofluoreszenz	41
2.7. Vergleich von Markierungs- und Nachweismethoden	43

2.8. Mikroskopie	45
2.8.1. Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop	45
2.8.2. Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2	45
2.8.3. Inverses Fluoreszenzmikroskop	46
2.8.4. Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)	47
2.9. Bildverarbeitung	48
2.9.1. Datenorganisation	48
2.9.2. Datenaufarbeitung	48
2.9.3. Shift-Korrektur	48
2.10. Quantitative Auswerteverfahren	49
2.10.1. 3D-RRD: Radiale Verteilung von Chromosomenterritorien	49
2.10.2. 3D-RRD: Radiale Verteilung von Chromozentren	51
2.10.3. ADMT: Programm zur Winkel- und Abstandsberechnung	52
2.10.4. Objektzählprogramme: OC-1 und OC-2	55
2.11. Statistische Methoden	60
2.11.1. Getestete Datensätze	60
2.11.2. Kolmogorov-Smirnov-Test	62
2.11.3. Korrelationskoeffizient	63
2.11.4. ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE between groups)	64
3. ERGEBNISSE	65
3.1. Stammzelltransfektion	65
3.2. Übersicht über die 3D-FISH Experimente	68
3.3. Einfluss der Haptene und Antikörper auf die Bestimmung der radialen Verteilung	70
3.3.1. Unterschiedlicher Kurvenverlauf mit unterschiedlichen Haptenen?	70
3.3.2. Test zur Untersuchung des Einflusses von Haptenen und Antikörpern	72
3.4. Die relative radiale Verteilung der Chromosomen ist größen- und gendichteabhängig, sowie zelltypspezifisch	76
3.5. Lage und Anzahl der Chromozentren ist zelltypspezifisch	82
3.5.1. Die Lage der Chromozentren:	82
3.5.2. Die Anzahl der Chromozentren:	84
3.6. Volumen der Zellkerne	87
3.7. Abstände und Winkel zwischen Chromosomenterritorien zeigen keine Hinweise auf nicht-zufällige Verteilung	89
3.7.1. Vergleich der Messmethoden	89
3.7.2. Winkelmessungen zwischen homologen Chromosomen	90
3.7.3. Winkelmessungen zwischen den heterologen Chromosomen	93
3.7.4. Abstandsmessungen zwischen der Chromosomenterritorien	95

3.8. Messungen der Chromosomenstruktur mit Objektzählprogrammen	97
3.8.1. Vergleich der Ergebnisse der Programme OC-1 und OC-2	97
3.8.2. Ergebnisse von OC-2 bei den Mauszelltypen	98
3.8.3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Objektzahlen und Gendichte?	109
3.8.4. Vergleich der Struktur der Chromosomen HSA 18 und 19 in verschiedenen humanen Zelltypen.	111
4. DISKUSSION	119
4.1. Radiale Verteilungen	119
4.1.1. Radiale Verteilungen von Chromosomenterritorien	119
4.1.2. Koexistenz von gendichteabhängiger und größenabhängiger Verteilung:	121
4.1.3. Evolutionärer Aspekt der Verteilungsmuster	121
4.1.4. Zelltypspezifische Unterschiede	122
4.1.5. Mögliche Mechanismen der nicht-zufälligen Verteilung	123
4.1.6. Technischer Aspekt: Beeinflusst die Markierungs- oder Nachweismethode die Daten der radialen Verteilungskurve?	125
4.2. Die Anordnung der Chromosomenterritorien relativ zueinander scheint zufällig	126
4.3. Verteilung und Anzahl der Chromozentren	127
4.3.1. Räumliche Verteilung der Chromozentren	127
4.3.2. Die Anzahl der Chromozentren ist zelltypabhängig	129
4.4. Die Kernvolumen sind zelltypabhängig	131
4.5. Chromatintextur	133
4.5.1. Vom subjektiven Eindruck zur messbaren Größe	133
4.5.2. Unterschiede in den Maus-Zelltypen	134
4.5.3. Unterschiede in menschlichen Zelltypen	135
4.6. Stammzelltransfektion	137
5. ZUSAMMENFASSUNG	139
6. ANHANG	141
7. LITERATUR	142
8. CURRICULUM VITAE	151
9. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	153

1. Einleitung

1.1. Der Einfluss der Epigenetik

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms ist seit Jahren abgeschlossen. Damit ist aber noch nicht geklärt, welche übergeordneten Mechanismen zur Regulation der Gene beitragen. Nach anfänglicher, öffentlicher Euphorie ist auch Optimisten klar geworden, dass man nur sehr eingeschränkt im „Buch des Lebens“ lesen kann, obwohl man sämtliche Buchstaben des Genoms kennt.

Als Grund dafür sind epigenetische Mechanismen zu sehen, deren Entschlüsselung eine große Herausforderung darstellt. Mit dem Begriff Epigenetik werden mehrere Ebenen der Genregulation zusammengefasst, die nicht in der linearen Sequenz des DNA-Moleküls kodiert sind, wohl aber vererbt werden können, und sei es nur von einer Zelle auf die Tochterzellen. Mehrzellige Organismen können auf diese Weise ihre Gene während der Entwicklung oder in einzelnen Geweben unterschiedlich regulieren. Dabei ist entscheidend, dass nach jeder Transkription, jedem DNA-Schaden und jeder Zellteilung nicht nur die genetische, sondern auch die epigenetische Information wiederhergestellt wird, um Expressionsmuster aufrecht zu erhalten. Epigenetische Veränderungsmöglichkeiten erlauben es den Zellen eines Organismus, sich an ändernde Bedingungen anzupassen, ohne dass die DNA-Sequenz selbst geändert werden muss. Gegenwärtig können drei Ebenen der epigenetischen Regulation darstellen, unterschieden werden:

- DNA-Methylierung
- Histonmodifikationen
- Höhere Ordnungsebenen

DNA Methylierung

DNA kann an bestimmten Nukleinbasen chemisch geändert werden. Durch Enzyme werden Methylgruppen angehängt. Ein epigenetischer Hintergrund besteht bei der Methylierung von Cytosin in sogenannten CpG-Inseln, die der differentiellen Genexpression und der genomischen Prägung dient. CpG-Inseln können abhängig von ihrer Methylierung die Lesehäufigkeit des dahinter liegenden Gens beeinflussen. Eine Methylierung der DNA geht mit einer Repression der Genexpression einher.

Fehlerhafte DNA-Methylierungen können Krankheiten verursachen. Tumoren haben oft Methylierungsmuster, die von normalen Geweben abweichen. So kann Tumorentstehung durch zu starke Methylierung von DNA-Bereichen begleitet sein, die vor einem Gen liegen. Dadurch wird das Gen in seiner Nutzung in seiner Expression unterdrückt. Durch gezielte Demethylierung, können stummgeschaltete Gene wieder reaktiviert werden (Egger et al., 2004).

Ein Beispiel aus der Humangenetik sind eineiige Zwillinge, die sich teils erheblich in Aussehen, Verhalten und Krankheitsveranlagung unterscheiden können. Veränderungen treten mit zunehmendem Alter der Zwillinge stärker hervor, ein Hinweis auf den besonderen Einfluss der Umwelt. Dieser Effekt tritt stärker auf, wenn die Zwillinge lange in getrennten Umwelten lebten. Ein Vergleich ergab bei einem Drittel der untersuchten Paare deutliche Unterschiede in der Anzahl und der Verteilung der DNA-Methylierungen. Diese Veränderungen sammeln sich während des Alterns an (Fraga et al., 2005).

Der Histon-Code

Die DNA ist im Zellkern in Form des Chromatins in Strukturen höherer Ordnung gepackt. Das Nukleosom als wiederholte Einheit besteht aus DNA, die um Core-Histone (aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4) geschlungen ist. Der hochkonservierte Aminoterminus der Core-Histone ragt aus der globulären Domäne heraus und kann zahlreichen Modifizierungen unterzogen werden. Neben der Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) gehört auch die Methylierung von Lysin- und Argininresten durch Histon Methyltransferasen (HMTs) sowie die Phosphorylierung von Serinresten durch Histon-Kinasen (HKs) zu den geläufigsten Histonmodifikationen. Daneben wurden die Anheftung von Ubiquitin- und SUMO-Einheiten (small ubiquitinrelated modifier) sowie die Poly(ADP)-Ribosylierung als weitere Modifikationsmöglichkeiten beschrieben (Review: Biel et al., 2005).

Im Fall der Histone H3 und H4 konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen in einem engen Zusammenhang mit Aktivierung und Repression von Transkriptionsvorgängen stehen. So führt die Acetylierung des Histons H3 an Lysin 14 (H3-K14) und die Trimethylierung von H3 an Lysin 4 (H3-K4) zur Aktivierung von Transkriptionsvorgängen (Jenuwein und Allis, 2001). Die Methylierung von Lysin 9 (H3-K9) und von H4-K20 wird mit genetischer Inaktivierung in Verbindung gebracht. Detektiert man mit Antikörpern gegen diese speziellen Modifikationsstellen, so kolokalisieren diese häufig mit Zentromeren und Heterochromatin (Zinner et al., 2006). So kann man die Einteilung der DNA in Euchromatin und Heterochromatin auch mit Histonmodifikationen in Zusammenhang bringen. Euchromatin enthält aktive Gene oder DNA-Abschnitte, die bereit für Transkription sind. Es wird angenommen, dass es eine lockere Chromatinstruktur hat. Dem gegenüber stehen zwei Sorten von Heterochromatin. Konstitutives Heterochromatin enthält keine Gene und verbleibt immer in kompakter Form. Es besteht aus zentromerischer DNA und größeren repetitiven Blöcken. Fakultatives Heterochromatin entsteht während der Differenzierung aus Euchromatin, durch epigenetische Änderungen der Chromatinstruktur. Dieser Vorgang kann auch reversibel sein. Ein Beispiel für fakultatives Heterochromatin ist das inaktive X-Chromosom. Der Inaktivierungsprozess geht einher mit einer H3-K9-Methylierung über das ganze X-Chromosom (Boggs et al., 2002).

Histonmodifikationen beeinflussen sich in vielen Fällen gegenseitig, so dass komplizierte Muster entstehen, die den Histon-Code ausmachen (Sims et al., 2003).

Höhere Ordnungsebenen

Als weitere epigenetische Mechanismen wurden höhere Organisationsebenen des Chromatins beschrieben. Bereits im einfachen Vielzeller Hydra konnte durch Pulsmarkierung mit halogenierten Nukleotiden eine gleiche Verteilung von Replikationsmustern festgestellt werden, wie sie auch in Säugern beschrieben wurde. Früh replizierendes Chromatin findet sich weiter innen, spät replizierendes Chromatin wurde am Kernrand nachgewiesen (Alexandrova et al., 2003). Auch die Lokalisation von Chromosomen im Zellkern ist Teil einer höheren epigenetischen Ordnung. Der Zellkern weist eine radial aufgebaute Anordnung von Chromosomenterritorien auf (Cremer et al., 2003; Cremer et al., 2004), die z.B. in menschlichen, Primaten-, und Hühner-Lymphozytenkernen mit dem Gengehalt der Chromosomen korreliert (siehe auch 1.3). Da dieses

Prinzip anscheinend schon sehr lange konserviert ist, liegt es nahe, darin einen evolutionären Vorteil zu vermuten. Eine radiale Sortierung nach genreich und genarm würde einem früherer Vorschlag, wonach Heterochromatin eine „Schutzfunktion“ für genreiches Chromatin ausüben sollte (Hsu et al., 1971), entgegenkommen, jedoch gibt es dagegen auch viele Einwendungen (Tanabe et al., 2002b; Gazave et al., 2005). In humanen Fibroblasten wurden eine größenabhängige Verteilung von Chromosomenterritorien beschrieben (Bolzer et al., 2005).

Auch der Verteilung und der Zusammenlagerung von para- und perizentromerischem Heterochromatin schreibt man einen Einfluss auf die Regulation von Genexpression zu. Während der Differenzierung und Reifung neuronaler Mauszellen finden dynamische Umlagerungen von Chromozentren statt. Die Zellkernform bleibt dabei die gleiche (Solovei et al., 2004a).

Krankheiten mit epigenetischem Hintergrund

Wenn das komplexe Wechselspiel von DNA- und Histon-Modifikationen aus dem Gleichgewicht gerät, drohen schwerwiegende Krankheiten. Krebs kann z. B. entstehen, wenn CpG-Inseln *de novo* methyliert werden (Jones und Baylin, 2002). Das ICF-Syndrom (immuno deficiency, centromeric region instability, facial anomalies) beruht auf dem Defekt eines Enzyms, das für die Methylierung essentiell ist (Ehrlich, 2003). Das Angelmann- und das Prader-Willi-Syndrom, die beide geistige Behinderung verursachen, beruhen auf dem Fehlen einer geprägten maternalen oder paternalen Gensequenz (Nicholls et al., 1998; Goldstone, 2004). DNA-Methyltransferase-1 (DNMT-1) *Knockout*-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben bereit im Embryonalstadium (Li et al., 1992). DNMT-1 ist assoziiert mit den Replikationsfoci während der DNA-Replikation in S-Phase (Leonhardt et al., 1992). Eine globale Hypomethylierung von Chromatins führt zu chromosomalen Instabilitäten und es können sich sehr schnell Tumore entwickeln (Ehrlich, 2002; Feinberg und Tycko, 2004). Das Rett-Syndrom, von dem überwiegend Mädchen betroffen sind, wird durch Mutationen im MECP2 Gen (Methyl-CpG-Bindeprotein 2) verursacht, das auf dem langen Arm des X-Chromosoms liegt. Das MECP2-Protein spielt bei der Entstehung von fakultativem Heterochromatin eine Rolle. Es bindet an methylierte CpGs und trägt so zur Deacetylierung von Histonen bei, was eine Inaktivierung des Chromatins zur Folge hat. Durch die Mutationen im MECP2-Protein kommt es zu einer verdrehten Inaktivierung des X-Chromosoms. Besonders sind neuronale Zellen betroffen, nach anfänglicher normaler Entwicklung verlieren die Kinder ihre geistigen und motorischen Fähigkeiten wieder (Leonhardt und Cardoso, 2000; Weaving et al., 2005).

1.2. Die Architektur des Zellkerns

Der Zellkern ist von einer Lamina umgeben und enthält selbst keine trennenden Membransysteme. Allerdings kommen im Zellkern klar unterscheidbare Kompartimente vor. Die prominenteste Substruktur ist der **Nukleolus** (oder die Nucleoli). Er wird an den NORs, den nucleolus-organizing-regions, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, gebildet. Bei der Maus sind es die Chromosomen MMU 12, 15, 16, 17, 18, 19 (Dev et al., 1977), beim Mensch die Chromosomen HSA 13, 14, 15, 21 und 22. Die NORs tragen Cluster von tandemartig wiederholten ribosomalen Genen (rDNA). Im Nukleolus laufen die Prozessierungen und der Zusammenbau bei der Biosynthese der Ribosomen ab (Scheer und Hock, 1999). Die **SFC** (splicing-factor compartments, auch Speckles genannt) enthalten einige Faktoren die zum Spleißen der prä-m-RNA notwendig sind. Die Transkription von Genen findet an vielen verschiedenen Stellen über den Kern verteilt statt. Die dafür benötigten Spleißfaktoren halten sich bevorzugt angereichert in den Speckles auf (Misteli, 2000). Vom **Cajal-Body** wird vermutet, dass er hauptsächlich snRNPs enthält, katalytisch aktive Ribonukleoproteine. Er regelt auch die Reifung, Bereitstellung und den Transport von snRNPs für Untereinheiten von Spleißfaktoren (Carmo-Fonseca, 2002). Die Existenz einer **nukleären Matrix** und ihre mögliche Beschaffenheit wird kontrovers diskutiert. Die beobachteten 10-13 nm dicken Filamente, die nach einem Nukleaseverdau und der Extraktion der Lipide, Proteine und der DNA als ein Netzwerk übrigbleiben, könnten auch Präparationsartefakte sein. Ein Beweis für die Existenz eines solchen Netzwerks in vivo wurde noch nicht erbracht (Pederson, 2000; Ostermeier et al., 2003).

Chromosomenterritorien

Chromosomen nehmen ihre kompakte Gestalt nur in der kurzen Zeit der Mitose an, während der sie kondensiert und einzeln vorliegen. Ihre genaue räumliche Organisation in der Interphase wird seit langem untersucht. Schon 1885 stellte Carl Rabl die Hypothese auf, dass Chromosomen während der Interphase begrenzte Bezirke im Zellkern einnehmen (Rabl, 1885). Theodor Boveri's „Theorie der Chromosomenindividualität“ spricht auch davon, dass jedes Chromosom ohne eine Durchmischung mit anderen, ein eigenes Territorium im Zellkern ausfüllt (Boveri, 1909). Später wurde die Theorie der Chromosomenterritorien zunächst wieder verworfen, weil man auf elektronenmikroskopischen Bildern nur kontrastreiche Chromatingrenzen zwischen Eu- und Heterochromatin, nicht aber zwischen einzelnen Chromosomen erkennen konnte (Comings und Okada, 1970). Eine territoriale Organisation der Chromosomen bestätigten dann aber Versuche mit partieller Laserbestrahlung von Zellkernen. Bei Untersuchung der entsprechenden Metaphasechromosomen zeigte sich, dass nur einzelne Chromosomen Strahlenschäden aufwiesen. Umkehrt führte die Bestrahlung einzelner Metaphasechromosomen zu abgegrenzten Domänen in den Tochterzellen (Zorn et al., 1979; Cremer et al., 1982). Dies ließ auf eine territoriale Anordnung der einzelnen Chromosomen schließen. Sichtbar wurden Chromosomenterritorien in menschlichen Zellen durch den Einsatz von chromosomalen Painting-Sonden und der Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) (Manuelidis, 1985; Schardin et al., 1985; Cremer et al., 1988; Lichter et al., 1988; Pinkel et al., 1988). Benachbarte Territorien überlappen sich nicht oder nur wenig (Visser und Aten, 1999). Auch kleinere Untereinheiten von Chromosomen kann man

markieren und sichtbar machen, z.B. p- und q-Arme, sowie einzelne Chromosomenbanden. Auch diese bilden abgegrenzte Bereiche (Dietzel et al., 1998). Als Ergebnis steht fest, dass Chromosomen auch in der Interphase individuelle Einheiten darstellen.

Für einzelne Gene wurde gezeigt, dass sie nahe an der Oberfläche der Territorien liegen können. So wurde beschrieben, dass aktiv exprimierte Gene aus einem Territorium herausragen (Für eine Übersicht siehe: Foster und Bridger, 2005; Sproul et al., 2005). Insgesamt hat es sich aber gezeigt, dass transkriptionelle Aktivität nicht notwendigerweise an der Oberfläche der Chromosomenterritorien stattfinden muss (Mahy et al., 2002; Stadler et al., 2004). Neuere Arbeiten weisen daraufhin, dass die Chromatinkonfiguration von Interphasechromosomen und sogar von kondensierten mitotischen Chromosomen noch so durchlässig ist, dass Proteine durch sie hindurch diffundieren können (Cheutin et al., 2003; Chen et al., 2005).

Zentromerisches Heterochromatin - Chromozentren

Zentromere können auch an der Genregulation beteiligt sein kann. Für einzelne Gene hat man im inaktiven Zustand eine Kolo-kalisation mit dem Zentromer beobachtet (Brown et al., 1997; 1999). Die in humanen Lymphozyten beobachteten Bewegungen von Zentromeren betreffen Verlagerungen vom Kernrand zum Zentrum beim Übergang von der G1- zur G2-Phase (Ferguson und Ward, 1992; Weimer et al., 1992). Schon an mit Giemsa gefärbten Gewebeschnitten wurden unterschiedliche Zahlen von perizentrischen Heterochromatinclustern in verschiedenen Gewebetypen gezählt. Es entstand der Eindruck, dass in Kernen weiter differenzierter Zellen weniger Heterochromatinblöcke vorkamen als in Zellen die noch über Proliferationspotential verfügen (Hsu et al., 1971). Neuere Untersuchungen beschäftigen sich ebenfalls mit dem Phänomen des Zentromer-Clustering und der Verteilung dieser Cluster, der sogenannten Chromozentren, die besonders bei der Maus vorkommen. In neuronalen Purkinje-Zellen der Maus konnten dynamische Clustering-Muster bezüglich Anzahl und Lokalisation während der postnatalen Entwicklung beschrieben werden (Solovei et al., 2004a). In Retinazellen (Stäbchen) der Maus wurde eine umfassende Verlagerung von Chromozentrenmaterial vom Kernrand in die Kernmitte beobachtet. Gleichzeitig wurde im Lauf dieser postnatalen Entwicklung in den Photorezeptorzellen ein extremes Clustering von Chromozentren beschrieben, es wurden durchschnittlich nur noch 1.6 Chromozentren pro Zellkern gezählt (Kösem, 2005).

Das CT- IC Modell

Die Forschungsergebnisse der vergangenen Jahre haben zur Entwicklung eines detaillierten Modells (siehe Abbildung 1) von Chromosomenterritorien (CTs) und Interchromatin Compartments (ICs) geführt (Cremer und Cremer, 2001). Die Oberfläche von CTs ist dabei nicht glatt, sondern unterschiedlich komplex gefaltet (Eils et al., 1996). Aus dem CT heraus können bis zu mehreren Megabasen große Chromatinbereiche Ausstülpungen bilden (Volpi et al., 2000). Das Chromatin in einem CT besitzt unterschiedliche Dichten. In der Modellvorstellung liegt aufgelockertes Chromatin mit geringer Dichte dem IC zugewandt, während sich das dichteste Chromatin im Inneren des CT befindet. Führt man das Fusionsprotein H2B-GFP in lebenden Zellen ein, so kann man die Verteilung von Chromatin über mehrere Zellzyklen beobachten (Kanda et al., 1998). CTs zeigen eine Aufteilung in Areale der frühen DNA-Replikation, mit gendich-

ten 1Mb-Domänen, die im Inneren der Zellkerne liegen. Sie werden eingerahmt von genärmeren Domänen mit mittlerem bis spätem Replikationszeitpunkt, die mehr an der Kernperipherie liegen und Kontakt zur Kernlamina und ihren Einstülpungen haben. Auch rund um den Nukleolus liegen genärmere 1Mb-Domänen mit spätem Replikationszeitpunkt (Sadoni et al., 1999; Zink et al., 1999). Verantwortlich für eine höhere Ordnung in Zellkern könnte die Hierarchie der Chromatinfibern sein. Aktive Gene würden sich mehr an der Oberfläche der gefalteten Chromatinfibern, inaktive mehr im Inneren der Chromatinstruktur befinden. Durch Auflockerung der Chromatinstruktur würden bei Bedarf auch innenliegende Gene den Transkriptionskomplexen zugänglich gemacht. Die CTs sind umgeben vom Interchromatin-Compartment (IC), das sich rund um die 1Mb-Domänen erstreckt. Das IC enthält die Komplexe für Transkription, Spleißen, DNA-Replikation und Reparatur, die sich auch in größeren, chromatinfreien Domänen zu Aggregationen zusammenlagern. Diese lakunenartigen Erweiterungen erreichen Durchmesser bis zu mehreren μm und verästeln sich bis auf wenige nm breite Ritzen, die womöglich nur aufgrund elektrischer Abstoßung zwischen den CTs offengehalten werden (Cremer et al., 2000). In den größeren Freiräumen im IC finden auch die SFCs, die Cajal-Bodies und die PML-Bodies Platz. Durch die komplex gefaltete Struktur der CT erreicht das IC auch weit im Inneren liegende Areale, so dass transkribierte Gene sowohl im Inneren als auch an der Oberfläche der Territorien liegen können (Verschure et al., 1999).

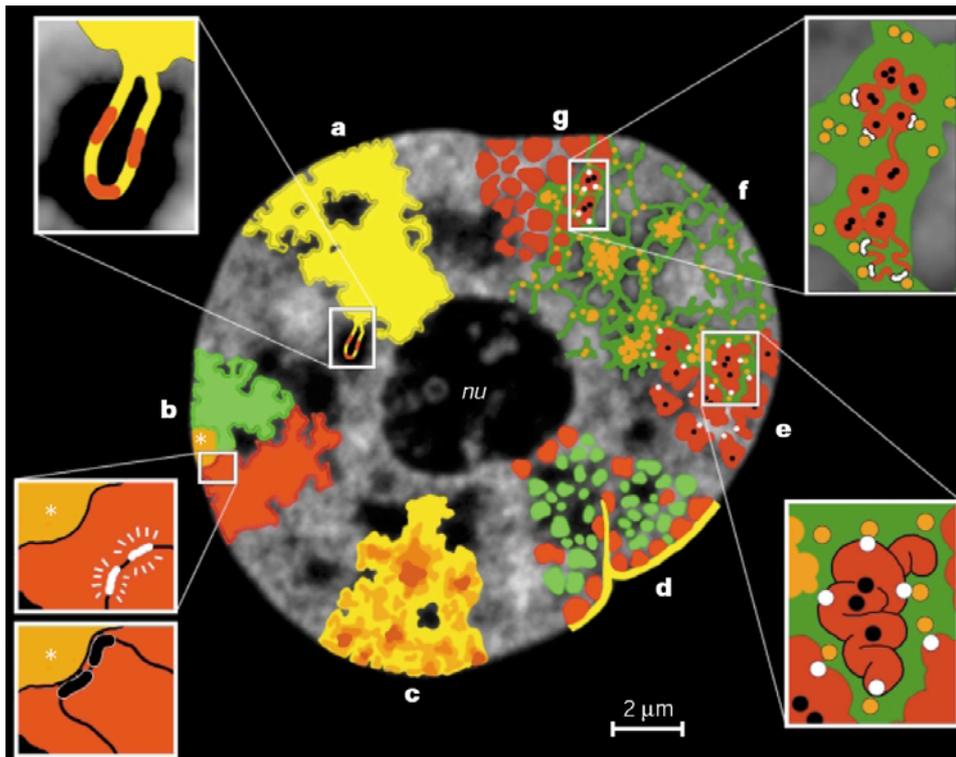


Abbildung 1: Das CT-IC-Modell der funktionalen Zellkernarchitektur aus Cremer et al. (2001).

Eigenschaften und Erkenntnisse, die das CT-IC-Modell (Chromosomen-Territorien-Interchromatin-Compartment) ausmachen, sind als farbige Schemazeichnungen ausgeführt. Sie sind über das mikroskopische Bild eines lebenden HeLa-Zellkerns gezeichnet.

a | Chromosomenterritorien haben eine komplex gefaltete Oberfläche. Zur Genregulation können DNA-Schleifen mit aktiven Genen aus dem Chromosomenterritorium heraus, in den Interchromatinraum hineinragen.

b | Chromosomenterritorien enthalten separate Subdomänen für den kurzen und den langen Chromosomenarm, sowie für das Zentromer (Stern). Die Vergrößerung zeigt die Positionseffekte, wenn Genloci in direkte Nachbarschaft zu Heterochromatin treten. Oben: aktiv, Unten: inaktiv durch zentromerisches Heterochromatin.

c | Chromosomenterritorien haben eine unterschiedliche Chromatindichte (dunkelbraun: hohe Dichte, hellgelb: geringe Dichte). Dicht gepacktes Chromatin liegt zentraler und abgewandt vom Interchromatinraum

d | Dieses Chromosomenterritorium zeigt früh- (grün) und spät-replizierende Chromatindomänen (rot). Erstere sind genreich und liegen zwischen den genarmen Chromatindomänen, letztere sind eher genarm und steht im Kontakt mit der Kernlamina oder um den Nukleolus (nu) herum. Jede Unterdomäne enthält ~1-Mb DNA. Die Kernmembran mit möglichen Einfaltungen ist gelb dargestellt.

e | Chromosomenterritorien sind aus hierarchisch organisierten Chromatinfasern aufgebaut. Aktive Gene (weiße Punkte) findet man an der Oberfläche der gefalteten Fasern, nicht exprimierte Gene liegen eher im Inneren der Fasern (schwarze Punkte).

f | Der Interchromatinraum (IC, grün) enthält die Proteine für Transkription und Splicing, für DNA-Replikation und Reparatur (alle zusammen orange).

g | Zwischen den ~1-Mb Subdomänen (rot) befindet sich der IC-Raum (grün). Aktive Gene (weiße Punkte) liegen entweder auf der Oberfläche oder ragen auf ~100-Kb Schleifen aus den Subdomänen heraus und werden durch Transkriptionskomplexe (orange Punkte) exprimiert.

1.3. **Ordnungsprinzipien der Chromosomenanordnungen im Interphasezellkern**

Schon früh gab es Hinweise darauf, dass manche Chromosomen nicht zufällig im Kern verteilt sind, sondern dass ihre Heterochromatinanteile bevorzugt am Nukleolus lokalisiert sind (Stahl et al., 1976; Manuelidis und Borden, 1988). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre ergaben für die radiale Positionierung von Chromosomen im Interphasezellkern Hinweise auf zwei unterschiedliche Organisationsmuster.

Gendichteabhängige Verteilung der Chromosomen

Aus Beobachtungen, die man im Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität und der Kompartimentalisierung des Nukleus gewonnen hat, kann man eine Verbindung zur Lokalisation genreicher Chromosomen und genarmer Chromosomen herstellen. Durch die Zugabe von halogenierten Desoxynukleosiden zu festgelegten Zeitpunkten der S-Phase konnte gezeigt werden, dass sich das früh-replizierende Chromatin und damit der Großteil der transkriptionellen Aktivität im Inneren des Kerns befindet. Die Mehrheit des spät replizierenden Chromatins besteht aus transkriptionell inaktiven DNA-Abschnitten, das in peripheren Kernzonen und um den Nukleolus gefunden wurde (Ferreira et al., 1997). Kürzlich wurde in Hefe gezeigt, dass auch an den Kernporen aktive Gene lokalisiert sein können, ein Ort, der eindeutig zur Kernperipherie gehört (Casolari et al., 2004). Es ist noch nicht klar, ob in Säugern vergleichbares gefunden werden kann.

Eine gendichteabhängige radiale Anordnung von Chromosomen mit stark unterschiedlichen radialen Positionen konnte beispielsweise bei den beiden kleinen menschlichen Chromosomen HSA 18 und 19 in Lymphozyten nachgewiesen werden. Das genarme HSA 18 wurde in Lymphozyten vorherrschend am Zellkernrand gefunden, das genreichste menschliche Chromosom HSA 19 in zentraler Position. Dieser Sachverhalt wurden zuerst in 2D-Kernpräparaten (Croft et al., 1999), dann in struktur erhaltenen 3D-Kernen gefunden (Cremer et al., 2001; Cremer et al., 2003). Eine gendichteabhängige Verteilung findet sich auch bei Menschenaffen (Tanabe et al., 2002a) und anderen Affenspezies (Tanabe et al., 2005), obwohl teilweise komplexe chromosomale Umbauten stattgefunden haben. Das chromosomale Material, das den menschlichen HSA 18 und 19 entspricht, verbleibt an vergleichbaren radialen Positionen. Ganz ähnlich sind bei Vögeln die genarmen Makrochromosomen am Rand und genreiche Mikrochromosomen im Zentrum der Interphasekerne beobachtet worden (Habermann et al., 2001; Tanabe et al., 2002b). Noch unveröffentlichte Ergebnisse deuten jedoch auch darauf hin, dass eine Umkehrung der Orientierung der gendichteabhängigen Verteilung möglich ist. In Retinazellen finden sich Hinweise auf transkriptionell aktives Chromatin am Zellkernrand (I. Solovei, persönliche Auskunft).

Größenabhängige Verteilung der Chromosomen

Auch eine größenabhängige Verteilung wurde beobachtet. Größere Chromosomen liegen dann weiter außen als kleinere Chromosomen. Diese Konstellation wurde in humanen Fibroblasten nachgewiesen. In einem 24-Farben FISH-Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Position von allen 24 menschlichen Chromosomen in ruhenden, primären Fibroblasten (46, XY) nach der Größe richtet (Bolzer et al., 2005). Auch in Hühnerzellen wurde

eine größenabhängige Verteilung beschrieben. Genreiche Mikrochromosomen lagen sowohl in zyklierenden embryonalen Fibroblasten als auch in nicht-zyklierenden Neuronen in der Mitte des Zellkerns, genarme Makrochromosomen fanden sich bevorzugt an der Kernperipherie (Habermann et al., 2001). Beim Nachweis der größeren Chromosomenarme von HSA 1, 2, 19 und 21 in humanen Fibroblasten wurden die Telomere der q-Arme der großen Chromosomen in der Peripherie des Zellkerns gefunden (Sun et al., 2000). Es gilt aber zu bedenken, dass es eine hohe Variabilität bei der Distanz zwischen pter und qter und bei der Faltung eines Territoriums gibt (Dietzel et al., 1998). Das „mitotic preset modell“ (von Sun et al., 2000) geht davon aus, dass die Chromosomenanordnung von der Stellung der Chromosomen in der Metaphaseplatte vorbestimmt ist (siehe auch Abbildung 63). Dies kann aber nur die Anordnung von Chromosomenterritorien in Fibroblasten erklären, für Verteilungsvorgänge, zur typischen Verteilung in kugeligen Kernen führen, kann dieses Modell keine Erklärung liefern (Sun et al., 2000). Eine Verteilungssimulation am Computermodell ergab für die kugelige Kernform zwar eine leichte Tendenz für große Chromosomen, mehr in der Kernmitte zum Liegen zu kommen. Ein Vergleich von zwei Chromosomengruppen im Modell (sechs große und vier kleine Chromosomen) ergab bei der Radialauswertung keinen Unterschied. Für menschliche Lymphozyten stimmt dies nicht mit experimentellen Daten überein (Cremer et al., 2001). In kugeligen Lymphozytenkernen liegt die Gruppe kleiner Chromosomen 17,18,19 und 20 klar von der Gruppe der großen Chromosomen getrennt, in zentraler Position im Zellkern (Cremer et al., 2001). Bewegungsmöglichkeiten für Umlagerungen bestehen, wie mehrere Arbeiten zeigen konnten. Gerade in der G1-Phase besteht eine hohe Flexibilität des Chromatins (Walter et al., 2003; Thomson et al., 2004; Essers et al., 2005).

1.4. Ziele dieser Arbeit

Eine Transfektion von Maus-Stammzellen mit dem sogenannten GFP-*lac*-Repressor / *lac*-Operator-System sollte die Beobachtung von Chromatinorganisation in vivo ermöglichen. Vergleiche bezüglich der Lage und der Größe der Fluoreszenzsignale sollten Rückschlüsse auf der Organisation des Chromatins auch in unterschiedlichen Zelltypen erlauben, da diese aus den transfizierten ES-Zellen differenziert werden sollten. Unter anderem sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die Positionen von Chromosomenterritorien systematisch während der Differenzierung ändern. Von weiterem Interesse wäre, ob die vollzogenen Veränderungen aufgrund einer gerichteten Bewegung oder aufgrund ungerichteter Brownscher Molekularbewegung erfolgten. Die Dynamik von *lac*-Operatorsequenzen zu vergleichen, die in Hetero- oder Euchromatin integriert haben, würde einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, inwieweit sich Chromatinstrukturen im Kern flexibel und frei verteilen können oder ob Chromatinbewegung nur mit Einschränkungen möglich ist.

Es war zwar nicht möglich, stabil transfizierte Stammzelllinien zu etablieren (siehe 3.1 und 4.6), aber parallel zu den Transfektionsversuchen sollten auch mit zahlreichen 3D-FISH-Experimenten auf fixierten Mauszellen die Chromosomenanordnungen untersucht werden. Durch die Untersuchung verschiedener Zelltypen sollten andere Fragestellungen nachgegangen werden, die im letzten Abschnitt der Einleitung (Untersuchte Parameter) detailliert beschrieben werden.

Bisher wurden in humanen Zelltypen und in Zelltypen verschiedener Primaten zwei Prinzipien der Genomorganisation, die gendichteabhängige als auch die größenabhängige Radialverteilung von Chromosomenterritorien gefunden (Cremer et al., 2001; Tanabe et al., 2002a; Bolzer et al., 2005). Das Auftreten der beschriebenen Verteilungsmuster sollte nun in einem Säuger, der nicht der Ordnung der Primaten entstammt, untersucht werden. Von der Maus, einem ansonsten außerordentlich gut untersuchter Modellorganismus, lagen dazu keine Daten vor. Mit der Wahl dieser Spezies verbindet sich ein zusätzlicher Vorteil. Da die chromosomale Differenzen bei der Maus viel geringer ausfallen (siehe Abbildung 2), als zum Beispiel beim Menschen, kann auch geklärt werden, ob gendichteabhängige und größenabhängige Verteilungsmuster auch hier noch Bestand haben.

Auswahl der Zelltypen

Lymphozyten, Fibroblasten, embryonale Stammzellen und Makrophagen wurden untersucht. Die Auswahl der Zelltypen sollte auch unterschiedliche Zellkernformen und -größen beinhalten. Lymphozyten und Fibroblasten sind Zelltypen, an deren Kernen bereits vergleichbare Untersuchungen bei Menschen, Primaten und anderen Spezies durchgeführt wurden. Diese Vergleichsmöglichkeiten erlauben es, grundlegende Prinzipien aufzudecken und einen evolutionären Vergleich anzustellen. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden ebenso untersucht, wie die daraus durch *in vitro*-Differenzierung gewonnenen Makrophagen. ES-Zellen und die Makrophagen stellen das Differenzierungssystem dar, das bereits für die geplante Lebendzellbeobachtung etabliert war (siehe 3.1). Dieses Differenzierungsexperiment könnte Zusammenhänge zwischen umfassenden Transkriptionsänderungen, terminaler Ausbildung zelltypspezifischer Funktionen und der höheren Chromatinorganisation sichtbar machen, wenn sich Chromosomenpositionen während der Differenzierung ändern. Dabei stellt sich auch die Frage, in wie weit eine mögliche Umgestaltung der Kernarchitektur eine Folge der Differenzierung ist und nur z.B. die veränderte Kernform widerspiegelt oder ob die Umbauten erfolgen, weil sie auch eine regulatorische Funktion in Form eines epigenetischen Mechanismus, übernehmen.

Drei Zelltypen wurden in der S-Phase untersucht, weil in diesem Zellzyklusabschnitt keine größeren chromosomalen Umordnungen angenommen werden (Walter et al., 2003) und die S-Phase einfach durch die Zugabe eines Thymidinanalogons zu identifizieren ist. Um sicher zugehen, dass nach der Differenzierung nur ausgereifte Makrophagen zu Untersuchung gelangten, wurden Makrophagen in G₀ ausgewählt, die auch nach langer Inkubation mit BrdU keinen Einbau erkennen ließen.

Auswahl der Chromosomen

Durch die Limitierung des verwendeten konfokalen Mikroskops auf insgesamt drei Fluorochrome, konnten pro Experiment zwei Chromosomenpaare und die Gesamt-DNA des Zellkerns (Gegenfärbung) untersucht werden. Die Verwendung von sechs verschiedenen Chromosomen-Paint Sonden in allen vier Zelltypen erlaubte es, große, kleine, genreiche und genarme Chromosomen abzudecken. Ein maximaler Gendichte-Unterschied (Gene/Mbp) besteht zwischen den Chromosomen MMU 11 und X. Ein größenabhängiger Einfluss (Mbp) auf die Chromosomenlokalisierung konnte mit dem Paar MMU 1 und 14 untersucht werden da ein maximaler Größenunterschied zwischen

diesen Chromosomen besteht. Ein drittes Paar mit Größenunterschieden (MMU 2 und 9) macht Vergleiche möglich, da es sich im durchschnittlichen Gengehalt auch vom zweiten Paar unterscheidet. Die Chromosomen sollten auch nicht durch das Vorkommen einer Nukleous-organisierende-Region (NOR) in ihren Verteilungsmöglichkeiten von Natur aus eingeschränkt sein (siehe Abbildung 2). Bei kleineren Chromosomen kann man aufgrund der NOR nicht von einer unabhängigen Verteilung ausgehen, es wird vielmehr als gesichert angesehen, dass NOR-Chromosomen (MMU 12,15,16,17,18,19) die Nukleoli aufbauen (Winking et al., 1980; Longo et al., 2003). Die Daten zum Genom der Maus werden in Tabelle 1 dargestellt.

Chromosom	Basenpaare	Mbp	Gene	Gene/Mbp	Gengehalt: Rang
1	195109612	195.1	1639	8.4	17
2	181764313	181.8	1945	10.7	6
3	158945675	158.9	1360	8.6	16
4	154678264	154.7	1542	10.0	9
5	150339831	150.3	1540	10.2	7
6	150245815	150.2	1450	9.7	10
7	139739827	139.7	2052	14.7	2
8	127867632	127.9	1290	10.1	8
9	124135709	124.1	1448	11.7	5
10	130291745	130.3	1224	9.4	12
11	121803636	121.8	1941	15.9	1
12(NOR)	115788303	115.8	948	8.2	18
13	114687153	114.7	1018	8.9	13
14	118895660	118.9	1040	8.7	14
15(NOR)	103639402	103.6	974	9.4	11
16(NOR)	97408558	97.4	840	8.6	15
17(NOR)	92867660	92.9	1214	13.1	4
18(NOR)	90308396	90.3	675	7.5	20
19(NOR)	60626890	60.6	854	14.1	3
X	163688980	163.7	1294	7.9	19
Y	15557720	15.6	26	1.7	21
Summe	2608390781	2608.4	26314		
Durchschnitt	124209084	124.2	1253	10.1	

Tabelle 1: Das Genom der Maus

Die Daten aus der Maus-Datenbank von ENSEMBL, Stand: 02.2006. Die Farben werden für die entsprechenden Chromosomen in dieser Arbeit durchgehend verwendet.

Untersuchte Parameter

Um die Verteilung der Chromosomenterritorien und Chromozentren im Interphasekern zu charakterisieren wurden die folgenden Parameter untersucht:

Unterscheiden sich die Positionen von Chromosomen innerhalb eines Zellkerns, oder auch zwischen Zelltypen? Dieser Fragestellung wird mit dem Programm **3D-RRD** nachgegangen.

Da es Hinweise auf unterschiedliche Verteilungsmuster von para- und perizentrischen Heterochromatin in verschiedenen Zelltypen und -formen gibt, wurde auch die Verteilung und Anzahl der **Chromozentren** in den verschiedenen Zelltypen bestimmt. Dabei spielte auch das **Kernvolumen** der verschiedenen Zelltypen eine Rolle. Schon an einfachen Mikroskopen kann man Größenunterschiede der Kerne mit dem Auge feststellen. Die Kerne der untersuchten Zellen ließen sich nachweisbar voneinander unterscheiden. Ein Vergleich mit Messwerten aus früheren Arbeiten sichern die Ergebnisse ab.

Da immer zwei Chromosomenterritorien gleichzeitig hybridisiert wurden, konnten **Winkel-** und **Abstandsmessungen** zwischen den jeweils vier Territorien die Frage beantworten, ob zwischen den untersuchten Chromosomenpaaren feste geometrische Beziehungen vorkommen. Die Winkelergebnisse wurden auch zur Überprüfung eines besonderen Modells der parentalen Separation eingesetzt. Es konnten aber keine Hinweise auf eine Abweichung von einer zufälligen Verteilung der Chromosomenterritorien entdeckt werden.

Strukturunterschiede in den Territorien der **Mauschromosomen** sollten durch die Analyse mit einem Objektzählprogramm aufgedeckt werden. Eine geöffnete Chromatinstruktur verbindet man mit genreichen, oft transkriptionell aktiven Chromosomenabschnitten. Die Zerfallsanalyse aller hybridisierten Chromosomen-Paints über einen großen Schwellwertbereich ergab Unterschiede in der Chromosomen-Struktur, sowohl zwischen Territorien in einem Zelltyp, als auch zwischen den Zelltypen selbst. Es wurde die Frage untersucht, ob es Zusammenhänge zwischen den gezählten maximalen Objektzahlen und dem Gengehalt bestimmter Chromosomenterritorien gibt.

Zum Vergleich wurden **Strukturunterschiede** einer Serie von **menschlichen Zelltypen** (normale Zelltypen und Tumorzelllinien) untersucht. Diese Bilddaten waren zuvor bereits Gegenstand von Radialauswertungen (Cremer et al., 2003) und wurden für eine Analyse mit dem Objektzählprogramm zur Verfügung gestellt. Die Bilddaten enthalten Zellkerne, die alle mit Chromosomen-Paints von HSA 18 und 19 hybridisiert wurden. Die radialen Unterschiede sind in den Tumorzellen kleiner als in den normalen Zelllinien. Dies wird als Hinweis auf einen teilweisen Verlust der radialen Ordnung in den Kernen maligner Zelllinien interpretiert. Bei der Auswertung mit dem Objektzählprogramm interessierten dabei besonders die möglichen Unterschiede zwischen den vier normalen Zelltypen und den vier Tumorzelllinien. Schon bei der Betrachtung der Bildstapel fielen Strukturunterschiede zwischen den Chromosomen-Paints auf. Diesem subjektiven Eindruck konnten konkrete Zahlenwerte zugeordnet werden. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Chromosomenstruktur und der Entartung von Krebszellen konnte nicht festgestellt werden.

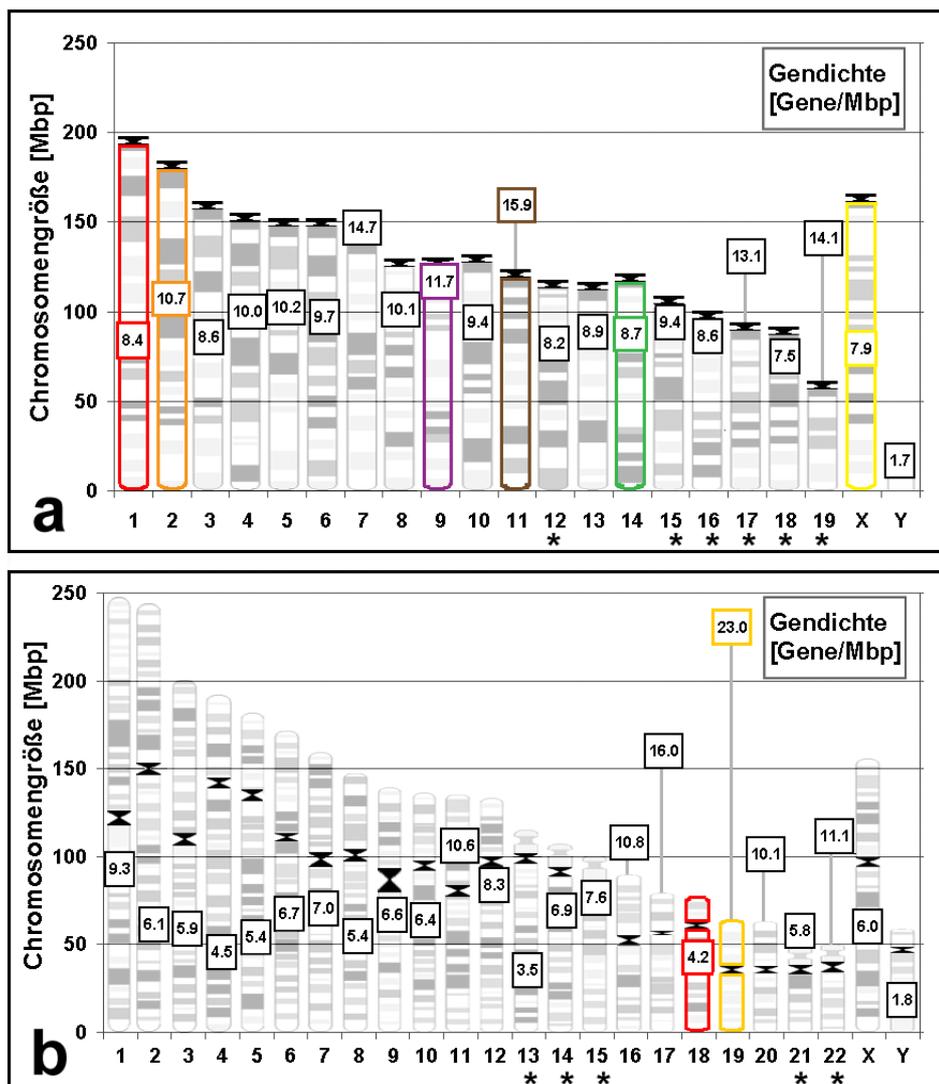


Abbildung 2: Ein Vergleich von Chromosomen der Maus (a) und des Menschen (b). Die Gendichten sind in Kästchen angegeben. Die Daten entstammen der Maus-Datenbank von ENSEMBL. Die in dieser Arbeit untersuchten Chromosomen sind farbig hervorgehoben und im Folgenden näher beschrieben. Chromosomen mit NORs sind durch Sterne (*) gekennzeichnet.

a | Als erstes Paar wurde das größte Chromosom der Maus, **MMU 1** mit 195 Mbp DNA-Gehalt und das Chromosom **MMU 14** mit 119 Mbp ausgewählt. MMU 14 ist das kleinste Chromosom, das kein NOR trägt.

Das zweite Chromosomenpaar bestand aus Chromosom **MMU 2** und **MMU 9**, 182 bzw. 124 Mbp. groß. MMU 2 und 9 stellen das nächste mögliche Paar für groß/klein dar, mit dem Unterschied zu MMU 1/14, dass ihre Gendichten höher liegt. MMU 1/14 enthalten 8.4 bzw. 8.7 Gene/Mbp und MMU 2/9 tragen 10.7 bzw. 11.7 Gene/Mbp.

Das dritte Chromosomenpaar **MMU 11** und **MMU X** steht für die größten Gegensätze in Bezug auf Gendichte. MMU 11 besitzt mit 15.9 Genen/Mbp die meisten nachgewiesenen Gene im Mausgenom. MMU X ist abgesehen von NOR-tragenden MMU 18 und MMU Y das genärmste (7.9 Gene/Mbp.). Der Größenunterschied in diesem Paar MMU 11/X ist relativ gering. MMU 11 ist 122 Mbp lang und MMU X 164 Mbp.

b | Die Chromosomengrößen und der Gengehalt beim Mensch. Das untersuchte Paar **HSA 18** und **HSA 19** unterscheiden sich kaum von der Größe (76/64 Mbp.), jedoch extrem vom Gengehalt. HSA 19 besitzt mit 23.0 Genen/Mbp die meisten nachgewiesenen Gene im menschlichen Genom. HSA 18 ist abgesehen von NOR-tragenden HSA 13 und HSA Y das genärmste. Es enthält nur 4.2 Gene/Mbp.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zellen

Die folgenden verschiedenen Mauszelltypen wurden in den Experimenten verwendet:

- **Lymphozyten** wurden aus dem peripheren Blut von Mäusen gewonnen, das von Dr. Manuela Mohr (Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, LMU) zur Verfügung gestellt wurde.
- Tiefgefrorene primäre **Mausfibroblasten** wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Pfeiffer, Institut für Pharmakologie, LMU)
- **Embryonale Stammzellen** (ES-Zellen) entstammten der Zelllinie EB5, die stabil mit einem Konstrukt transfiziert wurde, das für ein Fusionsprotein H2B-GFP (Histon 2B fusioniert mit grün fluoreszierendem Protein) kodiert (Schroeder et al., 2003). Die Zellen wurden von Timm Schröder (GSF, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München) zur Verfügung gestellt. Der darin enthaltene Expressionsvektor pCAG-IP und die EB5 Zellen stammen ursprünglich von H. Niwa vom RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe.
- **Makrophagen** wurden direkt aus den EB-5 Stammzellen differenziert.

Des Weiteren wurden zwei menschliche Zelltypen selbst kultiviert:

- **Humane Makrophagen** wurden nach der Methode von Linder (Linder et al., 2000) isoliert und vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (LMU München) zur Verfügung gestellt.
- **Humane Fibroblasten** 46, XY wurden aus einer Hautbiopsie eines Jungen gewonnen, mechanisch vereinzelt und tiefgefroren. Die Zellen wurden von der Kinderklinik der LMU München zu Verfügung gestellt.

2.2. Zellkultur

Auf die Zusammensetzung der Medien für die einzelnen Zelltypen sowie spezielle Abwandlungen wird in den entsprechenden Abschnitten eingegangen.

Die Fixierung der Lymphozyten wird detailliert dargestellt, die Fixierung der adhären wachsenden Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen lief immer gleich ab und wird bei den Fibroblasten abgehandelt.

Die gesamte Zellkultur wurde an einer sterilen Werkbank (laminar airflow, hood) durchgeführt. Alle in die sterile Werkbank eingebrachten Gegenstände wie Flaschen wurden zuvor mit Meliseptol® desinfiziert. Alle Zellen wuchsen bei 37°C in Inkubatoren mit 5%iger CO₂ Sättigung und 100% Luftfeuchtigkeit.

Herstellung gelatinisierter Zellkulturflaschen für EB5-Stammzellen:

1% (w/vol) Schweine-Gelatine (Sigma-Aldrich, G-1890/9000-70-8) wird in bidestilliertem Wasser gelöst und danach autoklaviert. In 25 cm²-Flaschen werden 2 ml der Gelatinelösung gegeben, die 20 min einwirkt und dann wieder abgesaugt wird. Die Flaschen lässt man ohne Deckel unter der sterilen Werkbank trocknen. Fertig gelatinisierte Flaschen können bis zu vier Wochen im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt werden.

Auftauen und kultivieren von Fibroblasten und ES-Zellen:

Nach dem raschen Auftauen der Fibroblasten/ES-Zellen im 37°C Wasserbad wurden sie in ein Falconröhrchen mit 8 ml vorgewärmtem Vollmedium überführt und bei 200 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in etwas Vollmedium resuspendiert. Dadurch vermeidet man, dass die Zellen nach dem Auftauen mit DMSO im Medium verbleiben. Danach wurden die Zellen in einer 50 ml/25 cm² Kulturflasche mit 5 ml Vollmedium inkubiert. Für ES-Zellen EB5 benötigt man mit Gelatine beschichtete Zellkulturflaschen.

Die ES-Zellen wurden 1:8 gesplittet. Die ES-Zellen wurden auch tiefgefroren. Aus einer 25 cm² Flasche mit mittelgroßen Kolonien wurden 2 Röhrchen ES-Zellen in 90% Serum und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingefroren.

Fibroblasten wuchsen bis sie zu 70% konfluent waren, bevor sie gesplittet wurden und/oder ein Teil wieder eingefroren wurde. Von einer dicht bewachsenen 75 cm² Flasche wurden 5 Röhrchen Fibroblasten eingefroren. Für embryonale Fibroblasten empfiehlt sich auch eine höhere Serumkonzentration von bis zu 50% im Einfriermedium (plus 10% DMSO).

2.2.1. Die Zählkammer Fuchs-Rosenthal

Die Zellzahl sollte bestimmt werden, bevor man Zellen tiefgefriert, damit nach dem Auftauen die Zellen nicht zu dicht und nicht zu dünn vorliegen. Außerdem ist es bei der Differenzierung wichtig, mit der richtigen Anzahl Zellen zu beginnen. Dazu benutzt man eine Zählkammer aus Glas, die durch eine genau definierte Fläche und Höhe definiert ist. Die Zellen werden mit einem Phasenkontrastmikroskop gezählt.

Es wird am besten die gesamte Fläche, die 16 Großquadrate aufweist, ausgezählt (Abbildung 3). Diese Zählkammer unterscheidet sich von den üblichen Kammern zur Blutzellzählung nicht nur durch den größeren Flächeninhalt, sondern auch durch die größere Kammertiefe.

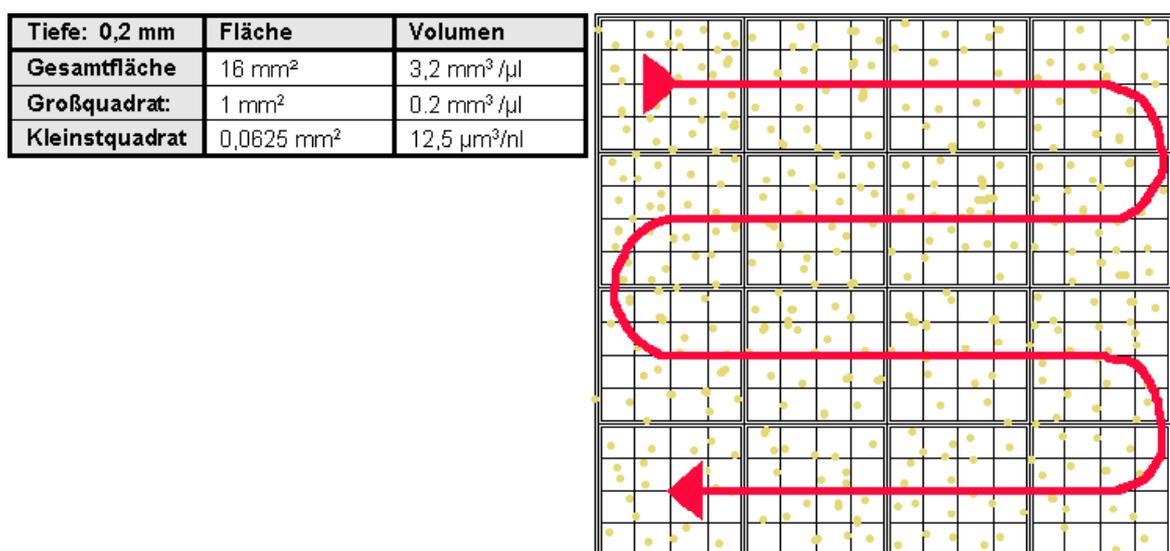


Abbildung 3: Die Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“. Schematische Darstellung der Ätzung der Zählkammer mit Flächen- und Volumenangaben. Die Felder sind in der angegebenen Reihenfolge auszuzählen.

Schließen der Zählkammer:

Das Deckglas säubern und die trockene Zählkammer anhauchen. Sofort das Deckglas aufsetzen und andrücken, so dass Newton'sche Ringe sichtbar werden.

Befüllen: Mit 20 µl gemischter Zellsuspension. Damit Zellen, die auf oder an Begrenzungslinien liegen, nicht doppelt gezählt oder bei der Zählung übergangen werden, hält man sich an die Regel, dass alle Zellen innerhalb eines Großquadrats gezählt werden. Mitgezählt werden die Zellen, die an oder auf zwei Begrenzungslinien liegen.

Berechnung der Zellzahl pro ml:

Wenn man nicht alle Zellen in der Kammer zählen will, kann man die gezählte Zellzahl pro Großquadrat mitteln. Multipliziert mit 5000 erhält man die Zellzahl der Suspension pro ml. Man teilt durch die Anzahl der Zellen die man benötigt und bildet den Kehrbuch. Die erhaltene Zahl gibt das Volumen der entsprechenden Menge in ml an.

Beispiel: 20 000 Zellen werden für eine Differenzierung benötigt. Im Durchschnitt hat man 44 Zellen pro Großquadrat gezählt, das macht 220.000 Zellen pro ml. Geteilt durch 20 000 ergibt sich 36,6 der Kehrbuch davon ist 0,091, also sind in 91 µl Suspension 20 000 Zellen enthalten.

2.2.2. Isolation und Fixierung von Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Material:		
Heparin	Braun, Melsungen	
Hanks Salz Lösung H2387	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Ficoll-Paque PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg	
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin	
FCS; S 0115	Biochrom AG, Berlin	
Concanavalin A (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Bromdesoxyuridin BrdU (Stock 10 mM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Deckgläser (20 x 20mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen	
Poly-L-Lysin (10 mg/ml) MW 150 000, P1399	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Paraformaldehyd (Pulver)	Merck, Darmstadt,	
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	
Lymphozyten-Medium (für die Stimulation)		für 20 ml
RPMI	-	17 ml
FCS	15%	3 ml
Concanavalin A (Stock 5mg/ml)	2,5 µg/ml	50 µl
Lymphozyten-Medium (vor der Fixierung)		für 100 ml
RPMI	-	85 ml
FCS	15%	15 ml

Lymphozyten-Separation mit Ficoll®:

- Ficoll aus dem Kühlschrank nehmen und auf RT erwärmen lassen
- 15 ml Ficoll in ein großes Falconröhrchen (50 ml) geben
- 30 sek. bei 2400 rpm abzentrifugieren
- Blut mit angewärmter Hanks Lösung verdünnen, und vorsichtig über das Ficoll schichten
- 15 min bei 2000 rpm abzentrifugieren
- Die gelblichweiße Trennschicht (buffy-coat) enthält die Mononukleären Zellen, die man mit einer Pasteurpipette abnimmt und in ein neues Falconröhrchen überführt
- 10 ml Hanks-Lösung zugeben, 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen bis auf geringen Rest, Zellen mit Plastikpipette resuspendieren
- Waschschrift mit Hanks-Lösung wiederholen
- Zellen in 20 ml RMPI-Medium (15%FCS) aufnehmen und Pellet resuspendieren

Lymphozyten Stimulation mit Concanavalin A:

Um die Lymphozyten zu stimulieren werden 50 µl Concanavalin A dazugegeben (Endkonzentration 2,5 µg/ml), die 20 ml auf drei 25 cm²-Flaschen verteilt und für 72 Stunden aufrecht in den Inkubator gestellt.

Poly-L-Lysinieren von Deckgläsern:

- Um die frei schwimmenden Lymphozyten an Deckgläser anzuheften, wird Poly-L-Lysin benutzt (Mazia et al., 1975). Dieses basische Aminosäurepolymer vermindert die Oberflächenladung des Glases und erleichtert so die Interaktion mit den Proteinen der Zelloberfläche
- Polylysin (MW 150 000, P 1399) auftauen; muss in bidestilliertem Wasser verdünnt werden (Ausgangslösung 10 mg/ml, Endkonzentration 1,25 mg/ml dazu: 0,5 ml Polylysin in 4 ml Wasser lösen)
- Deckgläser auf einen Tropfen Polylysin legen, 1 h inkubieren bei RT, Wasser an die Deckgläser geben, hochschwimmen lassen, mit der Pinzette nehmen und umdrehen, vollständig trocknen lassen

Lösungen vorbereiten:

- Frisches Formaldehyd ansetzen nach der Methode von (Dernburg und Sedat, 1998): 1,85 g Paraformaldehyd in 3,5 ml H₂O geben, 1 min im sprudelnden Wasserbad kochen. 90 µl 1 M NaOH dazugeben, weiter kochen bis die Lösung klar wird (ca. 2 min), abkühlen auf Eis
- Mit einer Spritze durch einen Filter drücken (0,2 µm Porengröße). Die erhaltene 37%ige Lösung Formaldehyd wird mit 0,3 x PBS auf 4% verdünnt.

Pulsen der Lymphozyten mit Bromdesoxyuridin (BrdU):

Vor dem Verteilen der Lymphozyten erfolgt noch ein BrdU-Puls von 15 Minuten. Das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) wird während der S-Phase der Zellen anstatt Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut und kann mit Antikörpern als S-Phase-Marker nach der Fixierung nachgewiesen werden. Dazu wird BrdU Stocklösung (10mM) 1:1000 in das Medium gegeben, Endkonzentration 10 µM.

Aussähen, Fixieren und Permeabilisieren von Lymphozyten:

- Blutzellsuspension in Falconröhrchen überführen und bei 200 g 10 min abzentrifugieren. Überstand durch 5ml RPMI mit 50% FCS ersetzen, vorsichtig resuspendieren.
- 300 µl der Zellsuspension auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläser geben. Eine Stunde in Inkubationsschrank geben. Prüfen, ob sich die Lymphozyten abgesetzt haben
- Zellsuspension abtropfen lassen, anschließend dreimal in 1x PBS tauchen
- exakt 40 sec in 0,3 x PBS geben (hypotone Behandlung)
- Fixieren in 4% Paraformaldehyd in 0,3x PBS für 10min; die letzten 2 min 0,5% Triton X-100-Lösung drauftropfen
- 3x 5 min in 0,05% Triton X-100-Lösung waschen
- Inkubation für 20 min bei RT in 0,5% Triton X-100
- Deckgläser direkt in 20% Glyzerin (in PBS) überführen, mindestens 30 min bei RT stehen lassen (ggf. über Nacht im Kühlschrank aufbewahren)
- Gefrieren in flüssigem Stickstoff, auftauen lassen, wieder in 20% Glyzerin tauchen, 4x wiederholen
- 3 x 5 min in 0,05% Triton X-100 waschen
- exakt 5 min in 0,1 N HCl stehen lassen, Pufferreste beseitigen.
- 2 x kurz in 2xSSC waschen, in 50% Formamid/2x SSC lagern

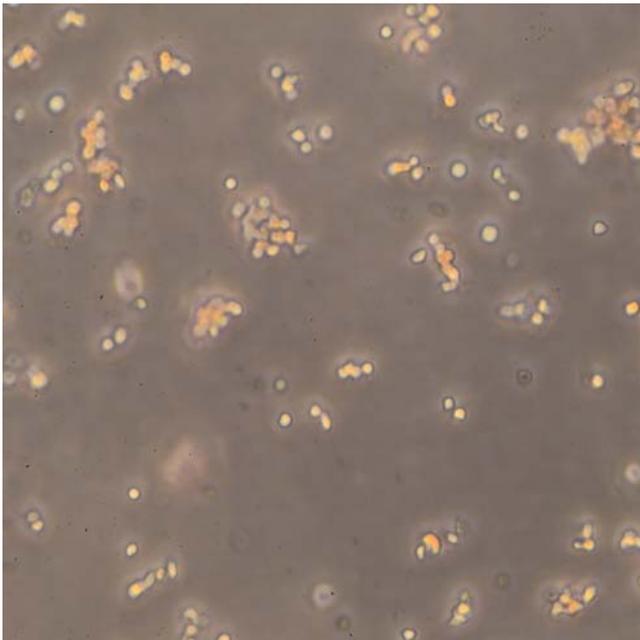


Abbildung 4: Mauslymphozyten in Suspension

Ein Phasenkontrastbild der Lymphozyten nach der Stimulation mit Concanavalin A

2.2.3. Fixierung von adhärent wachsenden Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen werden auf die gleiche Art und Weise fixiert.

Fibroblasten wurden aufgetaut, in Flaschen zur nötigen Dichte herangezogen und auf Deckgläsern ausgesät. Das Medium für Fibroblasten bestand aus DMEM, 15% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Vor dem Fixierungsschritt erhielten sie noch einen BrdU Puls von 30 Minuten.

Bei der Fixierung der ES-Zellen ist besondere Aufmerksamkeit nötig. Da die Stammzellen kugelige Kolonien bilden, ist es nötig, die Zellen vor dem Aussähen gründlich zu trypsinieren. Diese Zellhaufen sind zur Beobachtung nicht geeignet, weil die Kerne darin erstens unregelmäßige Formen annehmen (den Schalen einer Zwiebel ähnlich) und zweitens die Z-Auflösung des Mikroskops nicht ausreicht sie zu durchdringen. Nach dem Ausbringen auf gelatinisierte Deckgläser sollte man mit der Fixierung nicht zu lange warten, da die ES-Zellen sich sonst wieder zu Kolonien zusammenlagern. Es gilt den Zeitpunkt abzapassen, an dem die Zellen schon fest auf der Oberfläche sitzen, aber noch nicht aufeinander zuwandern. Zuvor sollte auch noch ein BrdU-Puls verabreicht werden.

Material für ES-Zell-Medium		für ca. 200 ml
DMEM VLE (very low endotoxin) FG 1445, Biochrom AG, Berlin	-	160 ml
FCS (für ES-Zellen getestet), S 0115, Lot. 437A, Biochrom AG, Berlin	-	30 ml
Natriumpyruvat, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	100 mM	2 ml
Penicillin /Streptomycin / Amphotericin B, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	100 x	2 ml
L-Glutamin, Biochrom AG, Berlin	200 mM	2 ml
MEM: nicht-essentielle Aminosäuren, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	100 x	2 ml
HEPES-Puffer, Merck, Darmstadt	1 M	5 ml
LIF (konditioniertes Medium), Zellkulturüberstand von CHO 8/24 720 LIF-D Zellen (Faust et al., 1994)	-	0,2 ml
Monothioglycerol (MTG; Stock: 0,15 M) Merck, Darmstadt		0,2 ml

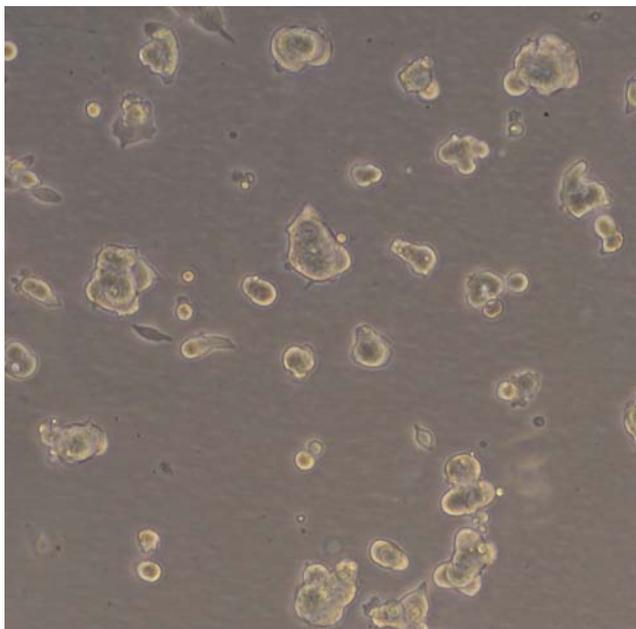


Abbildung 5: EB5 ES-Zellen

Phasenkontrastbild der Stammzellkolonien. Sie wuchsen in gelatinisierten Zellkulturflaschen und bildeten darin die typischen kugelförmigen Kolonien.

Makrophagen werden aus ES-Zellen differenziert und werden als einzige auf geätzten Deckgläsern mit Koordinatensystem ausgesät, weil sie später zur zweifelsfreien Identifizierung wiedergefunden werden müssen. Die Differenzierung wird in 2.2.4 erklärt.

3D-Fixierung adhärent wachsender Zellen:

Diese Technik ist Teil einer als „3D-FISH“ veröffentlichten Technik (Solovei, 2002a). Dabei ist ein Austrocknen des Präparates unter allen Umständen zu vermeiden, da sonst Schrumpfungartefakte entstehen. Ebenso wird ausschließlich mit isotonen wässrigen Lösungen gearbeitet. Das Protokoll dient gleichzeitig auch zur Permeabilisierung der Zellen und der Zellkerne.

Vor der Fixierung sollte man das Formaldehyd frisch ansetzen, wie schon in 2.2.2 beschrieben. Das Formaldehyd (37%) wird auf 4% in 0,75x PBS (für adhärent wachsende Zellen) verdünnt. Die Zellen werden vor der Fixierung mit angewärmtem PBS gespült. Die Fixierungslösung wirkt 10 min ein, bevor sie abgegossen und durch 1x PBS

ersetzt wird. Ein erster Permeabilisierungsschritt ist die Inkubation von 15min mit 0,5% Triton X-100 in 1x PBS. Danach werden die Zellen für mindestens eine Stunde in 20% Glycerin (in PBS) gelegt, um eine gute Durchdringung zu erreichen. Es folgen fünf Zyklen von Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Das überschüssige Glycerin wird durch Waschen der Zellpräparate in PBS entfernt. 10 min wirkt 0,1M HCl auf die Zellen ein, bevor sie in 50% Formamid in 2x SSC überführt werden. Sie können über Monate bei 4°C gelagert werden.

Eine Pepsinbehandlung dient der Beseitigung störender Hintergrundsignale (Lengauer et al., 1992). Das Pepsin verdaut Cytoplasmareste auf dem Präparat, welche später vor allem beim indirekten Nachweis von biotin- und digoxigeninmarkierten Sonden stören. Zellpräparate wurden behandelt, wenn im Phasenkontrastmikroskop eine große Menge Cytoplasma sichtbar war (humane Makrophagen). Die Präparate wurden 5 min in 1x PBS äquilibriert. Die Pepsinbehandlung selbst (50 mg / ml Pepsin in 0,01N HCl, PH 2) erfolgte 2 - 10 min bei 37°C. Der Erfolg wurde am Mikroskop kontrolliert. Die Reaktion wurde mit PBS/MgCl₂- Lösung gestoppt (190ml 1xPBS + 10ml 1M MgCl₂). Ein Nachfixierungsschritt für 5 min in 1% Paraformaldehydlösung schließt die Pepsinierung ab (1g PFA in 100ml 1xPBS).

2.2.4. Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen

Die Makrophagen wurden aus den EB5-Stammzellen differenziert (Schroeder et al., 2003). Dazu werden eine genaue Anzahl von Stammzellen auf spezielle Feederlayerzellen gegeben (OP9), die durch ihre abgegebenen Wachstumsfaktoren die Stammzellen dazu anregen, sich zu differenzieren. Als Marker für Makrophagen dient ein Antikörper gegen Mac-1 (entspr. Cd11b).

Verwendet wird die Stromazell-Linie OP9, die eine Differenzierung in Richtung mesodermaler Zellen (wie Blut-, Muskel- und Endothelzellen) veranlassen. Die Zell-Linie OP9 stammt aus ausgespülten Stromazellen der Maus, die sich selbstständig immortalisiert haben (Nakano et al., 1994).

Material:	
10% FCS für OP9	3302-P200709 von PAN Biotech GmbH, 94501 Aidenbach
10% FCS für Differenzierung	3302-P201412 von PAN Biotech GmbH, 94501 Aidenbach
α -MEM (Pulver) Kat.Nr.:11900-016	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin /Streptomycin	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe
Aqua injectabilia	Kat.Nr.:3703452; Braun, Melsungen
0.05% Trypsin / 0.02% EDTA	Biochrom AG, Berlin
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zählkammer (z.B. Fuchs-Rosenthal)	Hecht, Kat. Nr. 449/72
Multicolorbeads/Fluoresbrite Polychromatic 500 nm	Kat. 19507, Polysciences Inc.
Cytokine	produziert von der Zelllinie
LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	CHO 8/24 720 LIF-D
IL-3 (Interleukin-3)	X63 AG-653
MCSF genannt (Makrophagen Koloniestimulierender Faktor)	L-Zellen: LCM (von L-Zellen konditioniertes Medium)

Ansetzen von OP9 Medium:

- α -MEM Trockenmedium in 950 ml Aqua injectabilia auflösen, damit den Pulverbehälter zweimal ausspülen
- 2,2 g NaHCO₃ zugeben, 15 min rühren lassen bis alles Pulver gelöst ist.
- pH-Wert einstellen (auf PH 7,0 weil der Wert nach dem Filtern wieder um 0,2 steigt) und auf 1 L auffüllen. Steril filtrieren
- 10% FCS für OP9 zugeben und 10⁻⁴ M β -Mercaptoethanol, d.h. 1 : 1000 verdünnt aus ME-Stock (0,1 mol/l)
- Das Medium zur Kultivierung und Differenzierung sollte nicht älter als drei Wochen sein.

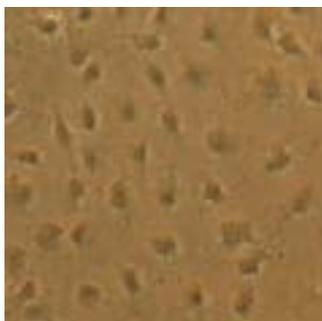


Abbildung 6: OP9-Zellen im Phasenkontrastmikroskop

Kultivieren der OP9 Zellen:

Man lässt die Zellen konfluent wachsen, so dass keine Pseudopodien der Zellen und kein Gefäßboden mehr sichtbar ist. Die Zellen liegen dann ganz flach auf dem Boden des Gefäßes an und sind im Mikroskop sehr kontrastarm. Es sollten wenig Fettzellen (hell mit Fetttröpfchen) sichtbar sein.

Splitten der OP9 Zellen:

Die Zellen alle vier Tage 1:3 – 1:5 splitten Ein zu schnelles Vermehren ist zu vermeiden, da man sonst schnell wachsende Zellen anreichern würde, die keine guten Stroma-Eigenschaften mehr besitzen. Die OP9 Zellen sitzen sehr fest auf dem Gefäßboden. Man spült mit PBS und gibt 1 / 3 / 7 ml Trypsin dazu (für T25; T75; T175). Nicht gleich an die Flaschen klopfen, sondern für 5 min in den Brutschrank stellen, damit sich die Zellen nicht in Klumpen oder einem ganzen Zellteppich, sondern einzeln ablösen. Mit gleich großer Menge OP9 Medium stoppen und mit Pipette auf und absaugen, um eine weitere Vereinzlung zu erreichen. Danach erst mit dem restlichen Medium auffüllen und mischen, dann verteilen. Dies ist besonders wichtig bei der Kultur in 6er Wells, damit die Kulturfläche gleichmäßig bewachsen wird. Nachträgliches Mischen durch Schwenken spült die Zellen in der Mitte zusammen.

ES-Differenzierungsmedium I. = Differenzierungsmedium		für ca. 100 ml
α -MEM	-	90 ml
FCS für Differenzierung	10%	10 ml
β -Mercaptoethanol (Stock: 0,1 mol/l)	10^{-4} M	100 μ l
ES-Differenzierungsmedium II. = Makrophagen-Medium		für ca. 100 ml
α -MEM	-	75 ml
FCS für Differenzierung	10%	10 ml
β -Mercaptoethanol (Stock: 0,1 mol/l)	10^{-4} M	100 μ l
MCSF	15%	15 ml
IL-3	1%	1 ml

Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen:

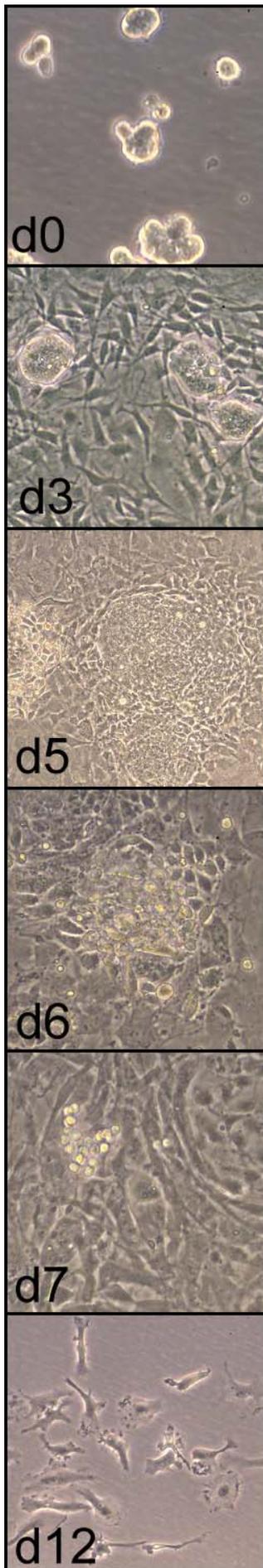
OP9-Stromazellen wurden in einer 25 cm²-Flasche herangezogen, eine weitere Flasche sollte in 5 Tagen soweit sein.

Vorbereitung (d0): ES-Zellen werden so kultiviert oder aufgetaut, dass sie sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden, die Kolonien aber nicht zu groß sind

Tag 1: Undifferenzierte ES-Zellen werden trypsinisiert und in Differenzierungsmedium aufgenommen (LIF und M-CSF frei). Zur Weiterkultur kann man daraus dann Zellen entnehmen (1 : 8) und wieder mit normalem ES-Medium weiterkultivieren. Zur Differenzierung werden die Zellen gezählt. Für eine mit OP9 bewachsene 25 cm²-Flasche verwendet man 20.000 ES-Zellen. Die ES-Zellen werden vor dem Aussähen auf OP9 mit Differenzierungsmedium in einem Falconröhrchen gemischt und nach dem Ausbringen auf die OP9-Zellen möglichst wenig bewegt, damit die Zellen nicht in der Mitte der Flasche zusammengespült werden.

Tag 3: Viele runde ES-Kolonien auf den OP9-Zellen sind sichtbar, einige Kolonien flachen sich bereits ab.

Tag 5: Die ES-Kolonien sind groß, stark abgeflacht und von einem Wulst von OP9 umgeben, die zur Seite geschoben werden. Die Zellen werden 5 min trypsinisiert, mit Differenzierungsmedium gestoppt und intensiv vereinzelt. Die Zellen werden für eine Stunde in eine Kulturflasche mit dreifacher Bodenfläche wie die vorhergehende in den Inkubator zurückgestellt. In dieser Zeit setzen sich die alten OP9-Zellen auf dem Boden des Gefäßes ab und die



undifferenzierten ES-Zellen können ab gespült und auf die neuen OP9-Feeder überführt werden. Kontrolle nach der halben Zeit ist nötig, um möglichst keine differenzierenden Zellen durch Absetzen zu verlieren. Vor dem Umsetzen kontrolliert man die neuen OP9-Zellen noch einmal auf Kontaminationen.

Tag 6: Die ES-Zellen setzen sich schnell wieder ab und bilden flache Kolonien, die kaum von den OP9-Zellen zu unterscheiden sind.

Tag 7: Es sind wenige, kleine traubige Zellhaufen zu sehen (um zehn Zellen). Diese knospen nach oben ins Medium Blutzellen ab. Man sieht auch Dubletten von diesen Suspensionszellen. Größere, flächige Kolonien bestehen aus Endothelzellen.

Tag 8: Es sollten sich die traubigen Zellkolonien vermehrt haben und viele Zellen in Suspension sein. Frühe Blutzellen befinden sich in Suspension. Diese Blutzellen nimmt man ohne Trypsin ab, zentrifugiert sie für 5 min bei 200 g ab und resuspendiert sie in frischem Medium für Makrophagen, dem man MCSF und IL-3 beigemischt hat.

Tag 9 bis Tag 13: Die zunächst freischwimmenden Zellen setzen sich bald ab und bilden auf dem Boden des Kulturgefäßes Haufen von sich entwickelnden Makrophagen, darunter aber auch dendritisch aussehende Zellen. Diese Zellen werden auf Deckgläser mit einem eingezätzten Buchstabenkoordinatensystem (Grid) umgesetzt. Dadurch werden sie vereinzelt und auch individuell lokalisierbar. 24 h vor der Fixierung gibt man BrdU zum Medium, um später die nicht mehr zyklierenden Makrophagen auswählen zu können. Diese terminal differenzierten Makrophagen werden zusätzlich mit immunocytologischen Mitteln identifiziert. Das Oberflächenantigen Cd11b (Corbi et al., 1988) (Kernohan et al., 1990) wird mit einem Antikörper vor der FISH-Hybridisierung nachgewiesen.

Weiter kann man zu den Makrophagen auch kleine, fluoreszierende Latexkügelchen (Beads) geben, die von den Makrophagen phagozytiert (aufgenommen) werden. 8 µl Beads wurden für 4 h zu 2 ml Medium in 35 mm Schalen gegeben, in denen die Makrophagen auf Deckgläsern wuchsen. Nach der Fixierung und der Immunofärbung mit Cd11b-Antikörper kann man in Fluoreszenzmikroskop die Beads im Inneren der Makrophagen beobachten (Abbildung 8).

Abbildung 7: Differenzierung von EB5-ES-Zellen zu Makrophagen. Am Phasenkontrastmikroskop aufgenommene Bilder der Zellen am jeweils angegebenen Aufnahmetag.

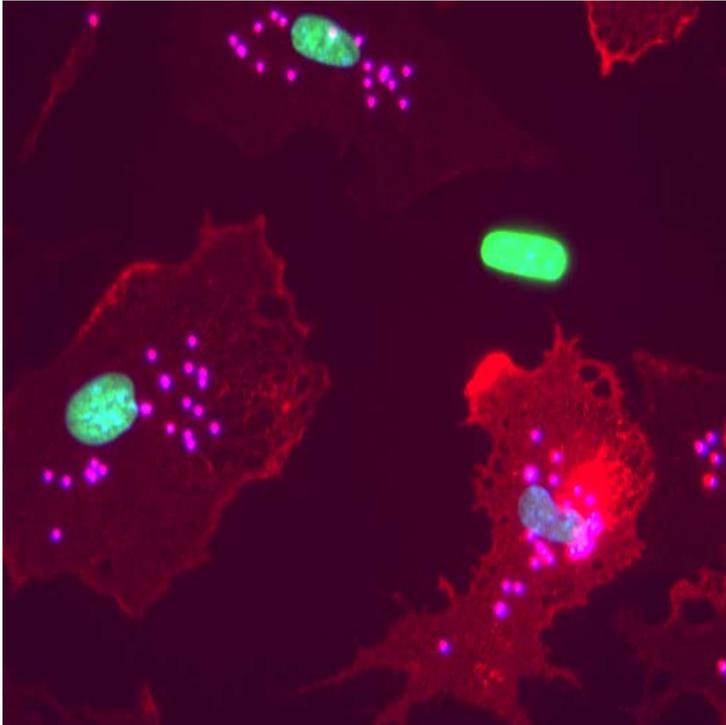


Abbildung 8: Aus EB-5-ES-Zellen differenzierte Makrophagen.

Diese Epifluoreszenzaufnahme zeigt Makrophagen, die aus EB5 ES-Zellen differenziert wurden. Im Cytoplasma erkennt man die aufgenommenen Beads in violett. Die Zellmembran der Makrophagen wurde mit dem Cd11b-Antikörper und sekundären Antikörpern mit Cy3 rot angefärbt. Außerdem ist der grüne Zellkern einer nicht-differenzierten Zelle zu sehen, die keine Beads enthält und deren Zellmembran nicht gefärbt ist.

2.2.5. Präparation von Metaphase-Chromosomen

Metaphasepräparate wurden benötigt um Ergebnisse von Transfektionen beurteilen zu können, Karyotypen zu analysieren und um auch FISH-Sonden auf Qualität und Spezifität zu testen. Die Standardtechnik der Chromosomenpräparation ist unter anderem beschrieben in (Lichter et al., 1991).

Material:	
Colcemid (Stock 10 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin / EDTA (0.05% / 0.02%)	Biochrom AG, Berlin
Hypotonische Lösung: 0.56% KCl, 37°C	Merck, Darmstadt
Fixativ: Methanol/Eisessig (3:1), eiskalt	Merck, Darmstadt
Pepsin ~ 350 U/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Ethanol 100%, 90%, 70%	BfB, München

Im Lauf der Arbeit wurden Metaphasen von den verwendeten ES-Zellen hergestellt, auch um den Karotyp auf Unregelmäßigkeiten hin zu untersuchen. Zur Herstellung wurden Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur benutzt, die viele zyklierende Zellen enthält. Diese Kultur wird mit dem Spindel-Inhibitor Colcemid versetzt. Colcemid depolymerisiert Mikrotubuli, verhindert ihre neuere Zusammensetzung und arretiert die Zellen somit in der Metaphase.

Nach der Inkubation mit Colcemid und der Ernte der Zellen erfolgte eine hypotone Behandlung mit KCl-Lösung um den inneren Druck in den Zellen zu erhöhen. Die Zellen werden mit einer frischen Mischung vom eiskaltem Methanol mit Eisessig (3:1) fixiert. Mehrere Waschschrte schließen sich an. Beim Vorgang des Auftropfens wurde nach (Deng, 2003) vorgegangen. Chromosomenpräparate müssen durch trockenes Erhitzen künstlich gealtert werden.

Durchführung der Metaphasenpräparation:

- ES-Zellen wachsen in gelatinisierten Flaschen bis zu mittlerer Koloniegröße heran
- 20 µl Colcemid pro ml Kulturmedium (Stock 10 mg/ml) werden zugegeben und für 60 min inkubiert
- Die Zellen werden trypsiniert, in ein 15 ml Röhrchen transferiert und bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugiert.
- Den Überstand bis auf 0,5 ml abnehmen und die Zellen durch Schnippen an das Röhrchen gründlich resuspendieren.
- 10 ml hypotonischen KCl-Lösung (0,56%) tropfenweise dazugeben, dabei sanft mischen. Dann 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Die Zellen mit 700 rpm für 10 min abzentrifugieren. Überstand bis auf 0,5 ml entfernen. Die Zellen durch Schnippen an das Röhrchen vorsichtig resuspendieren. Keine Pipette verwenden! 2-3 ml Fixativ (Methanol : Eisessig = 3:1) zutropfen, während das Röhrchen sanft geschüttelt wird. Dann auf 15 ml mit Fixativ auffüllen und für mindestens 30 min auf -20°C stellen.
- Bei 1000 rpm für 10 min abzentrifugieren. Den Überstand bis auf 0,5 ml entfernen. Die Zellen durch Schnippen an das Röhrchen vorsichtig resuspendieren, wieder mit Fixativ auffüllen. Dieser Waschschrte kann bis zur gewünschten Reinheit wiederholt werden. Die Zellsuspension kann bei -20°C gelagert werden.

Durchführung des Auftropfens (Deng, 2003):

- Ein Wasserbad wird auf 50°C vorgeheizt
- Die Objektträger werden vor dem Auftropfen mit Ethanol gereinigt und trockengerieben.
- Zwei Objektträger werden in die Metallbox gelegt, die den Voraussetzungen nach entspricht. Größe der Box, Wasseroberfläche im Wasserbad und Abstand zum Deckel des Wasserbades sind entscheidende Kriterien.
- Man tropft mit einer Plastikpasteurpipette versetzt zwei Tropfen auf die Objektträger auf und gibt die Metallbox sofort danach in das Wasserbad und schließt den Deckel des Bades.
- Nach einer Minute ist das Fixativ verdampft und die Metallbox kann wieder entnommen werden. Man kann sie für die nächste Runde auf Eis abkühlen.
- Die Metaphasen werden am Phasenkontrastmikroskop überprüft, das Mischungsverhältnis kann evtl. noch korrigiert oder eine Waschschrte wiederholt werden

Alterung:

- Die Metaphasenpräparate werden noch für 2 h bei 65°C trocken gealtert
- Eine (optionale) Pepsinierung erleichtert die Zugänglichkeit von Präparaten für DNA-Sonden. Dazu wird 0,01 N HCL auf 37°C erwärmt. Darin löst man das Pepsin (aus der Stocklösung 320-450U/µl) mit einer Verdünnung von 1:2000 zur Endkonzentration von 0,16 - 0,23 U/µl.

- Die Chromosomenpräparate werden bis 10 min in der Pepsinlösung inkubiert und der Vorgang am Phasenkontrastmikroskop überwacht. Zum sofortigen Stoppen der Pepsinaktivität kann ein spezieller Puffer verwendet werden (1 x PBS mit 5% 1 M MgCl₂). Danach werden sie noch 2 x in normalem PBS gewaschen.
- Vor einer Hybridisierung werden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe 70%, 90% und 100% dehydriert und danach luftgetrocknet

2.2.6. Menschliche Zellen

Die Wirkungsweise des Objektzählprogramms wurde auch an bereits vorhandenen Datensätzen humaner Zellen (Chromosomen-Paints HSA 18 und 19) erprobt. Zur Auswertung standen Aufnahmen von normalen menschlichen Zellen wie Fibroblasten, diversen Blutzellen und vier Tumorzelltypen mit unterschiedlichen Karyotypen zur Verfügung (siehe Tabelle 2). Humane Fibroblasten und Makrophagen wurden auch selbst kultiviert und mit den Chromosomen-Paints HSA 18 und 19 hybridisiert. Das Experiment mit den humanen Fibroblasten wird detailliert in 2.7 beschrieben, ging aber nicht in die Auswertung mit dem Objektzählprogramm mit ein.

	Zelllinie	Herkunft	n	Abweichungen vom Karyotyp
Normal	Lymphozyten	Blut	74	-
	Fibroblasten	Haut	78	-
	GM-CFC	Hämatopoetische Vorläuferzellen	24	-
	Makrophagen	Blut	66	-
Tumor	Jurkat	T-Zell-Leukämie	56	K:18/der(18)t(X;18)
	RKO	Adenom eines Kolonkarzinoms	42	-
	DLD-1	Adenom eines Kolonkarzinoms	30	-
	SW 480	Adenom eines Kolonkarzinoms	36	K: 18/del(18q) K: der(8;19)t(8;19)/der(19)t(19;8;19;5)

Tabelle 2: Humane Zelltypen

Die mit dem Objektzählprogramm OC-2 untersuchten Bilddaten von humanen Zelltypen und die Zahl der als Datensätze vorliegenden Chromosomen-Paints. Die Zelltypen werden in Cremer et al. (2003) genauer beschrieben.

Von diesen Datensätzen wurden die Signale der Chromosomen-Paints mit beiden Objektzählprogrammen OC-1 und OC-2, wie in 2.10.4 beschrieben, ausgewertet.

Die menschlichen Makrophagen wurden nach der Methode von Linder (Linder et al., 2000) isoliert und vom Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (LMU München) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wuchsen in RPMI-Medium mit 15% FCS. Zu den auf Deckgläsern ausgesäten Makrophagen wurde 24h vor der Fixierung BrdU gegeben. Zusätzlich wurden die Makrophagen noch 2 h vor der Fixierung mit fMLP stimuliert. Das Polypeptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) stimuliert Monozyten und

neutrophile Zellen. Dazu wurde eine Stammlösung von fMLP 1 : 3000 in RPMI Medium **ohne** Serum verdünnt. Die Aktivierung beginnt mit dem Austausch der Medien.

Material:	
FMLP (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) 50 mg/ml	Sigma-Aldrich C. 3506
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
FCS; S 0115	Biochrom AG, Berlin

Nach zwei Stunden wurden die Makrophagen fixiert. Die beiden Zelltypen wurden, wie die anderen Zellen auch, nach strukturerhaltenden Kriterien fixiert:

- 10 min mit 4% Formaldehyd in 1 x PBS
- 10 min mit 0,5% Triton in PBS permeabilisieren

Es folgten die in 2.2.3 beschriebenen weiteren Schritte für fixierte Präparate. Zusätzlich wurden die Präparate pepsiniert (siehe 2.2.3). Die humanen Makrophagen wurden mit HSA 18 und 19 hybridisiert und die Detektion erfolgte wie bei Mauszellen in 2.5.5 beschrieben.

2.3. Transfektion von Stammzellen

Es wurde versucht, CCE ES-Zellen (im Gegensatz zu EB5 ohne jede Transfektion) mit zwei Vektoren zu transfizieren. Ein Plasmid sorgt für die Expression eines GFP-*lac*-Repressor-Fusionsproteins in der transfizierten Zelle. Durch eine Kernlokalisationsfrequenz erscheint der Zellkern nach erfolgreicher Transfektion des einzelnen Plasmids vom GFP-Protein grün gefärbt. Der zweite Plasmid trägt acht *lac*-Operator-Sequenzen, DNA-Abschnitte, die den *lac*-Repressor-GFP-Proteinen als spezifische Bindestellen dienen. Wird dieses *lac*-Repressor-Operator System stabil in Zellen transfiziert, so weisen diese Zellen *in vivo* GFP-gefärbte Punktsignale auf, die Integrationsorte der *lac*-Operatoren kennzeichnen. Die Zahl der Signale kann von Zelle zu Zelle variieren, Subklonierungsschritte sollten stabile Zelllinien mit definierten Integrationsorten liefern. Dieses System wurde schon erfolgreich zur Untersuchung übergeordneter Chromatinstrukturen in Hefe und Hamsterzellen (Robinett et al., 1996) als auch in Mauszellen (Dietzel et al., 2004) verwendet. Auch die Struktur von Metaphasechromosomen wurden damit schon genauer betrachtet (Dietzel und Belmont, 2001). Für diese Arbeit sollte die Lage und Bewegungen der Fluoreszenzsignale im Zellkern der stabil transfizierten ES-Zellen *in vivo* mittels einer Lebendzellkammer am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Aus den transfizierten ES-Zellen sollten über verschiedenen Differenzierungswege verschiedene Zelltypen wie Makrophagen oder neuronale Zellen gewonnen werden. Mit gleichen Methoden sollten Vergleiche zwischen den Zelltypen bezüglich Lage und Größe der GFP-Signale angestellt werden. Diese sollten Rückschlüsse auf die Organisation des Chromatins in unterschiedlichen Zelltypen erlauben. Parallel zu den *in vivo* Beobachtungen sollten die Versuche auch mit fixierten Zellen wiederholt werden.

2.3.1. Verwendeten Plasmide

Die ursprünglichen Plasmide (Robinett et al., 1996) stammen aus dem Labor von A. Belmont (Department of Cell and Structural Biology, University of Illinois,

Urbana, USA) und wurden von S. Dietzel zur Verfügung gestellt. Die helle Variante EYFP-F46L (Nagai et al., 2002) wurde von Manja Ziegler (im Labor von R. Brack-Werner, GSF, München) anstatt des EGFP in das ursprüngliche Plasmid p3'SS *lac*-Repressor einkloniert und zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide (siehe Abbildung 9) wurden in transfizierten Bakterien (*E. coli* DH5 α) in LB-Flüssigkultur vermehrt und die Plasmid-DNA mit Midi-Kits von Qiagen (Kat. 12243) isoliert. Nach dem Verdau mit Restriktionsenzymen wurden auf einem Agarosegel die Fragmentlängen überprüft. Die DNA Konzentration der Plasmide wurde an einem Photometer bestimmt. Es ergaben sich folgende Konzentrationen:

Plasmid	DNA Konz.
p3'SS <i>lac</i> -Repressor-GFP	720 $\mu\text{g/ml}$
p3'SS <i>lac</i> -Repressor-EYFP	680 $\mu\text{g/ml}$
pPS-8.8 <i>lac</i> -Operator	490 $\mu\text{g/ml}$

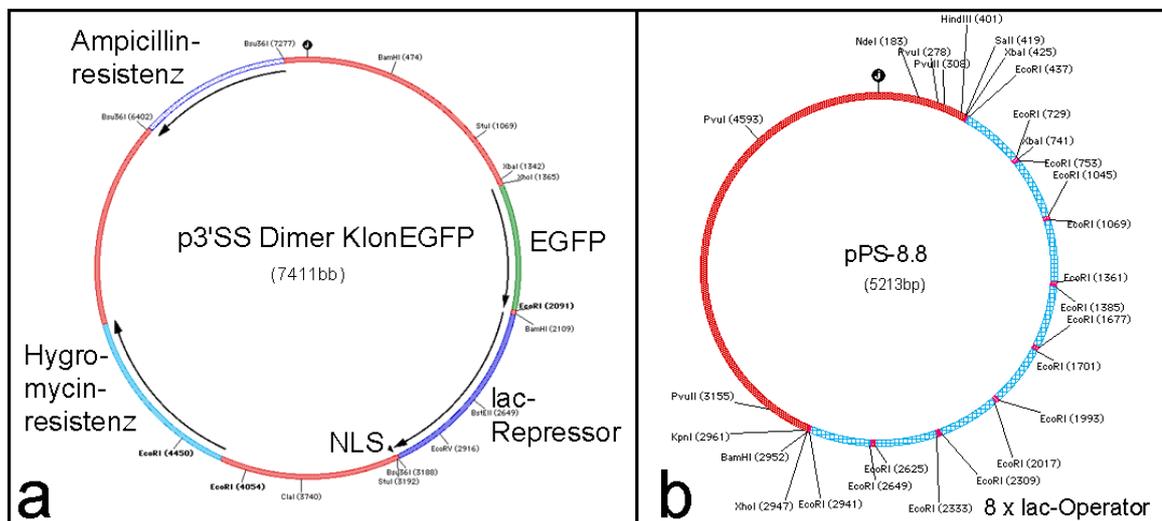


Abbildung 9: Karten der beiden verwendeten Plasmide

a | Die Karte des Plasmids p3'SS, das für das lac-Repressor-EGFP-Fusionsprotein kodiert (es wurde noch mit einem vergleichbaren Plasmid transfiziert, das anstelle des EGFP die Sequenz für YFP trug), es besitzt auch die Sequenz für die Hygromycin-resistenz, mit der nach der Transfektion selektiert wird.

b | Das Plasmid pPS-8.8, das die fest ins Genom zu integrierenden lac-Operatoresequenzen trägt.

2.3.2. Transfektionsansatz

Zwei Transfektionsmethoden standen zur Auswahl. Für die Calciumphosphatmethode benötigt man nach einer Anleitung von (Faust et al., 1994) ungefähr 20-50 μg Plasmid-DNA, im Gegensatz zur Lipid-basierten Transfektion mit FuGene6®, die nach den Anweisung des Herstellers Roche mit einer viel geringeren Menge (1-5 μg Plasmid DNA) zu hohen Transfektionsraten führen sollte. Die Anzahl der zu integrierenden Plasmidkopien sollte durch einen zehnfachen Überschuss von pPS-8.8 (zu p3'SS) dahingehend beeinflusst werden, dass relativ wenig GFP/YFP-Fusionsprotein an eine größere Stelle lac-

Operatoren binden sollte, was zu hellen Punktsignalen in Zellkernen mit niedrigem Fluoreszenzsignal-Hintergrund führen sollte.

Als Beispiel wird in Tabelle 3 das Pipetierschema für eine Transfektionsreihe mit FuGene® mit einer Einzeltransfektion, zwei Cotransfektionen und einer Negativkontrolle im Detail dargestellt:

Nr.	1	2	3	4
Transfektion mit folgenden Plasmiden	YFP-lacR	GFP-lacR + pPS8.8	YFP-lacR + pPS8.8	Negativkontrolle
DNA Menge	5 µg	5 µg	5 µg	
FuGene6 ®	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl
<i>lac</i> -Repressor-Fusionsplasmid	0,5 µg (=7,6 µl)	0,5 µg* (=7,1 µl*)	0,5 µg* (=7,6 µl*)	-
<i>lac</i> -Operator-Plasmid pPS8.8	-	4,5 µg (=10 µl)	4,5 µg (=10 µl)	-
serumfreies Medium	77 µl	68 µl	67 µl	100 µl

Tabelle 3: Transfektionsversuch mit FuGene6®

Die Zusammensetzung von vier Transfektionsansätzen (*: hierbei handelte es sich um 1 : 10 Verdünnungen der in 2.3.1 angegebenen DNA-Konzentrationen)

2.3.3. Selektion

Nach der Transfektion wurde das Medium der Zellen mit 300 µg Hygromycin pro ml Medium zur Selektion versetzt. Nach 10 Tagen mit täglichem Wechsel des Selektionsmediums wurden erste Kolonien gepickt, mit Trypsin vereinzelt und wieder auf frische MMC-STO-Feederzellen ausgesät. Von den sich nun entwickelnden Kolonien wurden wieder eine Auswahl gepickt, die Zellen vereinzelt, eine Hälfte mit den Mikroskop auf Fluoreszenzsignale hin untersucht, die andere Hälfte weiterkultiviert. War keine Färbung sichtbar, wurden die Zellen gleich verworfen. Vielversprechende Zellen wurden weiterkultiviert und durch Subklonierungen versucht, Zellen mit fluoreszierendem Punktsignal zu isolieren. Da zu der Zeit noch keine inverses Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung war, gestaltete sich die Such nach solchen Zellen sehr aufwändig, da die Zellen erst entnommen, vereinzelt, geteilt, auf Objektträger aufgebracht und untersucht werden mussten, anstatt sie direkt in der Zellkulturschale (z. B. mit Glasboden) betrachten und beurteilen zu können. Deswegen konnte auch nur in beschränktem Umfang Kolonien betrachtet werden, z.B. 3 x 12 = 36 aus drei verschiedenen Subklonmischungen.

2.3.4. Nachweis der Integration

Um den Erfolg der Transfektion und die Lage der integrierten Plasmide im Genom bestimmen zu können, wurden durch Nicktranslation FISH Sonden aus den Plasmiden hergestellt. Für eine Nick-Translation von 100 µl wurden die folgenden Zutaten und Mengen benötigt.

Menge	Stoff	Endkonzentration	Hersteller
10 µl	10 x NT-Puffer	0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 0,05%BSA	Sigma-Aldrich
10 µl	dNTP-Mix (0,5 mM ACG +0,1 mM T)	50 µM ACG, 10 µM T	Roche, Kat. No.: 1 728 -539, -547, -555, -563
10 µl	0,1 M β-Mercapto-Ethanol	10 mM	Sigma-Aldrich
3 µl	Biotin-16-UTP (1 mM) oder Digoxigenin-16-dUTP	20 µM	Roche, Kat. No.: 1093070 Roche, Kat. No.: 1570013
2 µl	Polymerase I	2 µl	Roche, Kat. No.: 0104493001
2 µl	DNase I (1:500)	2 µl	Roche, Kat. No.: 104159
2 µg	Plasmid-DNA	3,3 µl YFP 5 µl pPS-8.8	-
59 µl	H ₂ O bidest.	-	-

Tabelle 4: Nicktranslationsansatz

Die Zusammensetzung einer Markierungsreaktion mittels Nicktranslation. Damit wurden das *lac*-Repressor-YFP Plasmid und das Plasmid mit den *lac*-Operatoren mit den Haptenen Biotin und Digoxigenin markiert.

Der Nicktranslation wurden nach 80 Minuten auf 15°C jeweils 5 µl der Ansätze entnommen und mit 2 µl Ladepuffer für 5 min bei 80°C denaturiert. Das Gelbild zeigt die DNA-Stücke der erfolgreiche Nicktranslation. Die markierte DNA besitzt die richtige Länge (200-400 bp).

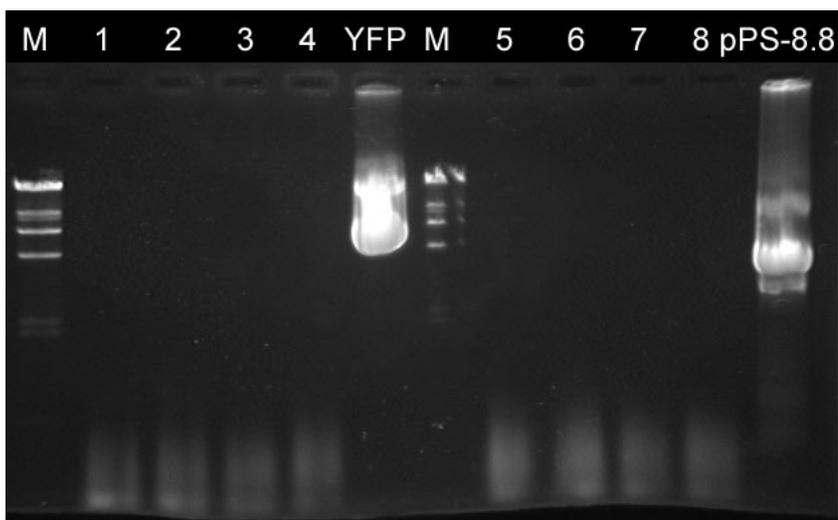


Abbildung 10: Das Gelbild zeigt die Ergebnisse der Nicktranslationen der Plasmide für das Fusionsprotein *lac*-Repressor-YFP (1 - 4) und die *lac*-Operatoren (5 - 8). Zusätzlich zu den Größenmarkern (M) sieht man die Spuren der Ausgangsplasmide, deren Schwerpunkte oberhalb der 4,3 Kb-Bande liegen.

2.4. Immunofluoreszenz

Für Immunfluoreszenzfärbungen mit Oct-3/4-Antikörper und Cd11b-Antikörper wurden die Zellen wie in 2.2.3 beschrieben fixiert. Für einen Nachweis von Oct-3/4 in ES-Zellen benötigt man eine ausreichende Permeabilisierung des Zellkerns, für das makrophagenspezifische Oberflächenantigen ist dies nicht nötig.

Material:	
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Blocklösung (4% BSA / 1 x PBT)	Sigma-Aldrich; BSA, Kat.:A8806
Maus-Oct-3-Antikörper (Verd. 1 : 50)	Biosciences Pharmingen; Cat. 611202
Ratte- α -Cd11b Antikörper (Verd. 1 : 100)	erhalten von Constanze Bonnifer (Leeds)
Schaf- α -Maus-Cy3 (Verd. 1 : 500)	Diananova, Hamburg
Ziege- α -Ratte-Cy3 (Verd. 1 : 100)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TO-PRO-3 1mM (Verd. 1 : 1000)	Molecular Probes, Leiden; NL
DAPI (5 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vectashield	Vector, Burlingame, CA, USA

2.4.1. ES-Zellen mit Oct-3 Antikörper

Der Transkriptionsfaktor Oct-3/4 wird spezifisch in ES-Zellen exprimiert. Durch einen Antikörper gegen Oct-3/4 kann dieser sichtbar gemacht werden und so der Kontrolle dienen, ob sich die ES-Zellen noch in einem undifferenzierten Stadium befinden. Mit diesem Antikörper lässt sich der Transkriptionsfaktor in ES-Zellkernen nachweisen (Nishimoto et al., 1999).

- Die fixierten ES-Zellen (evtl. auch mit Feederzellen als Negativ-Kontrolle) werden mit Triton X-100 (0,5% in PBS) für 10 min permeabilisiert
- Die Deckgläser mit den Zellen werden 15 min in Blocklösung bei 37°C gelegt
- Der Antikörper wird 1 : 50 in Blocklösung verdünnt. Das Deckglas wird mit den Zellen nach unten in einen Tropfen Antikörperlösung auf einem Objektträger gelegt.
- In einer feuchten Kammer inkubiert der AK für 45 min bei 37°C
- Dreimaliges Waschen für je 3 min
- Der sekundäre Antikörper Schaf- α -Maus-Cy3 trägt das Fluorochrom, daher sollte die 45 min. Inkubation lichtgeschützt ablaufen
- Dreimaliges Waschen für je 3 min in 1 x PBS-Tween
- Gegenfärben des Zellkerns mit DAPI für 2 min. DAPI Stocklösung (5 μ g/ml) wird 1 : 100 in PBS-Tween verdünnt. Nach dem Färben kurz mit PBS-T abspülen und einbetten in Vectashield auf einem Objektträger.
- Nachdem Reste von Vectashield mit einem Tuch vorsichtig abgesaugt wurden, das Präparat mit Nagellack verschließen.

2.4.2. Makrophagen mit Cd11b

Cd11b (Mac-1) ist ein Oberflächenantigen, das von ausdifferenzierten Blutzellen wie Makrophagen exprimiert wird. Der Nachweis gleicht dem Vorhergehenden, nur dass nicht permeabilisiert wird. Der erste Antikörper dabei ist Ratte- α -Cd11b, er wird 1 : 100 verdünnt, der zweite Antikörper ist Ziege- α -Ratte-Cy3 (verd. 1:100).

2.5. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Das Prinzip der **Fluoreszenz In Situ Hybridisierung** beruht auf der Eigenschaft der Doppelhelixstruktur der DNA, die eine Denaturierung und basenspezifische Renaturierung erlaubt. Durch Aufschmelzen der DNA werden die beiden Stränge getrennt und durch Zugabe von Stücken markierter DNA können diese beim Renaturierungsprozess anstatt des Originalstücks in die DNA eingebaut werden. Die Markierung kann je nach Fragestellung aus radioaktiven Isotopen, fluoreszierenden Gruppen oder kleinen Molekülen bestehen. Die Nachweise für die letztgenannten erfolgen mit Antikörpern oder spezifisch bindenden Reportermolekülen, die Signale können auch noch über sekundäre oder tertiäre Antikörperlagen verstärkt werden. Diese Tags oder Haptene sind dem Fall der vorliegenden Arbeit meist Biotin, Digoxigenin und seltener DNP (Dinitrophenyl), die über primäre und sekundäre Antikörper, mit Fluorochromen konjugiert, sichtbar gemacht wurden. Hier geht es sich um komplexe Sondenmischungen, die ganze Chromosomen anfärben, sogenannte Chromosomen-Paint-Sonden. Die hier verwendeten Sonden wurden von N. Carter vom Sanger Institut in Cambridge zur Verfügung gestellt. Das Ausgangsmaterial für diese Sonden sind mitotische Chromosomen, die mit einem FACS-Gerät (Fluorescence activated cell sorter) nach der Vorgehensweise von Rabitts (Rabitts et al., 1995) gewonnen wurden. Die sortierten Chromosomen waren die Basis für eine PCR-Amplifikation, die sogenannte DOP-PCR. Mit dieser Methode kann man komplexes DNA-Ausgangsmaterial vermehren. Der Name **DOP** kommt von **d**egenerate-**o**ligonucleotide-**p**rimed PCR und das Verfahren wird seit 1992 angewendet (Telenius et al., 1992). Diese Mischung von Primern ermöglicht die Vervielfältigung des chromosomalen Ausgangsmaterials, wenn man bei der PCR-Reaktion zuerst Zyklen mit niederstringenten Bedingungen ablaufen lässt, die eine teilweise Anlagerung des Primers mit nur 12 Basenpaaren erlauben. In darauffolgenden, hochstringenten Zyklen wird die mengenmäßige Vermehrung des DNA-Materials vorangetrieben.

Die verwendeten Primer besitzen mittig eine variable Sequenz von 6 Bp, in der alle möglichen Basenkombinationen vorkommen können. In 5'-3'-Richtung folgen dann die Basenpaare ATGTGG, die für die DNA-Synthese auch binden müssen. Diese Kombination kommt statistisch gesehen im Genom alle 4^6 (=4096) Basenpaare lang vor, so bindet der Primer in den ersten nicht-stringenten Runden der PCR mit diesen 12 Basenpaaren alle 4 Kb an die genomische DNA. Ein Chromosom von 195 Mbp (z.B. MMU 1) sollte so von über 45.000 Teilstücken DNA dargestellt werden können. In den folgenden PCR-Reaktionen wird auch das 5'-Ende des Primers am komplementären DNA-Strang mitverlängert und bei stringenteren PCR-Runden wirken dann alle 22 Bp des Primers mit.

Das Material, das in dieser Arbeit zum Einsatz kam, entstammte aus sogenannten Sekundären PCRs, bei deren Herstellung es keinen stringenten Schritt

gab. Ausgehend von diesem Material wurden weitere sekundäre PCR's (eigentlich tertiäre PCR's) gemacht, um die Vorräte nicht übermäßig zu dezimieren.

Material:	
10 x PCR-Puffer II, N808-0130	Applied Biosystems by Roche
dNTPs (2,5 mM)	Roche, 1 728 -539, -547, -555, -563
6 MW Primer (17 µM), 12-5092-1/2: 5'-CCGACTCGAG NNNNN ATGTGG-3'	MWG Biotech, Ebersberg
Taq-DNA-Polymerase 5 U/µl, 27-0799	Amersham-Pharmacia Biotech
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems by Roche

Zur Herstellung eines universellen Mastermix (500 µl) für sekundäre DOP-PCR gibt man zusammen:

Menge	Stoff	Endkonzentration
50 µl	10 x PCR-Puffer	50 mM
10 µl	25 mM MgCl ₂	0,5 mM (gesamt 2 mM)
50 µl	6 MW-Primer	2 µM
50 µl	2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	jeweils 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
340 µl	H ₂ O bidest.	-

Für 50 µl eines sekundären DOP-PCR Ansatz werden zusammenpipettiert:

Menge	Stoff
48,5 µl	Mastermix
1,0 µl	DNA von sekundärer DOP PCR
0,5 µl	Taq-Polymerase

Das folgende PCR-Programm mit 35 Zyklen findet Anwendung:

Temperatur	PCR-Programm	Dauer
94°C	Startdenaturierung	3 min
94°C	Denaturierung	1 min
56°C	Anlagern de Primer	1 min
72°C	Verlängerung/Synthese	2 min
72°C	Finale Verlängerung	5 min

2.5.1. Markierung der Sonden

In dieser Reaktion werden die Amplifikate aus sekundären DOP-PCR mit Hapten-gekoppelten dUTPs markiert. Diese werden teilweise anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Die sogenannte Label-DOP-PCR entspricht im wesentlichen dem der sekundären DOP-PCR. Der einzige Unterschied besteht darin, dass die Extensionszeit wesentlich kürzer ausfällt. Dadurch werden auch kürzere Amplifikate generiert, die in etwa einer Länge von 300-600 bp entsprechen. Das ist die benötigte Größe für FISH-Sonden, die in 3D-fixierte Kerne eindringen sollten.

Material:	
H ₂ O bidest.	Chromosomale DNA (sekundäres DOP Produkt)
dTTP 1 mM dATP 2 mM dGTP 2 mM dCTP 2 mM	1 mM Label-dUTP: <ul style="list-style-type: none"> • Biotin-16-dUTP oder • Digoxigenin-11-dUTP oder • DNP-11-dUTP
PCR Puffer (10 x) pH 8.3	MgCl ₂ (25 mM)
6 MW Primer (17 µM):	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Zur Herstellung eines Mastermix (500 µl) für Markierungs-DOP-PCR gibt man zusammen:

Menge	Stoff	Endkonzentration
50 µl	10 x PCR-Puffer	50 mM
10 µl	25 mM MgCl ₂	0,5 mM (gesamt 2 mM)
50 µl	6 MW-Primer	2 µM
25 µl	jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP	jeweils 100 µM dATP, dCTP, dGTP
40 µl	1 mM dTTP	80 µM dTTP
10 µl	Label-dUTP	20 µM Label-dUTP
315 µl	H ₂ O bidest.	-

Für einen 50 µl Markierungs-DOP-PCR Ansatz werden zusammenpipettiert:

Menge	Stoff
48,5 µl	Markierungs-Mastermix
1,0 µl	DNA von sek. DOP PCR
0,5 µl	Taq-Polymerase

DOP-PCR-Programm mit 20 Zyklen:

Temperatur	PCR-Programm	Dauer
94°C	Startdenaturierung	3 min
94°C	Denaturierung	1 min
56°C	Anlagern de Primer	1 min
72°C	Verlängerung/Synthese	30 sek
72°C	Finale Verlängerung	5 min

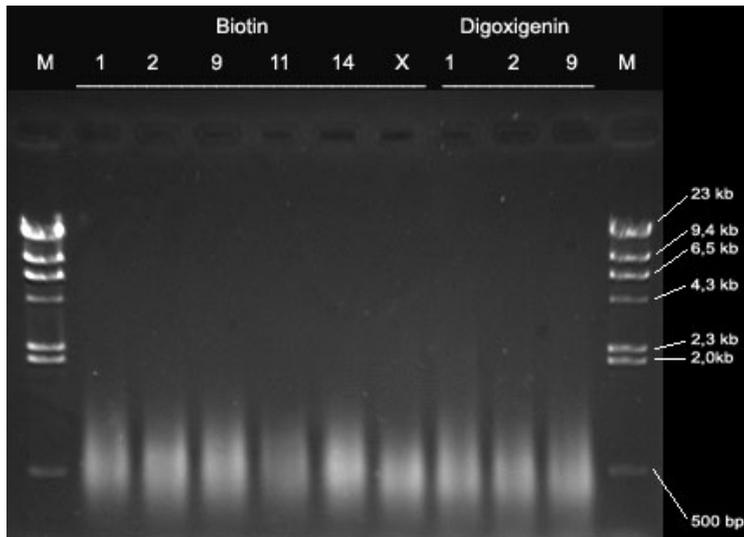


Abbildung 11: Label-PCR mit Chromosomen-Paints

Das Gelbild vom Lauf verschiedener Label-PCR-Produkte, deren DNA-Längenschwerpunkt jeweils unter 500 Bp liegt.

Im Anschluss an jede DOP-PCR wurde der DNA Gehalt und die richtige Länge mittels einer Gelelektrophorese nach Standardmethoden auf 1% Agarose überprüft. Als Längenstandard und Molekulargewichtsmarker wurde Hind III-verdaute λ -Phagen-DNA benutzt.

2.5.2. Herstellung der Hybridisierungsmixe

Eine Sonde für ein Chromosomen-Paint sollte die Konzentration 40-60 ng/ μ l DNA aufweisen (Solovei, 2001). Man kann auch auf Erfahrungswerte zurückgreifen, die mit den entsprechenden Chromosomen-Paint Sonden schon gemacht wurden.

Bei der Herstellung von Hybridisierungsmixen reduziert man das Volumen der DNA-Lösungen durch Fällung ein und löst die trockene DNA in einer Mischung aus Formamid, SSC und Dextransulfat. Die Verwendung von Chromosomen-Paints verlangt eine effektive Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen, da besonders repetitive Elemente (LINES, SINES, zentromerische und telomerische Sequenzen) auf allen Chromosomen gleichermaßen vorkommen. Diese Bereiche müssen durch einen Überschuss von zugegebener C_0t -DNA im Hybridisierungsmix schon gleich zu Beginn der Hybridisierung abgedeckt werden. C_0t -DNA ist eine Fraktion aus der gesamtgenomischen DNA und bekam ihren Namen aus der Reaktionskinetik. C_0t -DNA ist die DNA-Fraktion, die aufgrund der repetitiven Elemente am schnellsten reassoziert, wenn man aufgeschmolzene DNA wieder abkühlen lässt. Für die genaue Kinetik siehe (Knippers, 2001). Lachs-Testis-DNA wird als Trägesubstanz dazugegeben, damit die Chromosomen-Paint Sonde effektiver ausfällt. Bei der Hybridisierung spielt diese DNA aufgrund der starken Speziesunterschiede (Lachs-Maus) keine Rolle.

Material:	
Markierte Chromosomen DNA ~40-60 ng/ μ l	Vakuumentrifuge
Maus C_0t 1 DNA (1 μ g/ μ l)	deionisiertes Formamid (pH=7), Sigma-Aldrich, Deisenhofen, F-9037
Lachs-Testis-DNA (10 μ g/ μ l), Gibco BRL, 15632-011	Hybridisierungs-Mastermix: 20% Dextransulfat (Amersham Biosciences, Freiburg 17-0340-01) in 2x SSC
Ethanol 100% (Type 510)	beheizter Schüttler (~40°C)

Es wurden sechs Arten von Hybridisierungsmixen hergestellt:

Hybridisierungsmixe	Chromosomen-Paints	
MMU 1 / MMU 14	MMU 1-dig	MMU 14-bio
	MMU 1-bio	MMU 14-dig
MMU 2 / MMU 9	MMU 2-dig	MMU 9-bio
	MMU 2-bio	MMU 9-dig
MMU 11 / MMU X	MMU 11-dig	MMU X-bio
	MMU 11-bio	MMU X-dig

Tabelle 5: Kombination der Haptene in den Hybridisierungsmixen

Stoff	Menge
erster Chromosomen-Paint	10 µl
zweiter Chromosomen-Paint	10 µl
C ₀ t 1 DNA	70 µl
Lachs-Testis-DNA	5 µl
Summe:	95 µl
2,5 x Volumen Ethanol	240 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung der Hybridisierungsmixe

Sonden-Fällung:

- Gefällt wurden die DNA-Mischungen mit dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol. Nach mehrmaligem Invertieren kam das Röhrchen mit der DNA-Fällung für mindesten 30 min bei -20°C in den Gefrierschrank.
- Die DNA wurde bei 13000 rpm für 30 min abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen
- Das Pellet trocknete an der Luft oder schneller in einer Vakuumzentrifuge, bis kein Alkoholgeruch mehr wahrnehmbar war
- Zur trockenen DNA wurde zuerst 5 µl Formamid gegeben, der Lösungsvorgang wurde durch intensives Schütteln bei 40°C unterstützt. Wenn man kein Pellet mehr erkennen konnte (nach mindestens einer Stunde, evtl. auch über Nacht), kam noch 5 µl Dextransulfat zur Formamid-DNA-Lösung.

2.5.3. Hybridisierung auf Metaphasepräparaten (2D FISH):

Das Hybridisieren von Chromosomen Paint -Sonden auf Metaphasen diente der Kontrolle. Es sollten die richtigen Chromosomen einheitlich angefärbt ein und keine Kreuzhybridisierungen auftreten. Des weiteren konnte man auch die Chromosomen zählen und so zumindest den Karyotyp auf die richtige Chromosomenanzahl hin überprüfen.

- Vor der Hybridisierung wurde am Phasenkontrastmikroskop ein Areal ausgewählt, auf dem man Metaphasen erkennen konnte. Die Markierung erfolgte mit einem Diamantstift auf der Rückseite des Objektträgers
- Der Hybridisierungsmix wurde für 5 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert, danach auf Eis gestellt
- Falls noch nicht geschehen, wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe 70%, 90% und 100% dehydriert und danach luftgetrocknet

- 3 µl des denaturierten Hybridisierungsmixes (Sonde) wurden auf das markierte Areal pipettiert und mit einem kleinen Deckglas (z.B. 12 x 12 mm) abgedeckt. Rundherum wurde mit Fixogum abgedichtet. Sobald das Fixogum getrocknet war, wurde das Präparat auf einem 75°C Heizblock 2 min denaturiert.
- Die Präparate wurden für mindestens 1 über Nacht bei 37°C in einer Metallbox im Wasserbad hybridisiert

2.5.4. Hybridisierung auf Zellpräparaten (3D FISH):

Material:	
Wasserbad (80°C)	Heizblock (75°C)
Fixogum	Metallbox

- Der Hybridisierungsmix wurde für 5 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert, danach auf Eis gestellt
- Die Zellpräparate bleiben bis zum Ansatz der Hybridisierung in ihrem Aufbewahrungsmedium (50% FA in 2 x SSC).
- 3 - 6 µl des denaturierten Hybridisierungsmixes (Sonde) wurden auf ein Deckglas angemessener Größe pipettiert (12x12, 15x15 oder 18x18 mm). Das Deckglas mit den Zellen wurde mit einer Pinzette herausgenommen und an einem Papiertuch abgetropft. Anschließend wurde es mit den Zellen nach unten auf das kleine Deckglas mit der Sonde gelegt. Nach vorsichtigem Umdrehen wurde mit Fixogum abgedichtet. Sobald das Fixogum getrocknet war, wurde das Präparat auf einem 75°C Heizblock 3,5 min denaturiert
- Die Präparate wurden für mindestens 2 Tage bei 37°C in einer Metallbox im Wasserbad hybridisiert

Die Hybridisierungen mit drei verschiedenen Chromosomenpaar-Kombinationen wurden auf den vier ausgewählten Zelltypen ausgeführt und anschließend auf dem Leica TCS 4D gescannt. Die Makrophagen-Präparate für MMU 11 und X wurden von A. Brero an einem Zeiss LSM 410 aufgenommen. Um einen möglichen Einfluss der Haptene auf die Lokalisation der Chromosomenterritorien auszuschließen, wurden die Chromosomen-Paints für zwei Experimente jeweils wechselseitig markiert. So war einmal das Chromosom 1 mit Digoxigenin und einmal mit Biotin markiert. Die Nachweismethoden wurden nicht verändert. So wurde Digoxigenin immer mit Cy3-Antikörpern und mit Biotin markierte Sonden immer mit Alexa488/FITC-Antikörpern nachgewiesen. Da im Lauf der Versuche kein maßgeblicher Einfluss der Markierungsarten auf die 3D-RRD Auswertung nachgewiesen werden konnte, wurde bei den schwierig zu identifizierenden Makrophagen auf eine wechselseitige Anlage des Experiments verzichtet.

Zelltyp	Chromosomen-Kombination	Hapten-Kombinationen		Aufgenommene Kerne	3D-RRD Auswertung
Lymphozyten S-Phase	MMU 1 & 14	1-dig	14-bio	39	69
		1-bio	14-dig	31	
	MMU 2 & 9	2-dig	9-bio	18	31
		2-bio	9-dig	15	
	MMU 11 & X	11-dig	X-bio	24	42
		11-bio	X-dig	22	
Fibroblasten	MMU 1 & 14	1-dig	14-bio	24	52
		1-bio	14-dig	30	
	MMU 2 & 9	2-dig	9-bio	20	39
		2-bio	9-dig	31	
	MMU 11 & X	11-dig	X-bio	16	33
		11-bio	X-dig	17	
ES-Zellen	MMU 1 & 14	1-dig	14-bio	15	29
		1-bio	14-dig	15	
	MMU 2 & 9	2-dig	9-bio	16	31
		2-bio	9-dig	16	
	MMU 11 & X	11-dig	X-bio	15	29
		11-bio	X-dig	14	
Makrophagen	MMU 1 & 14	1-dig	14-bio	---	17
		1-bio	14-dig	20	
	MMU 2 & 9	2-dig	9-bio	---	15
		2-bio	9-dig	18	
	MMU 11 & X*	11-dig	X-bio	31*	31*
		11-bio	X-dig	---	
Summen				447	417

Tabelle 7: Detaillierte Darstellung der einzelnen Kernserien, es sind auch die Werte für die Experimentserien angegeben, bei denen die Haptene gewechselt wurden. Die prozentuale Anzahl der ausgewerteten Kerne (417) beträgt 93% der aufgenommenen Bildstapel (447). Die Bilder der Hybridisierung von MMU 11 und X auf Makrophagen stammen von A. Brero und sind mit einem Stern gekennzeichnet (*)

2.5.5. Detektion der FISH-Signale:

FISH auf Metaphasen wird genauso detektiert wie FISH auf 3D-Zellpräparaten, nur genügt meist eine Lage Antikörper. Da viel mehr 3D Präparate angefertigt wurden, folgt hier die Beschreibung für die Detektion der 3D-FISH-Signale.

Die ersten Waschschrte dienen im Allgemeinen der Entfernung des Deckglases und überschüssigen Hybridisierungsmixes, die folgenden stringenten Waschschrte mit heißem SSC entfernen unspezifisch gebundene DNA-Sonden von der Probe. Das Blocken mit BSA dient der Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper und vergrößert das Verhältnis der Signale im Vergleich zum Hintergrund. Zuerst wurde das FISH-Signal nachgewiesen, dann nach einem Umpufferschritt das BrdU-Signal. Alle Antikörperinkubationen und Waschschrte sollten unter Lichtausschluss durchgeführt werden. Zum Schluss

erfolgte die Kerngegenfärbung mit TO-PRO-3, das Einbetten in Vectashield und das Verschließen der Präparate.

Material:	
Blocklösung (4% BSA in 4 x SSC) Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Blocklösung (4% BSA in 1x PBS) Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Streptavidin-Alexa488	FMC Rockland, Maine, USA
Maus- α -Digoxigenin-Cy3	Dianova, Hamburg
Avidin-Alexa488	Dianova, Hamburg
Kaninchen- α -Digoxigenin	Sigma Chemical Company, USA
Ziege- α -Avidin-FITC	Amersham-Pharmacia Biotech
Maus- α -BrdU	Becton Dickinson, San Jose
Ziege- α -Kaninchen-Cy3	Amersham-Pharmacia Biotech
RNase A (1% w/v, >300 U/ml),	Roche, Mannheim
DAPI (5 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TO-PRO-3 (1 mM)	Molecular probes, Leiden
Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA

Zusammensetzung für 2D-FISH	Antikörper (Verdünnung)
1. Antikörper	Streptavidin-Alexa488 (1:200)
2. Antikörper	Maus- α -Digoxigenin-Cy3 (1:100)

Zusammensetzung für 3D-FISH	Antikörper (Verdünnung)	Bemerkung
1. Antikörpermischung	Avidin-Alexa488 (1:200)	+ RNase (1:50)
	Kaninchen- α -Digoxigenin (1:500)	
2. Antikörpermischung	Ziege- α -Avidin-FITC (1:200)	+ RNase (1:50)
	Ziege- α -Kaninchen-Cy3 (1:500)	
Von 4 x SSC auf 1 x PBS umpuffern		
3. Antikörpermischung	Maus- α -BrdU	in 4% BSA in PBS verdünnt
4. Antikörpermischung	Ziege- α -Maus-AlexaFluor350	

- Das Deckglas (oder der Objektträger) wurde der Hybridisierungsbox entnommen und das Glas mit den Zellen (oder Metaphasen) in 2 x SSC (37°C) abgelöst und danach 3 mal für 5 min in 2 x SSC gewaschen
- 3 mal stringentes Waschen für je 5 min in mit 60°C heißem 0,1 x SSC
- In 4 x SSC wurden die Präparate kurz äquilibriert
- 20 min in Blocklösung inkubieren, danach wurde die erste Antikörperlösung aufgetragen und für 45 min in einer feuchten Kamme bei 37°C inkubiert
- 3 mal waschen mit 4 x SSC nach dem ersten und zweiten Antikörper

- Beim Übergang zur BrdU-Detektion musste der Puffer gewechselt werden, nach dem Waschen mit 4 x SSC wurde es durch PBS ersetzt und zweimal gewechselt, um alle Reste von SSC zu entfernen
- Die dritte und vierte Antikörperinkubation dauerten auch je 45 min und es wurde je 3 mal 5 min mit PBS gewaschen (alle Waschritte bei 37°)
- Am Ende des Nachweise standen für die 3D Zellpräparate noch eine 5 min. TO-PRO-3 DNA Gegenfärbung (in PBS), für die Metaphasenchromosomen eine 2 min. DAPI Gegenfärbung (in 4 x SSC)
- Nach dem Färben kurz mit PB bzw. SSC abspülen und einbetten in Vectashield auf einem Objektträger
- Nachdem Reste von Vectashield mit einem Tuch vorsichtig abgesaugt wurden, das Präparat mit Nagellack verschließen

2.6. Kombination von FISH mit Immunofluoreszenz

Die Identifikation von Makrophagen erfolgte unter anderem durch einen Nachweis des Oberflächenantigens Cd11b. Diese Antigen wäre nach einer FISH nicht zu detektieren, weil bei einer FISH das ganze Präparat zur DNA-Denaturierung erhitzt wird. Dabei können Antigenmoleküle oder auch fluoreszierende Proteine in ihrer Konformation so verändert oder zerstört werden, dass sie nicht mehr mit den entsprechenden Antikörpern reagieren oder keine Fluoreszenz mehr aufweisen. Um dies zu vermeiden, müssen die beiden Anfärbungen nacheinander erfolgen.

Die Verwendung von Deckgläsern mit einem winzigen eingezätzten Koordinatensystem ermöglichte es, einmal aufgenommene Zellen zweifelsfrei auf dem Deckglas wiederzufinden. So wurden die Makrophagen gleich nach der Fixierung mit Cd11b immunfluoreszenzgefärbt und am Mikroskop aufgenommen. Die Zellen wurden wie in 2.4.2 beschrieben gefärbt. Dann erfolgten die in 2.2.3 erläuterten Permeabilisierungsschritte, die 3D FISH Hybridisierung und die Detektion.

Es wurden am inversen Epifluoreszenzmikroskop immer jeweils zwei Aufnahmen von einem ganzen Feld auf dem geätzten Deckglas gemacht.

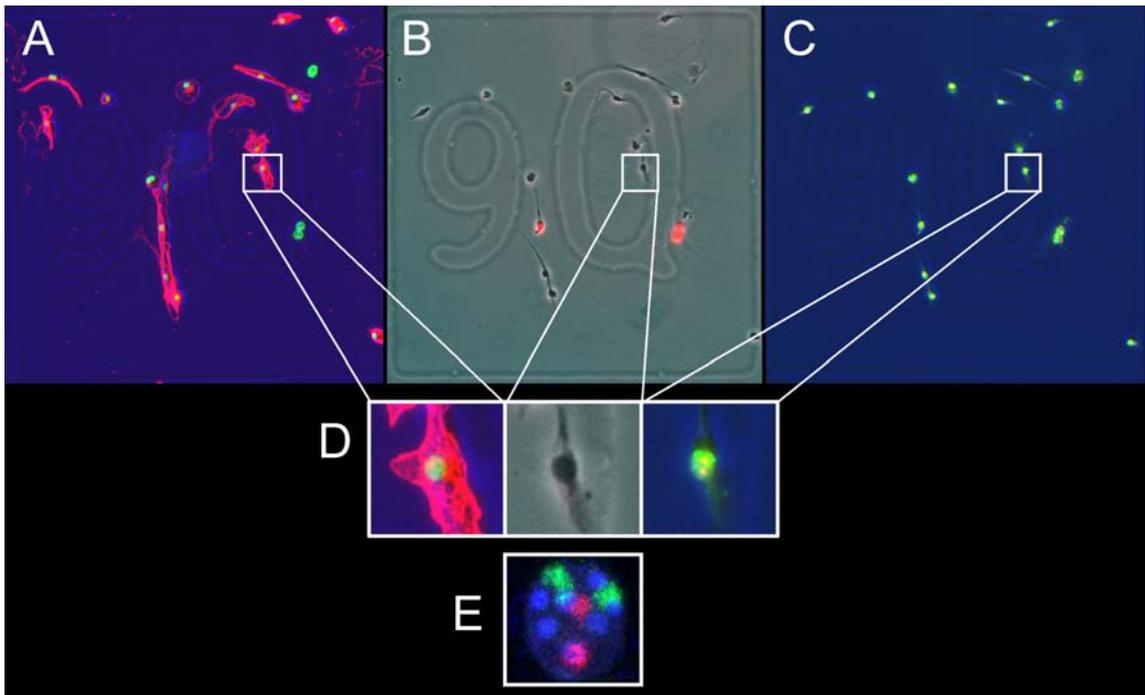


Abbildung 12: Die Aufnahmen der Immunofluoreszenz mit der FISH an Makrophagen, hier mit den Chromosomen-Paints für MMU 2 in grün (bio) und MMU 9 in rot (dig).

Die Weitfeld-Epifluoreszenzaufnahmen nach der Immunfluoreszenzfärbung bestanden aus:

- (A) Dem Cd11b-Nachweis mit Cy3 gekoppelten Antikörpern in rot.
- (A) Den GFP-Kerne der Makrophagen sind in Grün zu erkennen, da sie aus den EB5-Zellen differenziert sind. Als Negativ-Kontrolle sind auch grüne Zellkerne zu sehen, deren Cytoplasma nicht vom Cd11b-Antikörper angefärbt wurde.
- (A) Phasenkontrast-Durchlicht um das eingezügte Muster zu erkennen

Die Weitfeld-Epifluoreszenzaufnahmen nach der FISH bestanden aus:

- (B) Phasenkontrast-Durchlicht um das eingezügte Muster zu erkennen
- (B) Die BrdU Markierung in rot dargestellt (Alexa350 = Wellenlänge von DAPI) der noch zyklierenden Makrophagen.
- (C) Zwei Aufnahmen bei 470 bzw. 546 nm, um in Cy3 und FITC die Hybridisierung der Chromosomen-Paints sichtbar zu machen

Danach wurden die Zellkerne zum Scannen der Chromosomen-Paints ausgewählt. Es wurden Makrophagen ausgesucht, die eine starke Cd11b Färbung zeigten und keine BrdU-Signale (D). An einem Bildschirm wurden die aufgenommenen Fluoreszenzbilder nebeneinandergelegt, richtig zueinander orientiert und das entsprechende Feld auf dem FISH-Präparat am LSM im Durchlichtkanal angefahren. Wenn der entsprechende Kern (E) gefunden war, erfolgte die Kontrolle der FISH in den Fluoreszenzkanälen, anschließend wurde der Kern gescannt.

2.7. Vergleich von Markierungs- und Nachweismethoden

Mit diesem komplett unabhängigen Experiment wurde überprüft, inwieweit die Markierung der Chromosomen-Paints (mit Digoxigenin oder Biotin) und der Nachweismethoden (mit Cy3 oder FITC-Antikörpern) Einfluss auf die Intensität der Signale haben und damit auf die Ergebnisse der 3D-RRD –Auswertung und des Objektzählprogramms OC-2. Dazu wurden menschliche Fibroblasten verwendet, in deren Zellkerne die zwei Chromosomen-Paint-Sonden für HSA 18 und 19 hybridisiert wurden. Die Paints für HSA 18 und 19 wurden durch DOP-PCR jeweils mit Digoxigenin und mit Biotin markiert. Aus den vier markierten Chromosomensonden wurden zwei Hybridisierungsmixe hergestellt, die auf je zwei Areale auf die Fibroblasten hybridisiert wurden. Zur Übersicht ist der Versuchsaufbau in Tabelle 8 und die Zusammensetzung der Hybridisierungsmixe in Tabelle 9 dargestellt. Die menschlichen Fibroblasten 46, XY wurden in der Kinderklinik der LMU München aus der Beschneidung männlicher Vorhaut gewonnen und lagerten bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff. Sie wurden in Vollmedium (DMEM, 10% FCS, 100 µg/ml Pen/Strep) in einer 50 ml Kulturflasche mit 8 ml für 3 - 4 Tage im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die adhärent wachsenden Fibroblasten vom Flaschenboden abtrypsiniert, mit 30 – 40 ml Medium aufgenommen und wuchsen wieder 3 - 4 Tage in einer 250 ml Kulturflasche bis zur Konfluenz.

Für die Herstellung mikroskopischer Präparate erfolgte die Anzucht der Zellen direkt auf Deckgläsern definierter Dicke (Nummer 1 ½; 170 µm ±10). Sie wurden in sterile 35 mm Schalen gelegt und mit ca. 2 ml Vollmedium befüllt. In jede Schale wurden 2 ml der Zellsuspension aus einer konfluenten Kultur gegeben und bis zur gewünschten Zelldichte mehrere Tage inkubiert. Eine Stunde vor der Fixierung erhielten die Zellen noch eine Zugabe von BrdU ins Medium, wie in 2.2.3 beschrieben.

Material (zusätzliches zu dem in Abschnitt 2.5.5 aufgeführten)	
Avidin-Cy3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Schaf- α -Digoxigenin-FITC	Diananova, Hamburg
Kaninchen- α -Ziege-FITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Ausgangsmaterial	Markierung	Hybridisierungsmix		3D-FISH	Versuch Nr.
HSA 18	18-bio	A	18bio/19dig	Auf vier Areale humaner Fibroblasten	1A
	18-dig				2A
HSA 19	19-bio	B	18dig/19-bio		3B
	19-dig				4B

Tabelle 8: Versuchsaufbau der Testhybridisierungen auf humanen Fibroblasten

Nach einem ersten Test der Chromosomen-Paints auf menschlichen Metaphasechromosomen wurde ein schwächeres Signal bei 18-dig beobachtet (siehe Abbildung 13 a).

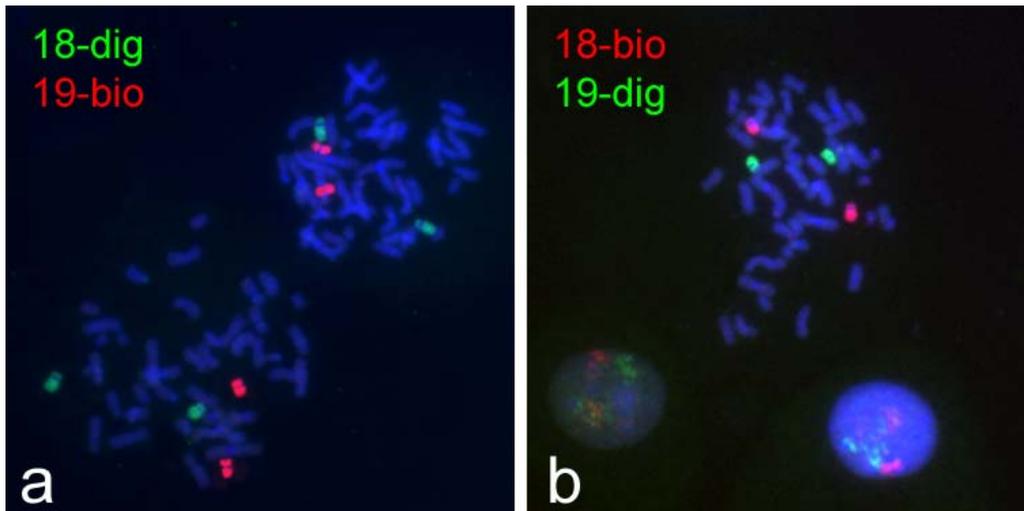


Abbildung 13: Der Test der Hybridisierungsmixe auf menschlichen Metaphasechromosomen. In a und b wurden die Paints für HSA 18 und 19 mit der ersten Lage Antikörper Schaf- α -Digoxigenin und Avidin-Cy3 nachgewiesen, als zweite Lage fand Kaninchen- α -Ziege-FITC zur Verstärkung Anwendung. In a ergibt 18-dig ein schwächeres Signal als 18-bio in b.

So wurde beschlossen, 50% mehr DNA-Sonde von 18-dig zum entsprechenden Hybridisierungsmix B für den Test auf 3D fixierten Fibroblasten zugeben, wie in Tabelle 9 aufgeführt ist.

Hybridisierungsmix	Haptenkombination	Menge		
A	18-bio: 30 μ l	10 ml humane C ₀ t-DNA	1 μ l Lachs-Testis-DNA	177 μ l Ethanol
	19-dig: 30 μ l			
B	18-dig: 45 μ l	10 ml humane C ₀ t-DNA	1 μ l Lachs-Testis-DNA	245 μ l Ethanol
	19-bio: 30 μ l			

Tabelle 9: Die Zusammensetzung der Hybridisierungsmixe A und B

Auf ein Deckglas von 12 x 12 mm wurden 3 μ l Hybridisierungsmix (5 min auf 80°C vordenaturiert) gegeben und auf den Zellpräparaten fixiert. Die Denaturierung der Zellkern-DNA erfolgte bei 75°C für 2 min. Nach vier Tagen Inkubation bei 37°C erfolgte die Detektion mit Antikörpern. Zur Übersicht der Antikörpernachweise siehe Tabelle 10.

Nr.	Nachweis	1. Antikörperlage	2. Antikörperlage	3. AK	4. AK
1A	18bio: FITC	Avidin-Alexa488 Kaninchen- α -dig	Ziege- α -Avidin-FITC Ziege- α -Ka.-Cy3	Maus- α -BrdU	Ziege- α -Maus-Alexa350
	19dig: Cy3				
3B	18dig: Cy3				
	19bio: FITC				
2A	18bio: Cy3	Avidin-Cy3 Schaf- α -dig-FITC	Kanin.- α -Schaf-FITC		
	19dig: FITC				
4B	18dig: FITC				
	19bio: Cy3				

Tabelle 10: Schema der Antikörperdetektion bei humanen Fibroblasten

Durch die Versuchsanordnung selbst sollten Unregelmäßigkeiten vermieden werden, um die Ergebnisse untereinander perfekt vergleichbar zu machen:

- Die Chromosomen-Paints HSA 18/19 wurden simultan mit DOP-PCR markiert.
- Die markierten Proben wurden erfolgreich auf Metaphasen getestet.
- Die Zellen entstammen einer Zellkulturflasche und wurden simultan fixiert und permeabilisiert.
- Die Proben wurden für die gleiche Zeit auf dem gleichen Heizblock denaturiert.
- Die Detektion erfolgte mit den selben Reagenzien und den gleichen Inkubationsschritten.

Von jedem Präparat wurden mindestens 15 BrdU positive Kerne mit dem Leica TCS 4D gescannt (insgesamt 66 Kerne) und mit dem Programm zur radialen Verteilung 3D RRD und dem Objektzählprogramm OC-2, wie in 2.10.4 beschrieben, ausgewertet.

2.8. Mikroskopie

2.8.1. Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop

Zur Betrachtung von Zellen in Zellkultur wurde das Phasenkontrastmikroskop *Axiovert 25C* von Zeiss verwendet. Dieses ist mit folgenden Objektiven ausgestattet:

Bezeichnung	Vergrößerung	Numerische Apertur	Phasenkontrast
CP Achromat	5 ×	0,12	-
CP Achromat	10 ×	0,25	Ph1
LD Achrostigmat	20 ×	0,3	Ph1
Achrostigmat	40 ×	0,55	Ph2

Tabelle 11: Objektive des Phasenkontrastmikroskop *Axiovert 25C* von Zeiss

2.8.2. Epifluoreszenzmikroskop Axiophot 2

Das grundlegende Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist es, durch die unterschiedlichen Wellenlängen des Anregungs- und Emissionslichts eine Trennung des Lichts zu erreichen. Ein Anregungsfilter reduziert das von einer Quecksilberdampfampe erzeugte Licht auf eine geringe Spektrumbreite.

Der dichromatische Strahlteiler (*beamsplitter*) ist ein spezieller Filter, der nur das vom Objekt zurückgestrahlte längerwellige Licht passieren lässt, die Anregungswellenlängen jedoch spiegelt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenanordnungen hat jedes Fluorochrom ein charakteristisches Spektrum seiner Anregung und Emission. Durch den Emissionsfilter gelangen nur ausgewählte Emissionswellenlängen zum Auge oder zur CCD-Kamera. Die Auswahl und Kombination des Anregungsfilter, des Emissionsfilters und des dichromatischen Strahlenteilers hat bedeutenden Anteil an den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Epifluoreszenzmikroskop *Axiophot 2* von Zeiss verwendet. Die Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera aufgenommen (*Coolview Camera System*) die von einem daran angeschlossenen Computer mit der Software *Cytovision* von *Applied Imaging* gesteuert wurde. Die einzelnen Fluorochromsignale wurden dabei getrennt aufgenommen und als Pixel mit definiertem Grauwert dargestellt. Durch spätere individuelle Farb-

zuordnung und Überlagerung der Einzelbilder in *Adobe Photoshop* oder der Freeware *ImageJ* kann schließlich ein farbiges Gesamtbild erzeugt werden. Das Epifluoreszenzmikroskop wurde benutzt um Metaphasepräparate von ES-Zellen aufzunehmen, die Lage und Qualität der Chromosomen-Paints darauf zu beurteilen und Antikörperdetektionen zu begutachten. Ferner wurde das Ergebnis von 3D-FISH auf allen Zelltypen kontrolliert bzw. überprüft, ob die Signale der DNA-Sonden intensiv genug sind, um die Zellen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop zu scannen. Für eine detailliertere Beschreibung der Fluoreszenzmikroskopie siehe (Abramowitz, 1993)

Fluorochrom	Farbe des Anregungslichtes	Anregungs-Maximum (nm)	Farbe des emittierten Lichtes	Emissions-Maximum (nm)	Anregungsfilter (1) Strahlenteiler (2) Emissionsfilter (3)		
					1	2	3
Alexa350	ultraviolett	346	Blau	450	BP365	FT395	LP450-490
DAPI	ultraviolett	355	Blau	450	BP365	FT395	LP450-490
FITC	Blau	492	Grün	520	BP450-490	FT510	LP515-565
Cy3	Grün	550	Orange	570	BP546	FT580	LP590
Cy5	Orange	649	Dunkelrot	670	BP575-625	FT645	BP660-710

Tabelle 12: Fluoreszenzmikroskopie: Verwendete Fluorochrome, Filtersätze und Strahlenteiler des Epifluoreszenzmikroskops Axiophot 2

Für Aufnahmen wurden die folgenden Objektive verwendet:

Objektivklasse	Vergrößerung	Numerische Apertur	Phasenkontrast
Plan-Apochromat	63 × Oil	1,4	Ph3
Plan-Neofluar	100 × Oil	1,3	Ph3

Tabelle 13: Fluoreszenzmikroskopie: Objektivklassen und Filtersätze des Epifluoreszenzmikroskops Axiophot

2.8.3. Inverses Fluoreszenzmikroskop

Auch ein inverses Epifluoreszenzmikroskop wurde verwendet. Es diente der Aufnahme der Makrophagen auf den geätzten Deckgläsern. Das Mikroskop von Visitron basiert auf einem inversen Zeiss-Axiovert 200M und einer CCD Kamera „Spot RT SE“ von Diagnostic Instruments. Das Mikroskop besitzt einen motorisierten xy-Tisch und die Bildaufnahme erfolgt mit der Software „Metamorph“ der Firma Universal Imaging Corporation.

Filter	Anregungsfilter (nm)	Dichromatischer Strahlenteiler	Emmissionsfilter (nm)
DAPI/Alexa350	360±40	400DCLP	470±40
FITC	470±40	Q497LP	522±40
Cy3	546±11	Q557LP	567±15
Cy5	622±36	Q647LP	667±30

Tabelle 14: Verwendete Fluorochrome, Filtersätze und Strahlenteiler des inversen Fluoreszenzmikroskops von Visitron

2.8.4. Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)

Ein konfokales LSM bietet, im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop die Möglichkeit der dreidimensionalen Analyse von Zellkernen. Dabei können Bilder in verschiedenen Fokusebenen erstellt werden. Durch sukzessives Verschieben der aufgenommenen Ebene in z-Richtung entstehen Bilderstapel (stacks), die in ihrer Gesamtheit das Objekt in seiner dreidimensionalen Ausdehnung repräsentieren.

Der Laserstrahl wird auf einen Punkt im Präparat fokussiert, wobei eine Lochblende (Pinhole), die brennpunktgleich (konfokal) zum fokussierten Lichtstrahl angebracht ist, das Streulicht ober- und unterhalb der Fokusebene bestmöglich ausschließt. Die Fluoreszenzsignale bzw. Bildpunkte aus einer Brennebene werden von einem Photomultiplier erfasst, möglichst ohne dass Streulicht aus der Tiefe des Präparats den Kontrast verschlechtert.

Für diese Arbeit wurde das Mikroskop *True Confocal Scanner TCS 4D* von *Leica Microsystems* verwendet. Dieses ist mit einem Krypton-Argon-Laser ausgerüstet, der bei Wellenlängen von 488 nm, 568 nm oder 647 nm die einzelnen Fluorochrome anregt.

Fluorochrom	Laser wellenlänge	1. Strahlteiler	2. Strahlteiler	Filter vor Detektor
FITC	488 nm	TRIPLE	RSP580	BP-FITC
Cy3	568 nm	TRIPLE	RSP580	BP-TRITC
TO-PRO-3	647 nm	TRIPLE	RSP580	RG665

Tabelle 15: Wellenlängen und Filtereinstellungen im TCS 4D

Der Scannvorgang kann in jedem Kanal beliebig oft wiederholt werden (Average), wodurch das elektronische Hintergrundrauschen gemindert wird. Die FISH-Signale von den Chromosomen-Paints und die Gegenfärbung mit TO-PRO-3 wurden mit einem Average-Wert von 4 aufgenommen. Dies stellt einen guten Kompromiss zwischen Bildqualität und Ausbleichen der Präparate dar.

Es wurden 8-Bit-Bilder aufgenommen. Jeder Farbkanal wird dabei einzeln aufgenommen und abgespeichert. Für die Aufnahmen am Leica TCS 4D wurden immer die in Tabelle 16 angegebenen Werte eingestellt. Eine genaue Anleitung für das TCS 4D findet man beim Zusatzmaterial.

Parameter	Einstellung
Bildgröße	256 × 256
Objektiv	Plan-Apochromat 100 × Oil/ 1.4
Pinhole	100
Pixelgröße X/Y	80 nm
Z-Abstand der einzelnen Schnitte	240 nm
Kantenlänge des Bildes (= Zoom)	20,48 µm (Zoom = 21)

Tabelle 16: Einstellungen am TCS 4D von Leica Microsystems

2.9. Bildverarbeitung

2.9.1. Datenorganisation

Die Rohbilder vom Leica TSC 4D mussten nach der Übertragung erst umbenannt werden. Die Nummerierung musste so geändert werden, dass die Bilder in der richtigen Reihenfolge geöffnet werden konnten. Dazu diente das kleine Programm „rentcs4d“ (siehe Zusatzmaterial), das jedem Bild eine dreistellige Nummern anfügte, die mit 000, 001, 002, usw. begannen.

2.9.2. Datenaufarbeitung

Der Datenordner auf der Festplatte des konfokalen Mikroskops enthielt nur die einzelnen Bilder mit den Farbkürzeln am Ende des Dateinamens. b, g, r standen für Blau (TO-PRO-3 = Gegenfärbung), Grün (FITC = das mit Biotin nachgewiesene Chromosom) und Rot (Cy3 = das mit Digoxigenin nachgewiesene Chromosom). Es wurden Ordner (z.B.: Mly1bio14dig_01) für die einzelnen Kerne und darin Unterordner (b, g, r) für die einzelnen Farbkanäle angelegt und die Bilder darin einsortiert. Ein Plug-In für ImageJ ermöglichte es mit geringem Aufwand aus einem Kernordner jeweils einen RGB Bildstapel (stack) und eine Projektion (nach dem Parameter: maximale Intensität) herzustellen. (Plug-In „open_z_project_RGBstack.java“, siehe Zusatzmaterial) Die einzelnen neuen Bilder wurden in separaten Ordnern „Stacks“ und „Projektionen“ zusammengefasst. Die Stacks sind Ausgangsmaterial für die Radiale Auswertung und die Winkel- und Abstandsberechnungen. Die Projektionen dienen der Überprüfung und der Ansicht.

2.9.3. Shift-Korrektur

Eine Shift-Korrektur in z wurde für die Winkelmessungen angewendet. Bei Winkel- und Abstandsmessungen kann eine vertikale Verschiebung von einem optischen Schnitt schon einen messbaren Unterschied verursachen.

Um den chromatischen Shift zu bestimmen, wurden 500 nm große Beads (Tetraspeck Microspheres von Molecular Probes, T-7281) aufgenommen. Diese leuchten in 4 Farbkanälen (blau (360/440 nm); grün (505/515 nm); orange (540/560 nm); dunkelrot (633/660 nm)). Die Beads wurden mit den vorhandenen 3 Farbkanälen mit dem 100 x Objektiv aufgenommen.

Der z-Abstand betrug dabei 100 nm, die Pixelgröße war 80 nm. Die Auswertungssoftware war ImageJ mit dem Plug-In „Sync Measure 3D“ von Jochim Walter.

Vorgehensweise:

- Das Plug-In „Sync Measure 3D“ öffnen (Analyze>Tools>Sync Measure 3D)
- Den Bildstapel eines jeden Farbkanals öffnen und synchronisieren mit *Synchronize All*
- Messungen beginnen mit Start Measurements
- Für jedes Bild einen geeigneten Schwellenwert festsetzen.
- Mit dem Rechteckwerkzeug (ROI = region of interest) ein bead einrahmen, so dass alle anderen ausgeschlossen sind.
- Durch gleichzeitiges Halten der Leertaste und Klicken mit der linken Maustaste wird in der ROI die Messung gestartet.
- Das Plug-In berechnet neben den xyz-Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte (Gravity Center) auch das Volumen, die Intensität und den Abstand zu den Bildstapeln der anderen Farbkanäle. Für die Shift-Korrektur werden nur die

xyz-Koordinaten der Gravity-Center benötigt. Wird keine bestimmte Skalierung der Bilder unter Analyse >Set Scale festgelegt so werden die Werte in Pixel berechnet.

- So wird mit möglichst vielen Beads auf dem Bild verfahren.
- Alle Werte der Beads aus einem Bild werden in eine Exceltabelle kopiert und dort in nm entsprechend der xy-Pixelgröße und des z-Abstandes umgerechnet und daraus werden die Mittelwerte bestimmt.

Es wurden an zwei Aufnahmen die Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte von je 10 Beads in Pixel mit dem Plug-In Sync-Measure-3D gemessen. Diese wurden gemittelt und entsprechend den Scannparametern in nm umgerechnet. Der FITC-Kanal dient als Bezugspunkt und enthält die Koordinaten (0,0,0). Damit werden die Koordinaten des Cy3 und TO-PRO-3 Kanals normalisiert.

Abweichung in nm	FITC	Cy3	TO-PRO-3
x-Koordinate	0	26	31
y-Koordinate	0	20	36
z-Koordinate	0	278	328

Tabelle 17: Shift-Korrektur: 3D-Koordinaten in den drei Farben der gemittelten Intensitätsschwerpunkte eines Punktsignals in nm.

Die Abstände in x- und y-Richtung von Cy3 oder TO-PRO-3 zu FITC sind bei einer Pixelgröße von 80 nm geringer als $\frac{1}{2}$ Pixel. Hier ist keine Shift-Korrektur möglich und auch nicht nötig. Die Signale im Cy3 und TO-PRO-3 Kanal sind gegenüber dem FITC-Kanal 278 nm bzw. 328 nm nach hinten verschoben. Sie tauchen später auf als das FITC-Signal. Um eine möglichst gute Übereinstimmung der Kanäle zu erreichen, wird bei einer z-Schnittdicke von 240 nm jeweils das erste Bild des Cy3- und TO-PRO-3-Stapels und das letzte Bild des FITC-Stapels in ImageJ gelöscht (siehe Abbildung 14).

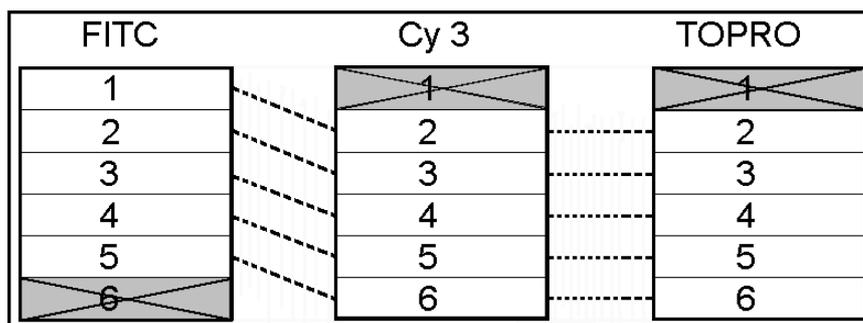


Abbildung 14:
z-Shift-Korrektur bei den drei Farbkanälen eines Bildstapels (grau unterlegte Bilder sind zu löschen)

2.10. Quantitative Auswerteverfahren

2.10.1. 3D-RRD: Radiale Verteilung von Chromosomenterritorien

Die relative radiale Verteilung der Chromosomenterritorien wurde mit der Software 3D-RRD (three dimensional relative radial distribution) berechnet, die von J. von Hase aus der Gruppe von C. Cremer (Kirchhoff-Institut für Physik, Universität Heidelberg) entwickelt wurde. Das Programm errechnet die relative Verteilung von segmentierten Objekten (in diesem Fall Chromosomenterritorien; CTs) in einem Zellkern (Radius = 1), ausgehend vom Mittelpunkt des Zellkerns.

Das Programm ist in C++ verfasst und läuft eingebettet in die Khoros-Umgebung auf normalen PCs mit dem Betriebssystem Linux. Details zur Arbeitsweise des Programms 3D-RRD kann man aus den Dissertationen von J. von Hase (von Hase, 2002), A. Brero (Brero, 2004) und den Artikeln (Cremer et al., 2001) und (Cremer et al., 2003) entnehmen. Auf der beigelegten CD finden sich die beiden letztgenannten Artikel mit der detaillierten Beschreibung.

Hier wird der handwerkliche Weg von den Bildern bis zu den Verteilungskurven beschrieben: In ImageJ die (wie in 2.9.2 beschrieben) automatisch erzeugten Stacks öffnen, mit „RGB Split“ unter >Image >Color >RGB Split wieder in drei Einzelstacks zerlegen lassen und an anderen Stelle mit neuer Namensgebung abspeichern. Die Bildstapel einer Serie von Bildern sollten einen gleichen, einfachen Namen tragen, z.B. stack. Die Endung besteht aus der individuellen Kernnummer und dem mit Bindestrich angeschlossenen Endkürzel, das den Farbkanal bezeichnet.

- 1 stand für Farbkanal 1, das größere Chromosom (1, 2, X) bezeichnend
- 2 stand für Farbkanal 2, das kleinere Chromosom (14, 9, 11) bezeichnend
- 3 stand für Farbkanal 3, die DNA-Gegenfärbung bezeichnend

Beispiel für Kern 1: stack1-1.tif
stack1-2.tif
stack1-3.tif

Wenn in einem Bild starke Hintergrundsignale oder Teile von anderen Kernen auftauchen, die nicht ausgewertet werden können, so muss man die Bilder bearbeiten, in dem man die Stacks erst normalisiert (ImageJ >Plug-In >Stacks >Stack Normalizer) und dann die störenden Teile entfernt. Die fertigen Bilder sollten dann auf die Festplatte des Rechners übertragen werden, mit dem die 3D-RRD Berechnungen durchgeführt werden.

Im Betriebssystem Linux neuen Ordner anlegen und die Skripte: 3dthresh.sh, 3dshells.sh, start.sh, final.sh hineinkopieren. Ein erste Schritt mit 3dthresh.sh dient der Bestimmung der sog. V-Werte (Verhältnis von hellen und dunklen Pixel im Bild), die wie ein Schwellwert über die Größe der zu segmentierenden Signale entscheiden. 3dthresh.sh mit kwrite öffnen, den Pfad für die Daten anpassen, Nummern der aufzurufenden Zellkerne richtig eingeben (entweder einzeln, 1, 2, 3, 4, 5, oder als Sequenz `seq 1 5`) und speichern.

In einer neuen shell ./3dthresh.sh ausführen und die V-Werte den Anweisungen folgend für alle Zellen bestimmen. Die V-Werte notieren und Zellen mit gleichen V-Werten ermitteln. Für jede Kombination ein eigenes 3dshells.sh erstellen (wie 3dthresh.sh, bloß dass nun richtige V-Werte eingetragen werden und die entsprechenden Kernnummern). Diese 3dshells durchnummerieren, z.B. 3dshells01.sh, 3dshells02.sh, 3dshells03.sh und speichern. In eine neue Shell sind alle Versionen von 3dshells untereinander einzutragen. Darunter 3dfinal.sh einfügen, (fasst die Einzelergebnisse zusammen) und als Startshell mit eigenem Namen abspeichern. Alle 3dshells und das 3dfinal ausführbar machen: Im Konqueror die Dateien markieren, rechte Maustaste drücken >Eigenschaften >Berechtigung alles zulassen. Neue shell öffnen) und die Zeile ./Start...sh >Ergebnisse...txt eingeben. So werden alle ausgegebenen Meldungen als Textdatei in eine eigene Datei geschrieben, so dass man Fehler in der Berechnung leichter lokalisieren kann. Mit der Eingabetaste Enter startet die Berechnung.

Alle erhaltenen Daten im Konqueror wieder in einen neuen Ordner der Kernserie kopieren. Das Shellskript „./statistik_groesser_kleiner“ wird in jeden Ergebnisordner mit hinein kopiert. Es gibt die Medianwerte für die Territorien 1 und 2 aus und enthält auch die Angabe, in wie viel Kernen Terr1 interner ist als Terr2 und in wie viel Kernen KernenTerr1 peripherer ist als Terr2. Das Statistikprogramm kann auch statt die Mediane eines Territoriums die der Gegenfärbung angeben, wenn man die entsprechend Eingabe tätigt. Die genaue Anwendung des Statistikprogramms wird in 2.11.1 erklärt.

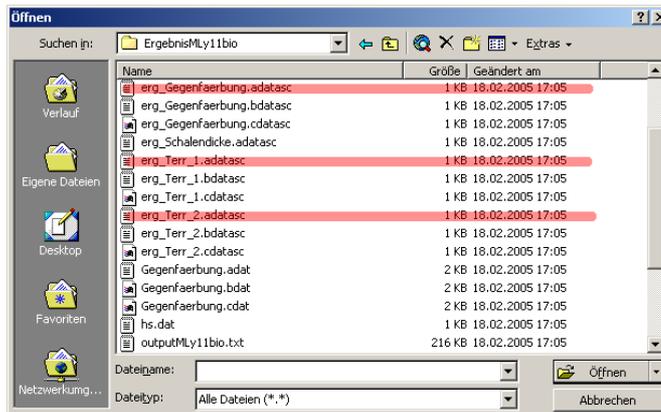


Abbildung 15: 3D-RRD Programmbedienung:

Der Ordner mit den Ergebnisdateien aus eine 3D-RRD Berechnung. Rot markiert sind die Datensätze, die für die Darstellung der Verteilungskurve benötigt werden.

Diese Ergebnisordner auf Linux beenden, unter Windows Ergebnisordner auf den PC holen. Excel starten, die entsprechenden Ergebnisse suchen (In Abbildung 15 rot markiert: `erg_Gegenfaerbung.adatasc`, `erg_Terr1.adatasc` und `erg_Terr2.adatasc`). Die vier Datenspalten enthalten immer als erstes die Schalen (2-98), als zweites die Werte, die dritte Spalte die Standardabweichung und die vierte den mittleren Fehler. Achtung! Da man später die Werte auf der x-Achse in Prozent angeben möchte, müssen alle 25 Werte in Excel zuerst mit 4 multipliziert werden.

2.10.2. 3D-RRD: Radiale Verteilung von Chromozentren

Eine weitere Anwendung der 3D-RRD Software bestand darin, nach einer Anpassung des Shellskripts damit auch die radiale Verteilung von Chromozentren zu untersuchen. In dieser Version werden nur zwei Kanäle berechnet, die mit ein und denselben Gegenfärbungsdaten für jeden Kern arbeiteten. Die Chromozentren wurden durch das Anlegen eines hohen V-Werts von den restlichen Signalen des Zellkerns freigestellt und gingen wie Chromosomenterritorien in die 3D-RRD Auswertung ein. Als Hintergrund und Kernbegrenzung dienten die gleichen TO-PRO-3 gefärbten Bilder, nur mit den V-Werten, die auch schon bei der 3D-RRD für CTs angewendet wurden.



Abbildung 16: Berechnung der radialen Verteilung der Chromozentren mit 3D-RRD.

Die Bilder zeigen links die Projektion der TO-PRO-3-Gegenfärbung eines Lymphozytenkerns, mittig

ein Einzelbild mit dem Schwellwert 22, stellvertretend für den segmentierten Kern und rechts mit dem Schwellwert 92 das gleiche Einzelbild, die hellen Chromozentren stehen nun frei.

Die komplette Ausgabewerte und die Rechenschritte während des Programmablauf werden in einem Textfile festgehalten und gespeichert. Eine Befehlszeile in Linux greift aus der Textdatei die immer wiederkehrende Zeile mit „die Gesamtzahl der Kernpixel beträgt...“ ab. Diese Werte sind die Ausgangsbasis zur Berechnung der Kernvolumen.

2.10.3. ADMT: Programm zur Winkel- und Abstandsberechnung

Zur Bestimmung der genauen Lage der Chromosomenterritorien zueinander werden die Bilddaten der Chromosomenverteilung mit dem Shellskript ADMT (**A**ngles **D**istance **M**easurement **T**ool) analysiert.

Am Anfang steht die Bestimmung des Zellkernmittelpunkts, der als ungewichtetes, einfaches geometrisches Zentrum aus den Daten der Kerngegenfärbung mit Hilfe eines festgelegten Schwellwerts errechnet wird. Dann werden die einzelnen Schwerpunkte der Chromosomenterritorien nach Intensität/Helligkeit gewichtet bestimmt, sogenannte „Gravity Center“. Aus den 3D-Koordinaten werden die genauen Distanzen zwischen den Chromosomenterritorien und dem Kernmittelpunkt errechnet. Auch die Abstände der Chromosomenterritorien untereinander werden gemessen, die sogenannten homologen und heterologen Abstände (Abbildung 17a). Aus den Kantenmaßen der Dreiecke, die von je zwei Chromosomenterritorien und dem Kernmittelpunkt aufgespannt werden, können die Winkel zwischen den Chromosomenterritorien mit Hilfe der trigonometrischen Formeln errechnet werden (Abbildung 17b). In einem Zellkern mit vier Chromosomenterritorien ergeben sich sechs Winkel, zwei Winkel zwischen homologen Chromosomenterritorien, sowie vier Winkel zwischen den nicht-homologen Chromosomen (z.B.: A1-B1, siehe auch Abbildung 51a). Die Berechnung erfolgt automatisiert mit dem Programm ADMT von Johann v. Hase, das von S. Dietzel optimiert wurde (Linux-Skript: siehe Zusatzmaterial). Die angewendeten mathematischen Grundlagen für die Winkelberechnungen werden in Abbildung 18 veranschaulicht.

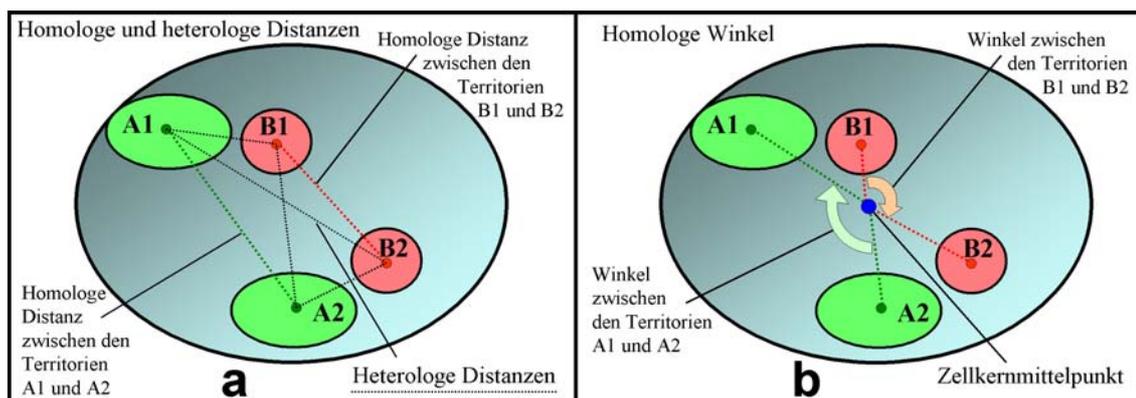


Abbildung 17: Prinzip der Winkelberechnung durch ADMT

a | Schema der Abstandsmessungen. Bestimmung der homologen und heterologen Distanzen aus den 3D-Koordinaten und der Territorienabstände zum Kernmittelpunkt.

b | Die homologen Winkel, die aus den Distanzwerten errechnet werden können.

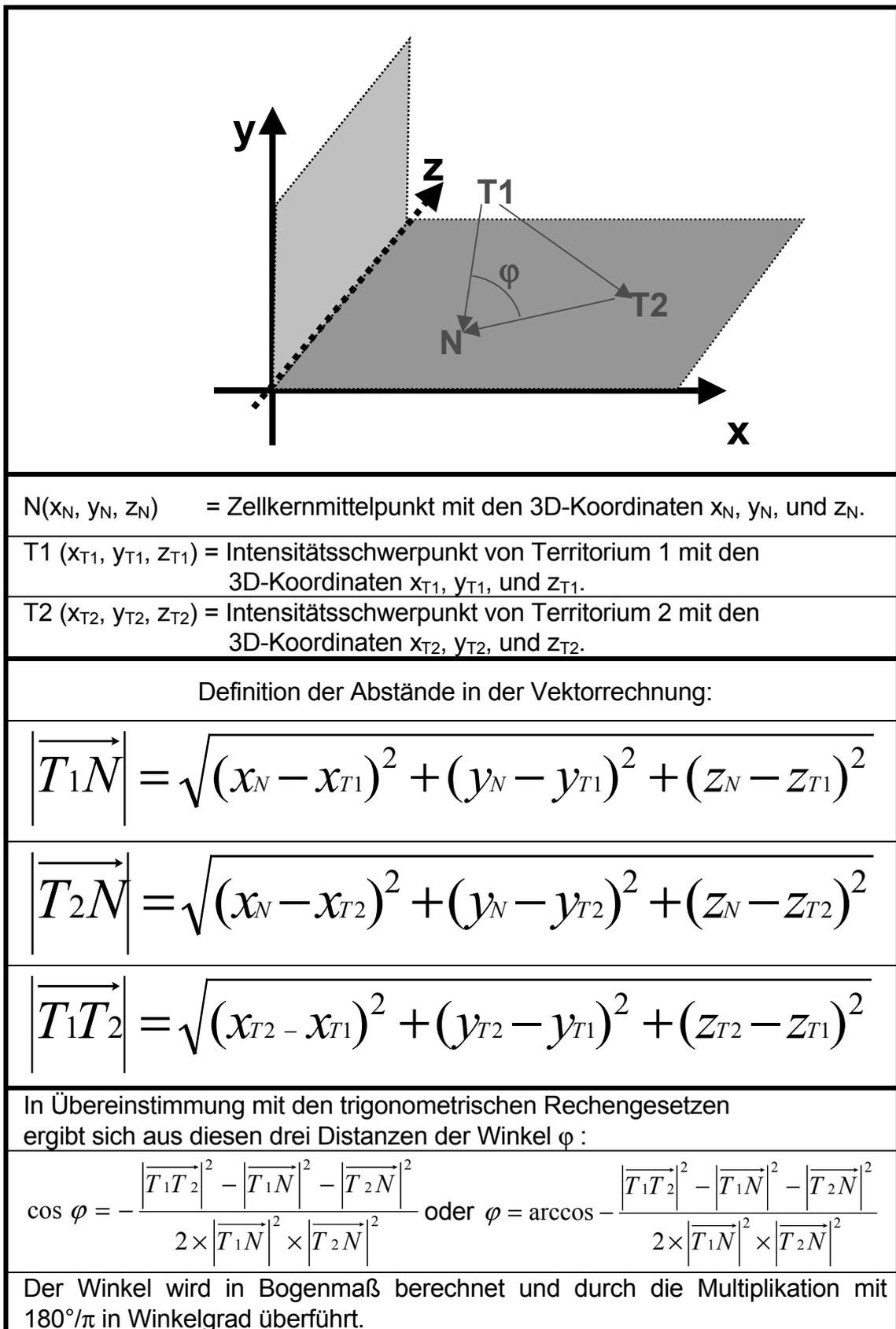


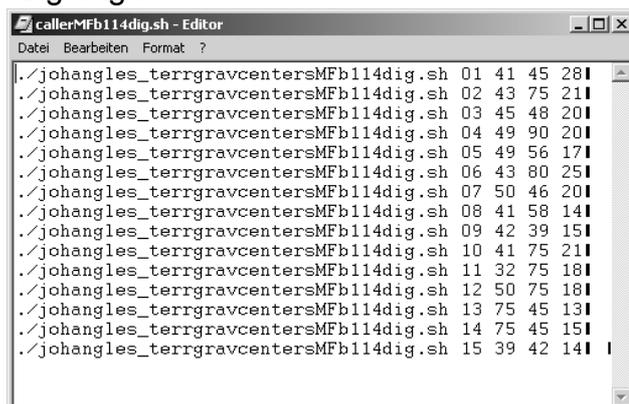
Abbildung 18: Winkelberechnung: Mathematische Grundlagen zur Bestimmung von Abständen und Winkeln aus 3D-Koordinaten von Intensitätsschwerpunkten (aus: A. Brero, 2005)

Vorbereitung der Stacks: In die Winkelmessungen flossen die gleichen Daten ein wie in die 3D-RRD Auswertungen. Zusätzlich wurde der Shift korrigiert und eine Kopie der Bilder zur Bestimmung der Schwellwerte gefiltert. Die Filtermatrix dafür findet sich im Zusatzmaterial (gauss_551_matrix.txt). Um Verwechslungen auszuschließen, ist es ratsam den gefilterten Bildern einen Namenszusatz zu geben. Dafür eignet sich auch gut ein Makro (Zusatzmaterial: z.B.: ConvolveES11Xbio_.java). Mit den gefilterten Bildern beginnt ähnlich wie bei 3D-RRD die Schwellwertbestimmung, nur dass nun diskrete Schwellwerte bestimmt werden, Werte zwischen 0 und 255. Dies ist nötig, um eng zusammenliegende Territorien besser trennen zu können, denn nur ein Voxel genügt, um eine Verbindung zwischen zwei Territorien herzustellen, als Folge davon werden die Territorien fälschlicherweise als eines betrachtet.

Die genaue Vorgehensweise:

Man öffnet die drei gefilterten Bilder eines Kerns, synchronisiert sie (>Analyse >Tools >Sync Windows), wählt ein Bild aus und bestimmt den Schwellwert (>Image >Adjust >Threshold oder Control+Shift+T), bei dem die Größe der Territorien oder des Kerns dem Grauwertbild am nächsten kommen. Der Kern sollte keine Löcher aufweisen, die Territorien können, wenn es nötig ist, mit einem höheren Schwellwert berechnet werden, um eng zusammenliegende, aber klar von voneinander zu unterscheidende Chromosomen zu trennen. Wenn das Volumen eines Chromosoms schrumpft, verändert sich der Schwerpunkt nur minimal, da er weiter von den hellsten Voxeln umgeben ist. Wenn Signale, die eindeutig nicht zu den CTs oder dem Kern gehören sich störend auswirken, muss man sie aus den Originalbildern entfernen, diese dann erneut filtern und die Schwellwertbestimmung wiederholen.

Im Winkel-Shellskript (.johangles_terrgravcenters.sh) müssen die Voxel-Größen (x, y, z), der Pfad der aufzurufenden ungefilterten Bilddaten und der Name des zu erstellenden Ergebnisordners angegeben werden, danach wird das Shellskript unter dem neuen Namen der Kernserie gespeichert. (z.B. johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh). In einem zusätzlichen Shellskript (caller genannt, Abbildung 19) werden die Kernnummern und die dazugehörigen Schwellwerte nach dem Namen des Winkel-Shellskripts eingefügt, zuerst die Kernnummer, dann der Schwellwert der ersten Territoriums, der Schwellwert der zweiten Territoriums und abschließend der Schwellwert der Gegenfärbung, durch Leerzeichen getrennt. Die Skripte werden noch ausführbar gemacht, bevor man die Berechnungen mit dem Aufruf des callers (z.B. callerMFb114dig.sh) startet. Dabei werden die Winkel-Shellskripte der Reihe nach für jeden Kern mit den entsprechenden Schwellwerten gerechnet. Die Ergebnisse eines Kerns werden in eine Textdatei (summary.txt) geschrieben, weitere Ergebnisse werden in folgenden Zeilen angefügt.



```

callerMFb114dig.sh - Editor
Datei Bearbeiten Format ?
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 01 41 45 281
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 02 43 75 211
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 03 45 48 201
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 04 49 90 201
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 05 49 56 171
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 06 43 80 251
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 07 50 46 201
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 08 41 58 141
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 09 42 39 151
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 10 41 75 211
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 11 32 75 181
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 12 50 75 181
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 13 75 45 131
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 14 75 45 151
./johangles_terrgravcentersMFb114dig.sh 15 39 42 141
    
```

Abbildung 19: ADMT: Der caller bei der Winkelberechnung ruft das Programm .johangles_terrgravcentersNAME.sh mit unterschiedlichen Bilderserien nacheinander auf.

Die Ergebnisdatei (summary.txt) einer Winkelberechnung wird in Excel geöffnet. Man sollte überprüfen, ob die gewählten Schwellwerte zu nachvollziehbaren Ergebnissen geführt haben; wie die Anzahl der gefundenen Objekte und die dazugehörenden Volumina. Im Volumen sollten sich die Objekte nicht um das Vielfache unterscheiden, sondern es sollten vergleichbar große Territorien lokalisiert worden sein. Ergebnisse einzelner Bilderserien mit den unterschiedlichen Markierungen werden zusammengeführt (z.B. MMU1-bio/MMU14-dig mit MMU1-dig/MMU14-bio). Die entsprechenden Winkel und Abstände werden vereinigt, so dass am Ende pro Chromosomenpaar zwei Spalten mit homologen Winkeln, eine Spalte mit heterologen Winkeln, zwei Spalten mit homologen Abständen, zwei Spalten mit Kern-Territorien-Distanzen und eine Spalte mit heterologen Abständen bleiben. Für die Auswertung sortiert man sie noch aufsteigend nach der Größe.

Die Auswertung beginnt damit, die Werte der Homologen Winkel in eine Tabelle einzutragen, in der die Winkel in Klassen (von 1° Schrittweite) aufgehen, diese werden absolut, prozentual und kumulativ ausgegeben. Eine solche Tabelle für jedes Chromosom wird auf einem Excelarbeitsblatt für einen Zelltyp zusammengefügt. Auch für die anderen Größen wird so verfahren. Es bietet sich an, gleich eine graphische Darstellung mit anzugeben, so dass bei jeder weiteren Winkelberechnung nur die Werte in die vorgefertigte Tabelle einzufügen sind.

2.10.4. Objektzählprogramme: OC-1 und OC-2

Im Lauf dieser Arbeit wurden zwei neue Programme gründlich erprobt, welche die Anzahl von Objekten in einem Bildstapel zählen, bei schrittweiser Erhöhung des Schwellwerts. Grauwerte, die unter dem entsprechenden Schwellwert liegen werden gleich Null gesetzt und alle Objekte, die aus mehr als 10 Voxeln bestehen, gehen in die Zählung mit ein. Für die Objekte gelten die Nachbarschaftsregeln, nach denen alle Voxel zu einem Objekt dazugezählt werden, wenn sie mit einem Nachbar-Voxel entweder eine Fläche, eine Kante oder eine Ecke teilen (26 Nachbarn möglich pro Voxel). Mit steigenden Schwellwerten zerfallen große Objekte in kleinere Untereinheiten, die schließlich ganz verschwinden (Abbildung 20). Die Programme OC-1 und OC-2 analysieren 8 Bit-Bilder, die 256 Grauwerte aufweisen. Der Rahmen, in dem die Bildstapel untersucht wurden, lag von 20-255, der Schwellwert wurde in Schrittweiten von 5 erhöht. Es ergeben sich so 48 Messwerte pro Kanal allein für die Objektzahl in OC-1. Mit OC-2 werden insgesamt 12 Messwerte pro Kanal ausgegeben, also 576 Messwerte pro Kanal.

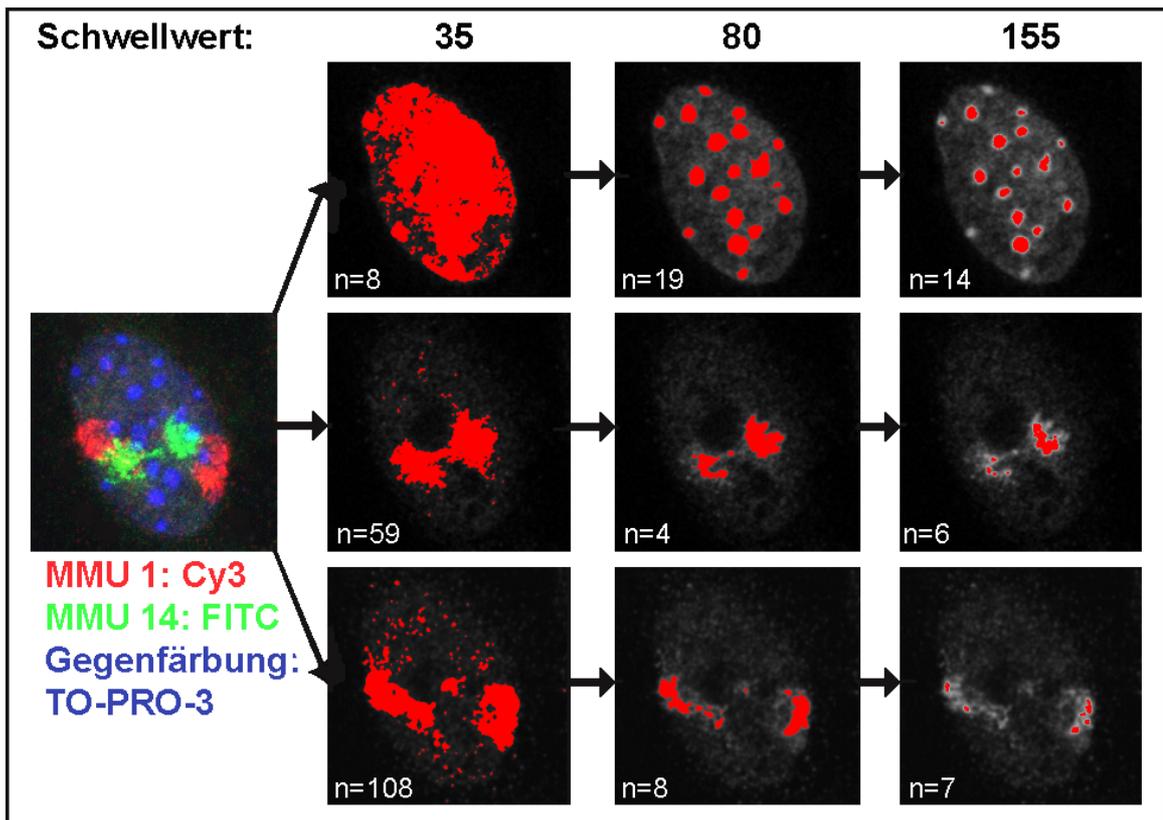


Abbildung 20: Die Funktionsweise des Objektzählprogramms, dargestellt an einem Fibroblastenkern mit den Chromosomen-Paints MMU 1 und 14. Für dieses Beispiel wurden drei Schwellenwerte ausgewählt, 35, 80 und 155. Die Einzelbilder zeigen die Objekte in rot, die über dem entsprechenden Schwellwert liegen und gezählt wurden. Die Objekte können sich in darüber oder darunter liegenden Ebenen fortsetzen und Verbindung zu anderen Objekten aufweisen. Es werden nur Objekte gezählt, die aus mehr als zehn Voxeln bestehen. In den Bildern steht die Anzahl der tatsächlich vom Programm gezählten Objekte (n) in dem ganzen Bildstapel.

OC-1: Objektzählprogramm von S. Stein

Im Programm von S. Stein (**ObjectCounting-1**) wurden die Bildstapel (stacks) eines Experiments für jeden Farbkanal separat bearbeitet. Das Programm selbst ist schon in einer Publikation beschrieben (Cremer et al., 2004). Die Rohbilder wurden vor dem Programmablauf durchgesehen und offensichtliche Hintergrundsignale, wie helle fluoreszierende Punkte, die nicht zum eigentlichen Signal gehörten, wurden weggeschnitten. Dazu wurden die Bilder zuerst normalisiert. Die Namen der Bilder wurden mit Endungen wie bei 3D-RRD (siehe 2.10.1) vereinheitlicht. Die Bildstapel einer Gegenfärbung oder eines Chromosomenterritoriums wurden in eigenen Ordnern abgespeichert und auf den Server übertragen. Weil die Berechnungen sehr zeitaufwendig waren, wurden sie auf dem Linux-Cluster des Leibniz-Rechen-Zentrums (<http://www.lrz-muenchen.de/services/compute/linux-cluster/>) ausgeführt. Man richtet das Programmskript für eine Bildserie mit folgenden Parametern ein: Daten-Pfad, Bild-Endungen und die richtigen Pixelgrößen (z.B.: xy= 80 m, z=240 nm), Startschwellewert (z.B.: 20), Schrittweite (z.B.: 5) minimale Objektgröße, (z.B.: 10) und Name des Ergebnisordners.

Bei dem Programm von S. Stein wird jeder Bildstapel einzeln gerechnet. Das Programm berechnet die Objektwerte (Result_obj) und sechs andere Werte mit Standardabweichungen (dens_vox; dens_surf; dens_vol; results_vol;

results_surf; results_round), die jeweils den Durchschnitt über die gefundenen Objekte darstellen. Dies ist jedoch problematisch, da große Objekte nicht stärker in die Auswertung eingehen als kleine Hintergrundsignale.

Das Programm muss für den nächsten Stapel neu gestartet werden. Diese Aufgabe übernimmt ein sogenannter „caller“, der einzelne Rechenaufträge erzeugt. So können mehrere Prozessoren am Linux-Cluster gleichzeitig genutzt werden da jeder Prozessor für sich an einem Auftrag arbeitet. Der „caller“, in dem die Kernnummern (fortlaufend oder einzeln) eingegeben wurden, fügt die einzelnen Rechenaufträge an die Warteschleife des Rechenzentrums an. Die Aufträge werden am Linux-Cluster der Reihe nach abgearbeitet. Die berechneten Dateien (zehn pro Bildstapel) kamen in einen Ergebnisordner (Density_main_tresh) der Serie. Es schloss sich eine Zusammenfassung der Einzelergebnisse mit dem Programmteil Stat_Auswertung an, der zu einer Zusammenfassung (Density_summary) mit sieben Dateien führte. Mittels eines Excelmakros (siehe Zusatzmaterial) konnte man diese sieben Parameter samt den dazugehörigen Standardabweichungen bequem zusammenfügen.

OC-2: Objektzählprogramm von J. von Hase/S. Dietzel

Im Programm von J. v. Hase (**Object Counting-2**) werden die drei Bildstapel (r, g, b) einer Kernaufnahme vom Programm aus je einer Datei entnommen. Sie tragen die Kernnummer und das Endungskürzel in ihrem Namen. Der Rechenprozess läuft schneller ab als mit OC-1 und benötigt keinen Linux-Cluster. Zum Vergleich: OC-1 benötigte am Cluster für einen Kern = drei Bildstapel ungefähr zwei Stunden, während ein AMD Athlon XP-Prozessor 1700+ für einen Kern mit OC-2 nur durchschnittlich 5 Minuten benötigte (siehe Uhrzeiten in Abbildung 21c). Im eigentlichen Programmskript (./johobjects_short.sh, Abbildung 21a) gibt man den Pfad der Daten und den Namen des Ergebnisordners an, überprüft die Benennung der Endungen und gibt dem tmp-Verzeichnis einen individuellen Namen, wenn man einen Rechner mit mehreren Prozessoren benutzen möchte. Auch hier erleichtert ein „caller“ (Abbildung 21b) das Starten der individuellen OC-2 Programme, wenn viele Berechnungen z.B. am Wochenende oder über Nacht durchgeführt werden sollen.

Die Ergebnisdateien von OC-2 für eine Kernserie wurden mit Hilfe einer Vorlage per Makro in Excel geöffnet (siehe Zusatzmaterial: FusionsMakro1bis50.xls), da für die Erstellung der Objektkurven eine Zusammenfassung der Einzelwerte nötig ist. In dieser Makrovorlage sind 51 Tabellenblätter untergebracht worden. Das erste Blatt des Makros beinhaltet auch die graphische Darstellung der 12 unterschiedlichen errechneten Parameter (siehe Abbildung 22), sowie die Mittelwerte aller Messwerte, die Mediane, die Standardabweichung sowie die Anzahl der in die Zusammenfassung mit eingeflossenen Werte aus den folgenden Blättern der Arbeitsmappe. Das integrierte Makro wurde mit der Funktion >Suchen/Ersetzen< (Strg+H) auf die zu bearbeitende Serie abgestimmt. Das Makro wurde gespeichert. Nach einem Durchlauf wurde der Namen der Serie auf dem ersten Blatt vermerkt und die Excelmappe unter diesem Namen abgespeichert. Wurde die Vorlage wieder geöffnet, bot es sich nun an, nur die Dateiendungen (-1) im Makro zu verändern, um mit den beiden anderen Kanälen (-2, -3) einer Serie gleich zu verfahren. (Beispiel für eine Excelarbeitsmappe mit Ergebnissen siehe Zusatzmaterial)

Von OC-2 werden insgesamt 12 Datensätze pro berechnetem Zellkern für jeden der 48 Schwellwerte ausgegeben. Bei einer durchschnittlichen Serie von 15 Kernen ergeben sich so 8640 Werte.

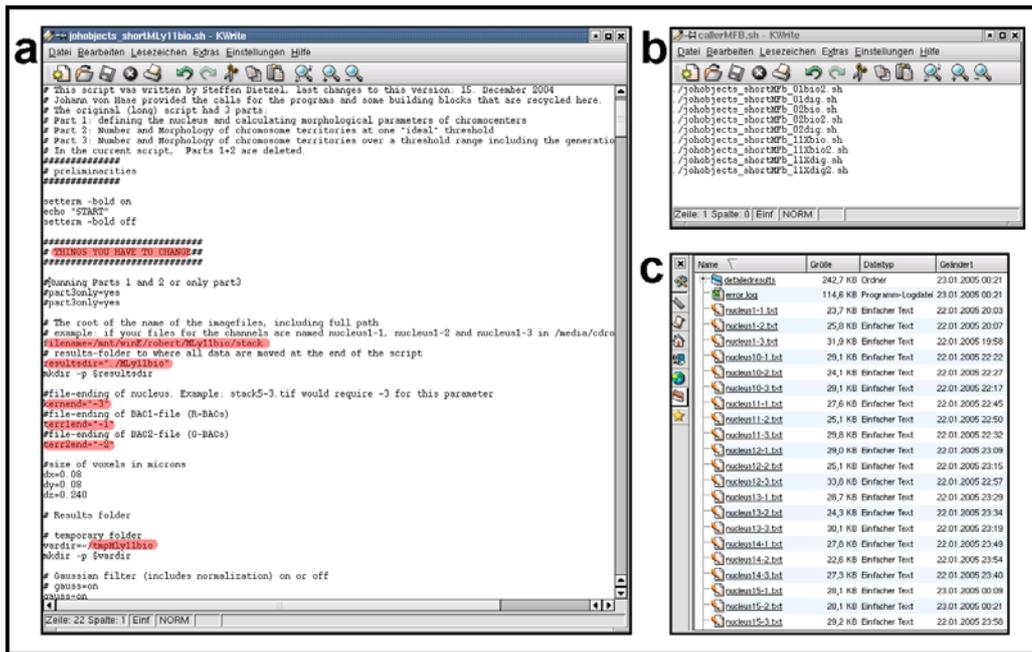


Abbildung 21: Das OC-2 Programm in der Anwendung

a | Das Programmskript OC-2 zur Objektzählung mit den zu ändernden Parametern in rot.

b | Der caller von OC-2, der verschiedene Berechnungsserien automatisch startet.

c | Der Inhalt eines Ergebnisordners von OC-2, der für jeden Kern drei Textdateien enthält, sowie eine Fehlerdatei und die Resultate im Detail.

	Ausgabegröße des OC-2	Bedeutung
a	objects	Anzahl der Objekte
b	total volume	Gesamtvolumen aller gezählter Objekte
c	total surface	Gesamtoberfläche aller gezählter Objekte
d	total intensity	Gesamtintensität aller gezählter Objekte
e	totvol/totintens	Verhältnis Gesamtvolumen zu Gesamtintensität
f	totsurf/totintens	Verhältnis Gesamtoberfläche zu Gesamtintensität
g	totsurf/totvolume	Verhältnis Gesamtoberfläche zu Gesamtvolumen
h	av(vol/intens)	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektvolumen zu Objektintensität
i	av(surf/intens)	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektoberfläche zu Objektintensität
j	av (surf/volume)	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektoberfläche zu Objektvolumen
k	average_roundness	Durchschnittliche „Rundheit“ der Objekte
l	average_smoothness	Durchschnittliche „Glattheit“ der Objekte

Tabelle 18: Die unterschiedlichen Ausgabewerte von OC-2

Zur Verdeutlichung sind alle Graphen, die man von den 12 Datensätzen zeichnen kann, in der Abbildung 22 dargestellt. Für jeden Schwellwertschritt wurden die Werte der einzelnen Kerne gemittelt und aufgetragen. Die Daten sind nicht normiert, d.h. noch nicht auf den DNA-Gehalt der untersuchten Chromosomen bezogen.

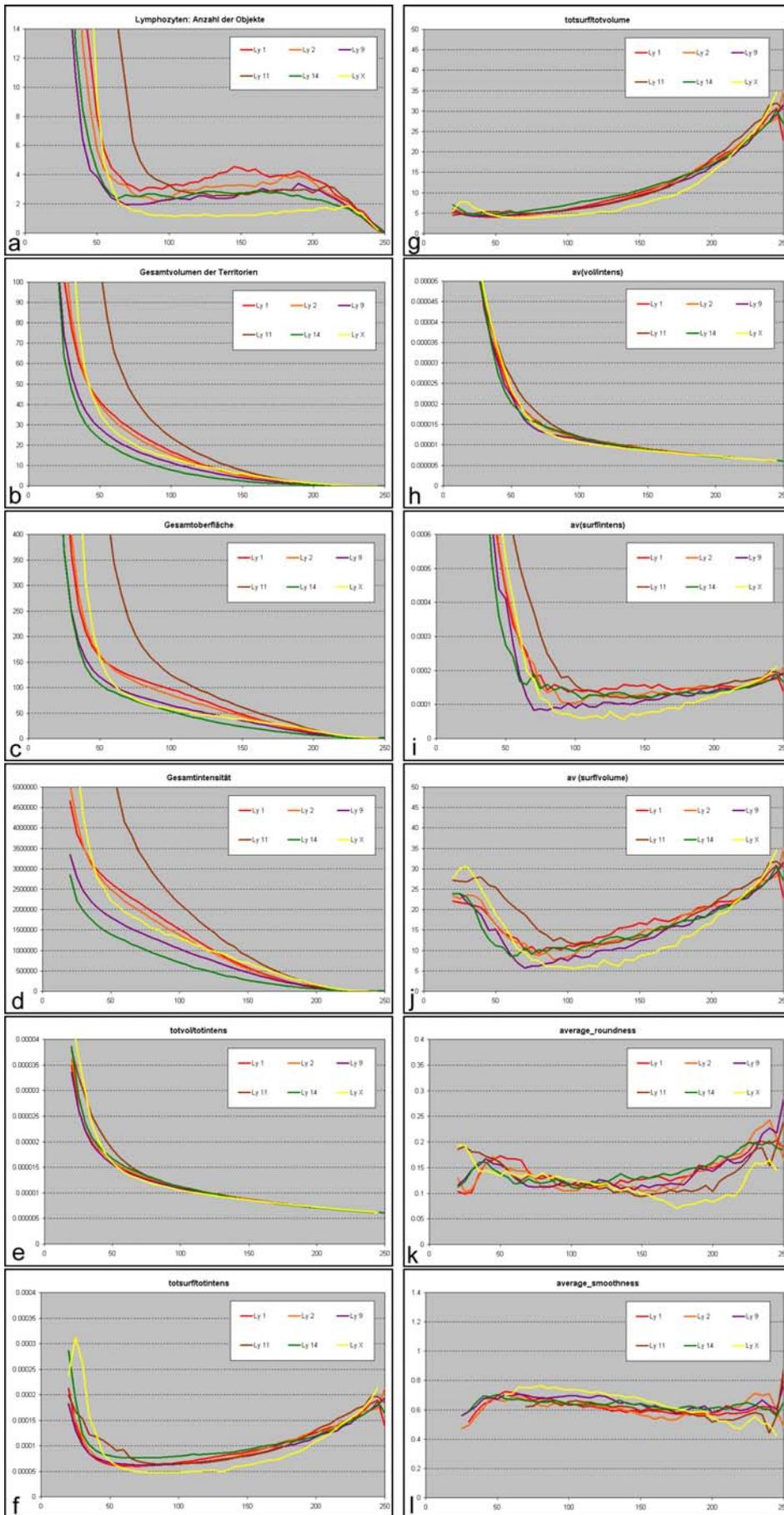


Abbildung 22: Alle möglichen Ergebnisparameter des Objektzählprogramms OC-2.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der sechs untersuchten Chromosomen von OC-2 in Lymphozyten

a-d | Die Anzahl der Objekte, das Gesamtvolumen, die Gesamtoberfläche und die Gesamtintensität der gezählten Objekte.

e-g | Diese Kurven stellen Quotienten aus den ersten vier Parametern dar.

h-j | Diese Kurven stellen Quotienten dar, die aus Durchschnittswerten berechnet wurden

k, l | Diese Kurven zeigen die Parameter der durchschnittlichen „Rundheit“ und der „Glattheit“

Die normierte Darstellung von vier Parametern findet man in

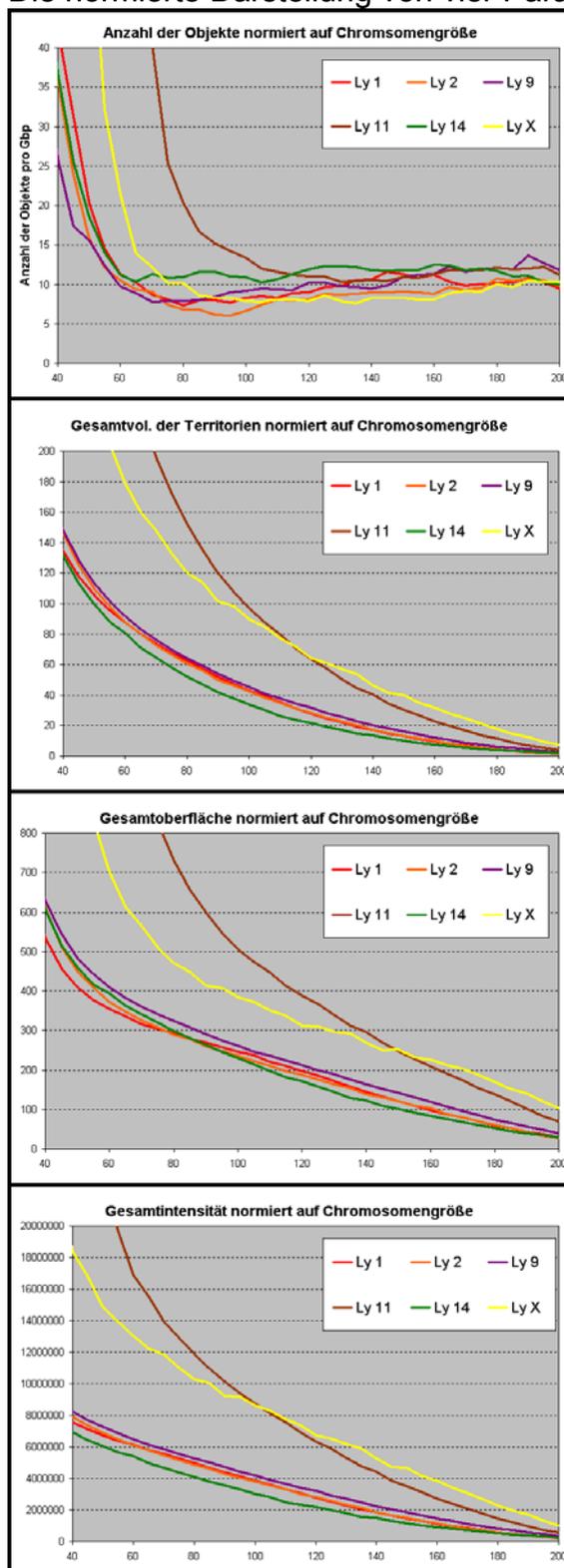


Abbildung 23. Die Kurven der X-Chromosomen verändern sich dadurch am stärksten, da der Tatsache Rechnung getragen wird, dass immer nur ein X-Chromosom in den männlichen Zellen vorlag.

Abbildung 23: Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2 in normierter Darstellung

Die Ausgangsdaten für diese vier Graphen waren die gleichen wie in Abbildung 22 a-d, nur dass der DNA-Gehalt der Chromosomen in die Graphik mit einfluss. Die Objekte sind nun bezogen auf 1 Gbp und liegen entsprechend höher.

2.11. Statistische Methoden

Für alle statistischen Methoden wurde das Programm SPSS 13.0 benutzt.

2.11.1. Getestete Datensätze

Bei der 3D-RRD Auswertung der Chromosomenterritorien gibt das Programm nur die Daten für die graphische Darstellung der Verteilungskurve aus. Es ist

allerdings nicht möglich, diese Verteilungskurven direkt miteinander zu vergleichen, da sie aus Mittelwerten über die ganze Serie aufgebaut sind. Alle y-Werte für eine bestimmte Kernschale (0-24) werden aufsummiert und durch die Anzahl der Werte (n) geteilt.

Die Mediane

der radialen Verteilung von Chromosomenterritorien und Chromozentren erhält man auf folgende Weise:

Beim 3D-RRD-Programm werden die Voxel auch nach der Helligkeitsintensität gewichtet, es wird der Punkt des relativen Radius bestimmt, an dem die eine Hälfte der Signalintensität innen, die andere Hälfte aller zum Signal gehörenden Werte außerhalb zum Liegen kommt. Dieser Wert wird Median genannt. Mit dem Zusatzprogramm „./statistik_groesser_kleiner.sh“ (Abbildung 24) erhält man die Mediane der CT Verteilung unter Linux. Das Programm wird in jeden Ergebnisordner kopiert und darin aufgerufen. Die Befehlszeile muss mit den richtigen Werten und Angaben vervollständigt werden (Tabelle 19).

Die Ergebnisdateien wurden nach Windows übertragen und als Exceldateien abgespeichert. Die Medianwerte bildeten die Grundlage für die statistischen Auswertungen in SPSS.

Befehl	Bedeutung	Beispiel
-i1	Name der ersten Datei	-i1 Terr_1.adat
-i2	Name der zweiten Datei	-i2 Terr_2.adat
-F	Anzahl der Schalen 0, 2, 4,...98	-F 26
-K1	Anzahl der ausgewerteten Kerne	-K 15
 tee	Erzeugung einer Ergebnisdatei	tee Mediane_MacX11.txt

Tabelle 19: Die zum korrekten Ablauf des Programms „statistik_groesser_kleiner.sh“ benötigten Angaben.

```

gundel@usr/Robert/RRDMac_X11/EngRRD_Mac_X11 # ./statistik_groesser_kleiner -i1
Terr_1.adat -i2 Terr_2.adat -F 26 -K 15 | tee Statistik_MacX11.txt
80,92 74,26 6,66
78,37 51,13 27,25
79,48 75,26 4,22
79,02 74,29 4,73
49,26 69,50 -20,24
49,61 74,94 -25,33
52,30 76,30 -24,00
65,09 77,56 -12,47
69,80 71,64 -1,84
64,06 61,53 2,52
79,35 72,93 6,42
86,44 70,34 16,10
87,22 73,86 13,36
84,79 64,16 20,63
78,84 79,48 -0,64

In 6 Kernen war Terr_1.adat interner als Terr_2.adat.
In 9 Kernen war Terr_1.adat peripherer als Terr_2.adat.

gundel@usr/Robert/RRDMac_X11/EngRRD_Mac_X11 #

```

Abbildung 24: Statistische Auswertung von 3D-RRD-Ergebnissen

Das Linux-Befehlsfenster, in dem das Statistikprogramm „statistik_groesser_kleiner.sh“ abläuft und die erhaltenen Ergebnisse für die Medianwerte der einzelnen Chromosomen-Paint Verteilungen. Die dritte Spalte gibt die Differenzen zwischen den Medianwerten an.

Winkel und Abstände:

Das ADMT-Programm gibt die gemessenen Winkel und Abstände getrennt nach homologen und heterologen Werten aus. Die Daten können direkt für eine statistische Auswertung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test gruppiert werden.

OC-2: Maximale Objektzahlen:

Die Excelmappen der zusammengefassten Einzeltabellen des OC-2-Programms enthalten auf dem ersten Tabellenblatt die Aufstellung der maximalen Objektzahlen, die jeder Kern oder jedes Chromosomenpaar einmal erreicht, nachdem sich der Bildhintergrund mit steigendem Schwellwert aufgelöst hat. Betrachtet man die Kurve von Objektzahlen eines einzelnen Bildstapels, so erkennt man den Bereich der Schwellwerte, die als relevant angesehen werden. Der Bereich beginnt in den meisten Fällen bei 80. Die maximalen Objektzahlen jedes Kerns (jedes Chromosomenpaars) werden ab diesem Schwellwert auf den Einzelseiten der Excelmappe ausgelesen und auf dem ersten Tabellenblatt zusammengefasst in einer Tabelle und einem Graphen zusammengefasst (Vorlage Excelmappe: siehe Zusatzmaterial).

Die maximalen Objektzahlen von Kernserien wurden Exceltabellen zusammengefasst und zur Zuordnung mit einem Zahlen-Code versehen, der die Gegenüberstellungen der Datengruppen in den Post Hoc Tests (SIDAK) nach der ANOVA erlaubt.

2.11.2. Kolmogorov-Smirnov-Test

Der verwendete Kolmogoroff-Smirnoff-Test gehört zu der Klasse der nicht-parametrischen Tests mit zwei unabhängigen Stichproben. Damit wurde untersucht, ob zwei Datensätze signifikant von einander verschieden sind (ausgehend von einem 5%-Signifikanzniveau) oder ob man von einer Gleichverteilung ausgehen kann.

Die in SPSS zu vergleichenden Datenreihen wurden dazu in Excel in zwei Spalten geschrieben. Die erste Spalte gab die Werte (Mediane aus 3D-RRD, Winkel, Abstände) an, die zweite Spalte bezeichnet mit einer Zahl die Gruppenvariable der jeweiligen Stichprobe.

Für die Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Excel Daten in SPSS eingelesen. Unter dem Menüpunkt **>Analysieren** wurden aus **>nicht-parametrische Tests** der **>Test für zwei unabhängige Stichproben** ausgewählt. Die Mediane stellten die Testvariablen dar (Spalte 1), über die Eingabe der Gruppenvariablen bestimmt man, welche Datensätze miteinander verglichen werden (Spalte 2, Abbildung 25). Sie werden für jeden Test verändert, bei sechs Chromosomen ergeben sich 15 Kombinationen an Vergleichsmöglichkeiten. Die Asymptotische Signifikanz wurde als Statistische Größe weiterverwendet (Abbildung 26).

Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen wurden in Tabellen graphisch zusammengefasst und die p-Werte in ein Farbkodesystem eingeordnet, das eine schnellere Orientierung über signifikante Unterschiede ermöglicht. Höchste signifikante Unterschiede wurden rot eingefärbt.

	A	B	C	D
1	Median	Chromosom	Gendichte/Mt	Chr. Länge in
2	55.7393	1	7.7	195.9
3	70.4139	1	7.7	195.9
4	72.6393	1	7.7	195.9
5	74.6321	1	7.7	195.9
6	74.779	1	7.7	195.9
7	77.4628	1	7.7	195.9
8	77.609	1	7.7	195.9
9	78.3382	1	7.7	195.9
10	79.4269	1	7.7	195.9
11	79.6568	1	7.7	195.9
12	79.7386	1	7.7	195.9
13	79.9591	1	7.7	195.9
14	80.6479	1	7.7	195.9
15	80.6614	1	7.7	195.9
16	80.7827	1	7.7	195.9
17	80.9514	1	7.7	195.9
18	81.8628	1	7.7	195.9
19	61.2929	2	11.3	181.4
20	71.0936	2	11.3	181.4
21	71.8082	2	11.3	181.4
22	72.031	2	11.3	181.4
23	73.7573	2	11.3	181.4
24	74.5112	2	11.3	181.4
25	74.528	2	11.3	181.4
26	75.0315	2	11.3	181.4
27	76.0141	2	11.3	181.4
28	76.8938	2	11.3	181.4
29	77.1332	2	11.3	181.4
30	77.2027	2	11.3	181.4
31	79.9981	2	11.3	181.4
32	80.4829	2	11.3	181.4
33	80.9352	2	11.3	181.4
34	40.8828	9	11.2	124.5
35	56.7824	9	11.2	124.5
36	59.7242	9	11.2	124.5
37	61.3079	9	11.2	124.5
38	61.4956	9	11.2	124.5
39	63.2467	9	11.2	124.5
40	64.8051	9	11.2	124.5
41	65.2887	9	11.2	124.5
42	71.1157	9	11.2	124.5
43	73.8582	9	11.2	124.5
44	74.0467	9	11.2	124.5
45	75.8161	9	11.2	124.5
46	78.5933	9	11.2	124.5
47	78.9137	9	11.2	124.5
48	80.1553	9	11.2	124.5
49	51.1269	11	15.3	122.9
50	55.9973	11	15.3	122.9

Abbildung 25: Ausschnitt aus einer Exceltabelle für die SPSS Berechnung. Die erste Spalte enthält die Medianwerte/maximale Objektzahlen, die anderen entweder einen Code, den Gengehalt/Mbp oder die Größe des Chromosoms.

Kolmogorov-Smirnov-Test bei zwei Stichproben

Häufigkeiten

	Chromosom	N
Median	1	17
	2	15
Gesamt		32

Statistik für Test^a

		Median
Extremste Differenzen	Absolut	.506
	Positiv	.059
	Negativ	-.506
Kolmogorov-Smirnov-Z		1.428
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		.034

a. Gruppenvariable: Chromosom

Abbildung 26: Statistik mit SPSS: Beispiel einer Ausgabedatei des SPSS Statistikprogramms. Die asymptotische Signifikanz von $p=0,034$ bestätigt den Unterschied in der radialen Verteilung zwischen MMU 1 mit MMU 2 bei Makrophagen.

2.11.3. Korrelationskoeffizient

Mit dieser Analyse sollte überprüft werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen Gendichte bzw. Chromosomengröße und radialer Positionierung feststellen lässt.

Unter dem Menüpunkt **>Analysieren** in SPSS wurden aus **>Regressionsanalyse** die **>Lineare Regression** ausgewählt. Die Gendichte (Spalte C in Abbildung 25) oder die Chromosomengröße (Spalte D) wurde zur konstanten Größe bestimmt, die Mediane als Variablen betrachtet.

Es ergibt sich in beiden Fällen ein Korrelationskoeffizient R zwischen 0 und 1, der Auskunft darüber gibt, wie gut sich eine Regressionsgerade zwischen die Medianwerte der sechs Chromosomen einfügen lässt. Daran schließt sich noch eine ANOVA an (2.11.4). Der p-Wert dieser ANOVA gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der man die Nullhypothese (es gibt keinen Unterschied zwischen den Gruppen) ablehnen kann, und von einer zufälligen Verteilung sprechen kann.

2.11.4. ANOVA (ANalysis Of VAriance between groups)

ANOVA vergleicht die Varianz zwischen verschiedenen Gruppen (Beispielsweise die der maximalen Objektzahlen von Chromosomenterritorien in einem Zelltyp). Die Schwankungsbreite zwischen den kleinsten und größten Messwerten einer Gruppe kann zwar in den meisten Gruppen ebenfalls enthalten sein, doch im Detail gibt es möglicherweise auch feine Unterschiede, leicht unterschiedliche Höhen und Tiefen, außerdem ergeben sich unterschiedliche Mittelwerte für die verschiedenen Gruppen. Die ANOVA vergleicht die Gruppenwerte miteinander und gibt an, mit welcher Signifikanz man annehmen kann, dass es Unterschiede zwischen den Gruppen gibt, man also die Nullhypothese ablehnen kann. Es wäre unwahrscheinlich, dass die beobachteten Größenunterschiede nur auf Zufall beruhen.

Die zentrale statistische Größe bei ANOVA ist der F-Test verschiedener Gruppenmittelwerte, der untersucht, ob die Gruppenmittelwerte der unabhängigen Variablen genug voneinander verschieden sind, dass sie nicht zufällig aufgetreten sein können. Wenn der F-Test zeigt, dass die unabhängigen Variablen in einer Beziehung zu den Konstanten stehen, dann zeigen nachfolgende Vergleichstests (Post hoc), welche Variablengruppen am meisten zu der beobachteten Beziehung beitragen.

Der F-Wert setzt sich zusammen aus dem Quotienten von „Gefundene Abweichungen von den Gruppenmittelwerten“ und „Erwartete Abweichungen von den Gruppenmittelwerten“. Wäre die Nullhypothese korrekt, würde F um 1 liegen, während große F-Werte einen Unterschied zwischen den Gruppen anzeigen. Ob der erhaltene F-Wert „groß“ genug ist, kann man in F-Werttabellen (z.B. auf 5%-Signifikanzniveau) nachschlagen, wenn man den Freiheitsgrad (d.f. = Zahl der Gruppen minus 1) und den Denominator (die Zahl der Einzelwerte minus die Anzahl der Gruppen) einsetzt. Ist der errechnete F-Wert größer als der Tabellenwert, kann man die Nullhypothese ablehnen.

Je mehr Gruppen man miteinander vergleicht, desto wahrscheinlicher ist es auch, Unterschiede zu finden. Diese Tatsache berücksichtigt ANOVA bereits bei der Berechnung.

Das SPSS-Programm gibt zum F-Wert gleich den P-Wert auf 5%-Signifikanzniveau an, was eine F-Werttabelle überflüssig macht.

3. Ergebnisse

3.1. Stammzelltransfektion

Die Erzeugung von stabil transfizierten ES-Zellen mit dem *lac*-Repressor-GFP/*lac*-Operator System sollte die Untersuchung der Architektur des Zellkerns in Stammzellen und daraus differenzierten Zellen *in vivo* möglich machen. Mögliche Veränderungen der Struktur und der Lokalisation der damit erzeugten GFP-Signale innerhalb des Zellkerns während der Differenzierung hätten Rückschlüsse auf die Chromatinorganisation ermöglicht. Deswegen wurde ein großer Teil der Arbeitszeit während dieses Forschungsprojekts auf die Gewinnung von stabil transfizierten, embryonalen Mausstammzellen verwendet. Dabei gelang es nicht, mit den gegebenen Plasmiden (p3'SS = *lac*-Repressor-GFP oder -YFP; pPS-8.8 = *lac*-Operator; Abbildung 9) die gewünschten stabilen transgenen Zellen zu etablieren.

Zwar konnte bei alleiniger Transfektion mit dem Plasmid p3'SS bei manchen ES-Zellen eine grüne Einfärbung der Zellkerne beobachtet werden (Abbildung 27 a). Um die so gewonnenen Zellen aber weiter für die zweite Transfektionsrunde verwenden zu können, musste erst sichergestellt werden, dass die transfizierten Zellen den Plasmid stabil integriert haben. Aber schon an diesem Punkt war sichtbar, dass es sich nicht um eine homogene Population von Zellen handeln konnte. Die Zellkerne zeigten nur zu einem geringen Prozentsatz die YFP/GFP-Färbung, die auch von unterschiedlicher Intensität war. Offensichtlich war nur eine transiente Transfektion gelungen. Weitere Transfektionsversuche mit den beiden Plasmiden zusammen (Cotransfektion) ließen vereinzelt Zellen wie in Abbildung 27 b-e erkennen, die einzelne oder mehrere grüne Punkte zeigten. Ausgehend von den Zellen der gepickten Kolonie, in denen solche Signale zu entdecken waren, sollten Subklonierungen zu der gewünschten stabilen Zelllinie führen. So wurden die Zellen (immer unter Selektionsmedium mit Hygromycin) trypsinisiert, verteilt und wiederum Kolonien gepickt. Nur in wenigen Zellen auf einem Bruchteil der angefertigten Präparate konnte erneut die Punkt-signale entdeckt werden. Mehrere Subklonierungsrunden ergaben keine Fortschritt, auch konnte die Rate der Zellen mit Signalpunkten nicht erhöht werden. Um festzustellen, ob die Plasmide in das Genom integriert haben, wurden von einer Zellmischung, in der Signale beobachtet wurden, Metaphasenpräparate angefertigt (Vorgehen siehe 2.2.5.) (Abbildung 28). Darauf wurden als Sonden die verwendeten Plasmide hybridisiert (Vorgehen siehe 2.3.4). So konnten in Interphasezellkernen und Metaphasen FISH-Signale der integrierten Plasmide detektiert werden. Die Anzahl der Signale war jedoch nicht homogen. Die Aufnahme einer solchen Metaphase in den Abbildung 28 a-d zeigt für jedes Plasmid vier FISH-Signale (grün und rot) auf fünf Mausechromosomen. Jeweils drei Signale kolokalisieren davon, das heißt, je ein *lac*-Repressor und ein *lac*-Operator haben sich einzeln in je ein Chromosom integriert. Die genaue Anzahl der Integrationen pro Zellkern kann nicht bestimmt werden, da aufgrund der erhöhten Chromosomenzahl in diesem Bild ($n > 60$) angenommen werden muss, dass es sich um zwei nicht vollständige Metaphasen handelt, die beim Auftropfen zusammengespült wurden. Andere Metaphasen waren ebenfalls nicht vollständig.

Zellen desselben Klons wurden anschließend fixiert und mit dem Antikörper gegen Oct3, wie in 2.4.1 beschrieben, angefärbt (Abbildung 28 f). Dabei zeigte

sich, dass die transfizierten ES-Zellen weiter eine positive Reaktion ergaben, also Oct3 exprimieren. Man kann also weiter von einer Pluripotenz der ES-Zellen ausgehen. Auf dem Bild sieht man aber auch gleich die inhomogene Zusammensetzung dieser wenigen Zellen, da auch eine Zelle überhaupt keine YFP-Färbung zeigt.

Eine Zelllinie mit einer genau definierten stabilen Transfektion konnte nicht isoliert werden und so wurden nach zwei Anläufen mit der Calciumphosphatmethode und drei Transfektionsansätzen mit FuGene® die Versuche eingestellt.

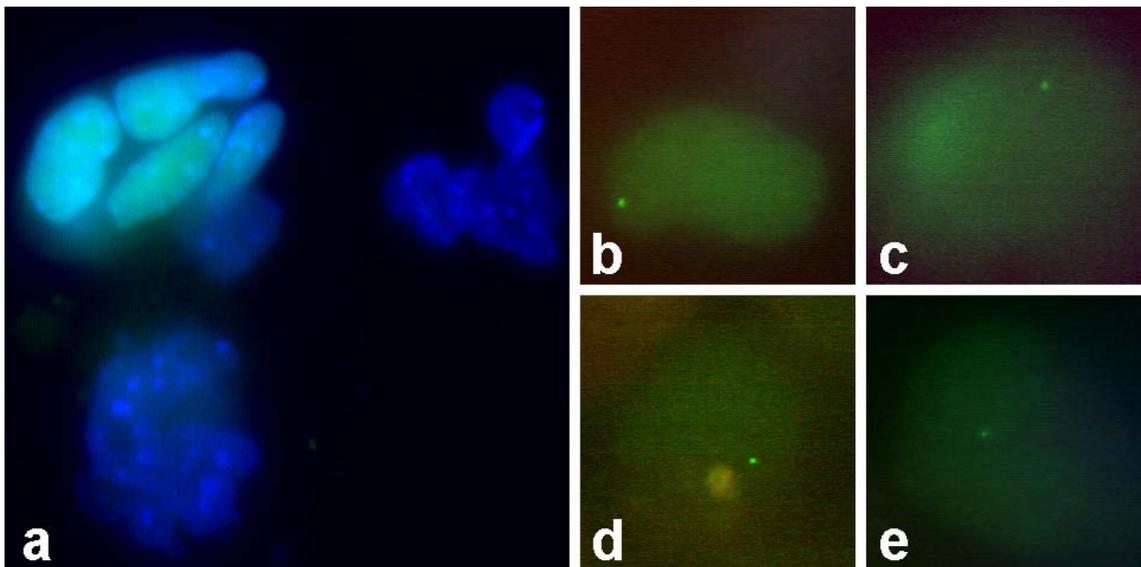


Abbildung 27: Ergebnisse von Transfektionsversuchen. Die Aufnahmen stammen von einem Epifluoreszenzmikroskop.

a | Links oben vier CCE Stammzellen, die das *lac*-Repressor-GFP Protein des Plasmids p3'SS exprimieren, die anderen ES-Zellen weisen keine Grünfärbung und sind nur als Gegenfärbung in DAPI (blau) zu sehen. Die Zellen entstammen einer Kolonie, die zwei Wochen nach der Transfektion mit Fugene gepickt und mit Formaldehyd fixiert wurden.

b-e | ES-Zellen nach einer Cotransfektion. Einzelne ES-Zellen, die einen grünen Punkt zeigen, sind mit den beiden Plasmiden (*lac*-Repressor-YFP und pPS-8.8 = *lac*-Operator) transfiziert worden. Die Zellen wurden drei Wochen nach der Transfektion und nach zwei Subklonierungsrunden fixiert.

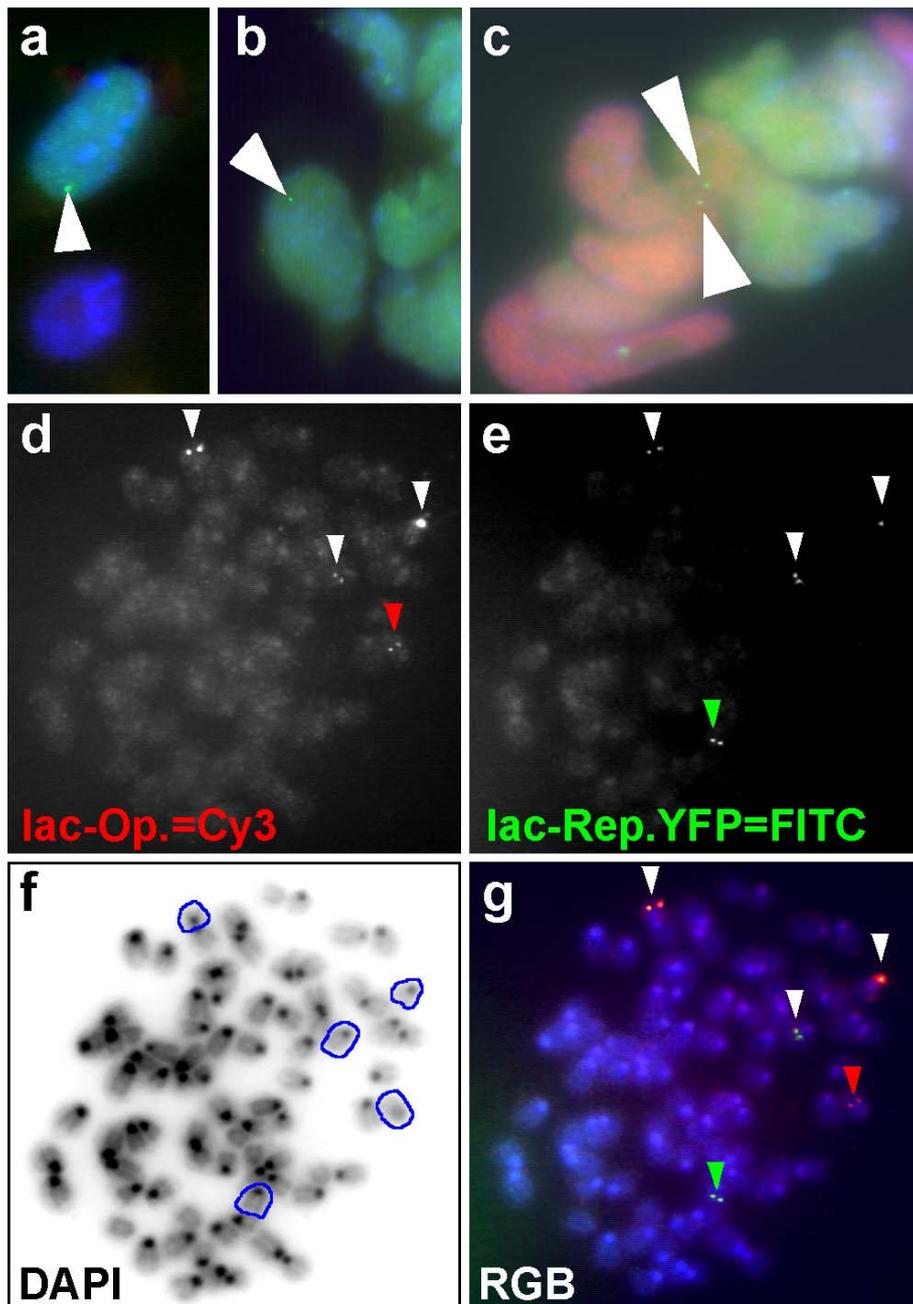


Abbildung 28: Ergebnisse einer Cotransfektion von CCE ES-Zellen

a, b | Fluoreszenzaufnahmen von CCE ES-Zellen, die mit beiden Plasmide transfiziert wurden. Einzelne Zellen wiesen einen grünen Punkt (große Pfeile) auf. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt.

c | Eine kleine ES-Zellkolonie, die zusätzlich rot mit Oct3-Antikörper (ES-Marker) angefärbt wurde und neben YFP-Punktsignalen (große Pfeile) eine inhomogene YFP-Färbung von Zellkernen aufweist.

d, e | Metaphasechromosomen mit Hybridisierungssignalen (kleine Pfeile) von *lac*-Operator in rot und *lac*-Repressor-YFP in grün.

f | Das invertierte Bild einer DAPI-Färbung der Metaphase. Blau umrandete Chromosomen tragen ein Plasmid.

g | Das zusammengesetzte RGB-Bild: auf drei Chromosomen haben sich beide Plasmide an der selben Stelle integriert, da die Signale kolokalisieren (weiße Pfeile). Es liegen auch jeweils ein pPS-8.8 (*lac*-Op.) und ein *lac*-Repressor-YFP-Plasmid separat in je einem Chromosom vorliegend (roter und grüner Pfeil).

Zusammenfassung Transfektion:

Eine Transfektion von Maus-Stammzellen mit dem *lac*-Repressor-GFP/*lac*-Operator System ist grundsätzlich möglich, auch mit einfachen Mitteln. Allerdings scheinen die Plasmide nicht für eine stabile Integration geeignet zu sein. So konnte keine transfizierte Stammzelllinie für Differenzierungsversuche gewonnen werden.

3.2. Übersicht über die 3D-FISH Experimente

Für die Untersuchungen zur radialen Anordnung, der Winkel- und Distanzbestimmung wurden 3D-FISH Experimente mit je zwei Chromosomenpaaren durchgeführt. Je drei Chromosomenkombinationen wurden auf stimulierte Lymphozyten, auf primäre Fibroblasten, auf embryonale Stammzellen und auf daraus differenzierte Makrophagen hybridisiert. Die 3D-FISH-Hybridisierungen wurden wie in Material und Methoden beschrieben (ab S. 33) durchgeführt. Stellvertretend wird in Abbildung 29 eine Metaphase aus einer Testhybridisierung mit den markierten Chromosomen MMU 1 und 14 gezeigt, daneben die Projektion eines Lymphozytenkerns mit den gleichen Chromosomen.

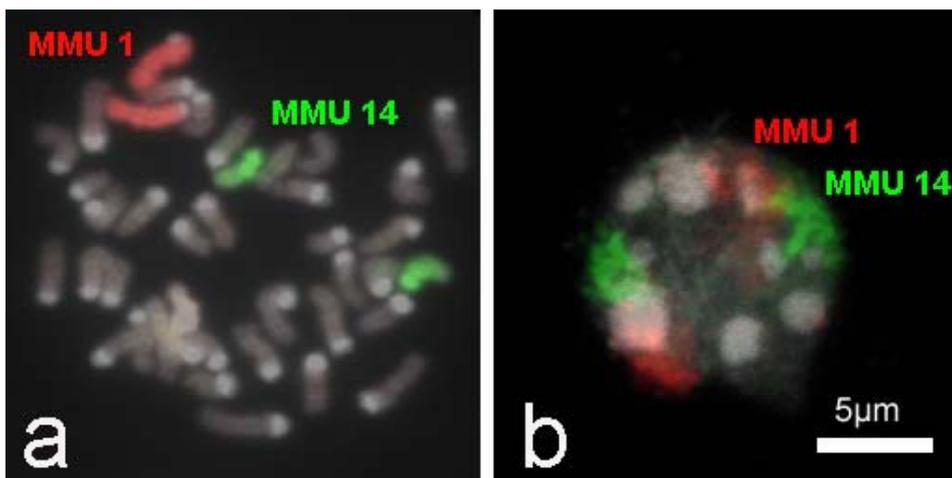


Abbildung 29: Der Test eines Hybridisierungsmixes für 3D-FISH

a | MMU1 und MMU14 auf einer Metaphase. Die Chromosomen wurden mit DAPI (weiß) gefärbt.

b | Die Chromosomen-Paints auf einem 3D-fixierten Zellkern. Die DNA des Interphasezellkerns wurde mit TOPRO-3 angefärbt.

Insgesamt wurden für diese Arbeit 417 Mauszellkerne der verschiedenen Zelltypen zur Untersuchung der radialen Anordnung der Chromosomenterritorien sowie der Chromozentren durch das 3D-RRD Programm ausgewertet. Dieselben Daten waren auch Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Winkel und Abstände mit ADMT, sowie der Strukturanalyse mit Hilfe des Objektzählprogramms OC-2.

Die folgenden Bilder (Abbildung 30) zeigen stellvertretend Beispiele für alle Chromosomenkombinationen in den untersuchten Zelltypen Lymphozyten, Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen. Es handelt sich bei den Bildern um Projektionen (maximale Intensität) ganzer Bildstapel, die Kerne wurden mit TOPRO-3 angefärbt und in Blau dargestellt.

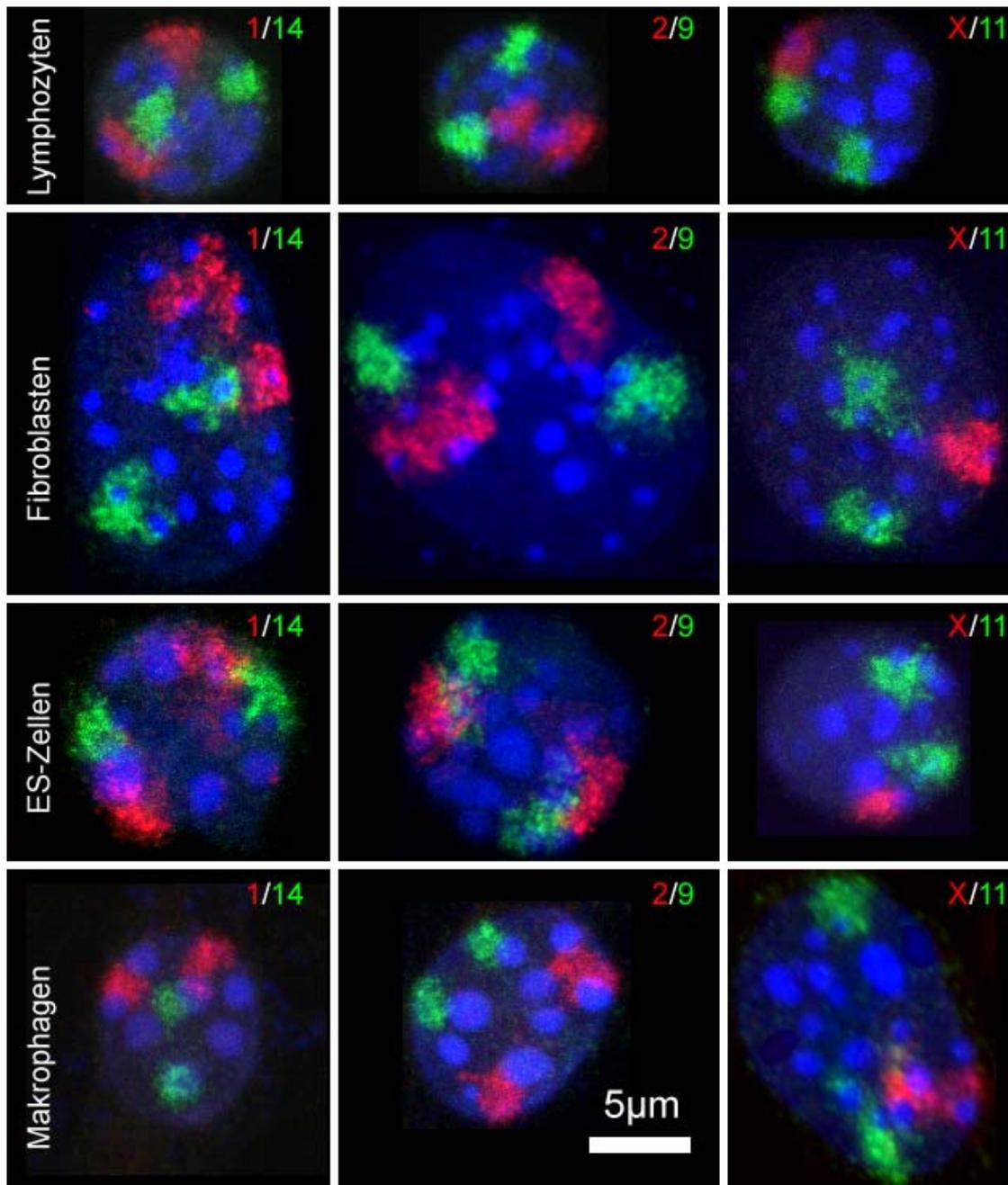


Abbildung 30: Projektionen von konfokalen Bildstapeln der 3D-FISH-Experimente

Jede Zeile zeigt die drei Chromosomenkombinationen MMU 1/14, MMU 2/9 und MMU 11/X in einem Zelltyp. Die Chromosomen MMU 1, 2, X waren mit Digoxigenin markiert und wurden mit Cy-3 rot nachgewiesen, die Chromosomen MMU 9, 11, 14 wurden mit Biotin markiert und mit einer grünen Antikörperkombination (konjugiert mit Alexa488 und FITC) detektiert. Die Kern-DNA wurde mit TO-PRO-3 angefärbt und ist hier blau dargestellt. Deutlich sichtbar sind darin die hellen Heterochromatinblöcke (Chromozentren).

3.3. Einfluss der Haptene und Antikörper auf die Bestimmung der radialen Verteilung

3.3.1. Unterschiedlicher Kurvenverlauf mit unterschiedlichen Haptenen?

Als das Beispiel, an dem sich die Frage nach dem Einfluss der Haptene entzündete, wird hier der Fall der Hybridisierung von MMU 1 und 14 in Lymphozytenkernen näher erklärt. Das Experiment wurde aufgrund der fraglichen Ergebnisse wiederholt. Betrachtet man die Graphen der radialen CT Verteilung in Lymphozyten, so fällt auf, dass sich bei unterschiedlicher Haptenmarkierung von MMU 1 und MMU 14 ein Unterschied im Verlauf der Kurven zeigt (siehe Abbildung 31 a und b). In **a** verläuft die Kurve für Chromosom 14 (mit Digoxigenin markiert) höher über der von Chromosom 1 (mit Biotin markiert). Der Kurvenverlauf mit umgekehrt markierten Chromosomen-Paints ergab in **b** eine flachere Kurve für das Chromosom 14 (jetzt mit Biotin markiert) die noch nicht einmal die Höhe von Chromosom 1 erreichte. Die Positionen der Kurvenmaxima (82-84%) haben sich aber auf der x-Achse, die den relativen Abstand zum Kernmittelpunkt angibt, nicht verschoben. Das gleiche Experiment wurde aufgrund des unterschiedlichen Kurvenverlaufs mit neuen Zellen der selben Fixierungsreihe wiederholt. Die Hybridisierungsmixe wurden neu nach dem gleichen Rezept wieder hergestellt. Bei der Wiederholung ergab die Auswertung in **d** für Chromosom 1 (bio) und Chromosom 14 (dig) ähnliche Verhältnisse, wie in **a** und **b**, die radiale Kurve des mit dig markierten Chromosom 14 verläuft oberhalb von MMU 1. Ein größerer Teil der gesamten Signalintensität (100%) befindet sich also bei MMU 14-dig am Rand des Zellkerns als im Vergleich zu MMU 14-bio in **e**.

Für die in **c** und **f** dargestellten Kurven wurden die Datensätze aus den einzelnen Experimenten zusammengerechnet, da aufgrund der gleichen radialen Position der Ergebnisse keine Verschiebung der Maxima zu erwarten war. Eine erneute Zusammenfassung **g** stellt die Ergebnisse aus allen 69 ausgewerteten Kernen dar. Daran erkennt man, dass die Schwerpunkte der beide Chromosomenterritorien von MMU 1 und 14 bei 86% des relativen Kernradius liegen, sich dort also die höchste Signalintensität und damit die meiste chromosomale DNA befindet.

Die eben beschriebenen Funde in Lymphozyten waren die auffälligsten, was die Unterschiede zwischen den Haptenmarkierungen anging. Im Normalfall stellten sich die Unterschiede als eher gering heraus, wie in Abbildung 32 dargestellt. Genauso wie in diesem Fall wurden bei allen anderen Chromosomenkombinationen in allen Zelltypen die Ergebnisse aus einzelnen Kernserien immer zusammengefasst.

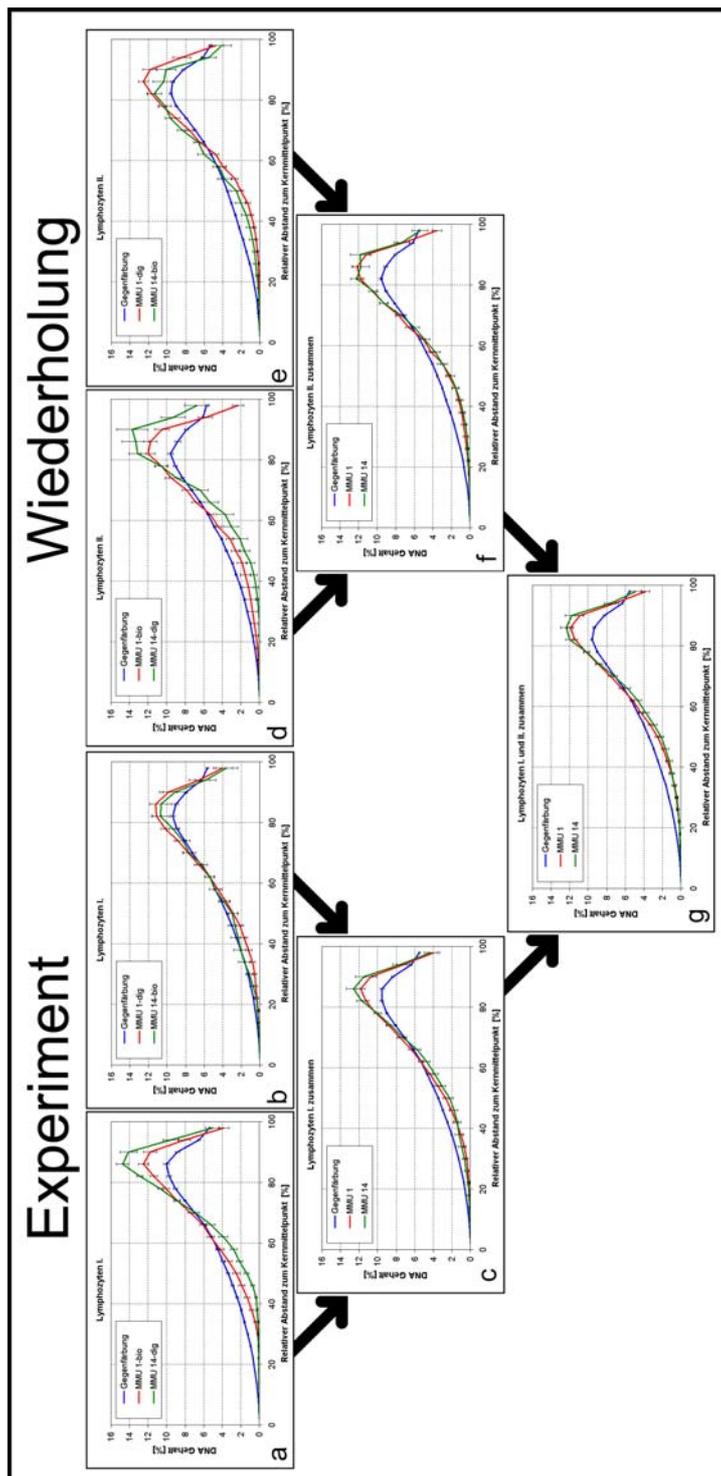


Abbildung 31: Ein Experiment mit wechselnden Haptene und seine Wiederholung. Die Pfeile zeigen, wie die Daten für die nächste Darstellung zusammengefasst wurden.

- a, b | Die Kurven der ersten 3D-RRD Auswertung für MMU 1 und 14 in Lymphozyten mit wechselnden Haptene.
- c | Die zusammengefassten Daten aus a und b.
- d, e | Wiederholung Die Kurven der 3D-RRD Auswertung für MMU 1 und 14 in Lymphozyten mit wechselnden Haptene.
- f | Die zusammengefassten Daten aus d und e.
- g | Das Diagramm ganz rechts beinhaltet die ganzen 3D-RRD-Daten aus a, b, d und e.

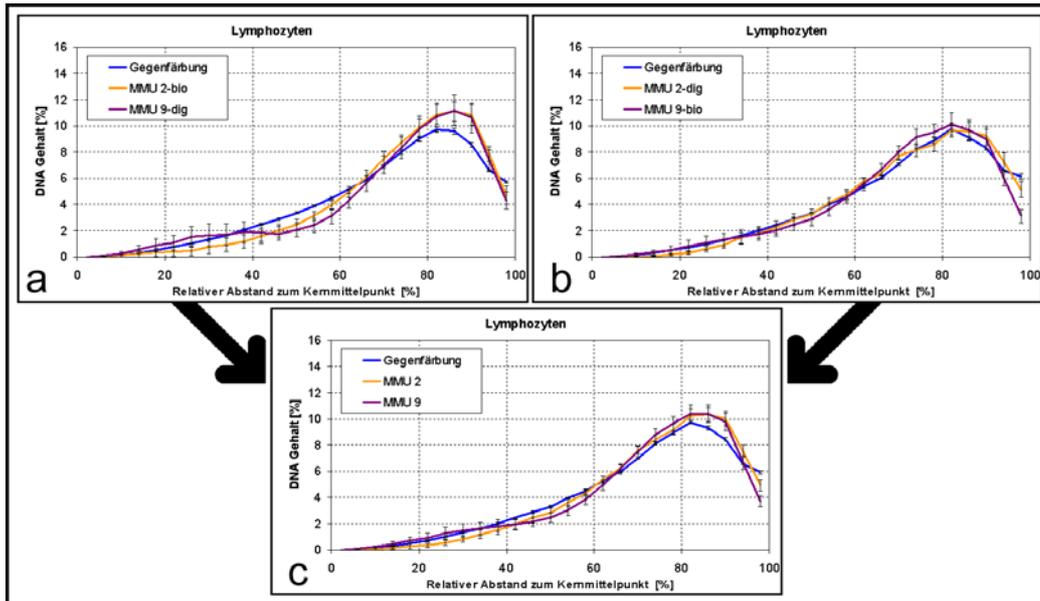


Abbildung 32: Beispiel für eine Einzelexperimentfusion mit wechselnden Haptenen

a, b | Die Bilddaten dieser Einzelexperimenten wurden zusammengeführt und eine erneute 3D-RRD-Berechnung der Gesamtdaten durchgeführt.

c | Daraus ergeben sich in diesem Fall die Kurven von MMU 2 und 9 in Lymphozyten.

Die spezielle Form der Gegenfärbungskurve in 3D-RRD lässt sich mit den optischen Eigenschaften des Mikroskops erklären. Das 3D-RRD-Programm segmentiert den Kern in 25 äquidistante Schalen. Die äußerste Schale des Kerns enthält somit die meisten Voxel. Zur Verteilungsdarstellung werden nun die Helligkeitsintensitäten aller Voxel in einem Kern zusammengezählt und auf 100% normiert. Wenn nun die äußersten Schalen die meisten Voxel enthalten, müssten sie auch den höchsten Wert in der graphischen Darstellung erreichen. Stattdessen nimmt der Wert gegen die letzten Schalen (z. B.: Schale 23, 24 und 25; das entspricht 88-100% des Kerndurchmessers) stark ab und fällt steil gegen null ab. Wegen der Streuung des reflektierten Lichts in x-y Richtung ist es bei der mikroskopischen Aufnahme nicht möglich, die Kerngrenzen als scharfen Rand darzustellen (die 26. Schale wäre der Außenraum mit der Intensität Null, gegen den segmentiert wurde). Die Verwendung eines Gauss-Filters ist für die Segmentierung notwendig und auch dieser Filterprozess trägt dazu bei, dass sich ein Intensitätsgradient am Rand des Zellkerns aufbaut und diesen unscharf erscheinen lässt. So erreichen die Voxel der äußeren Schalen trotz ihrer größeren Anzahl nicht die hohen Intensitätswerte der zahlenmäßig geringeren inneren Voxel mit höherer Intensität.

3.3.2. Test zur Untersuchung des Einflusses von Haptenen und Antikörpern

Um zu untersuchen, ob die Art der verwendeten Haptene und am Nachweise beteiligten Antikörper einen Einfluss auf die radiale Position und die Struktur von Chromosomenterritorien haben, wurde eine Versuchsreihe mit humanen Fibroblasten durchgeführt (siehe auch 2.7). Nach der Detektion der 3D-FISH Präparate wurde festgestellt, dass der Chromosomen-Paint für HSA 19 im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Metaphasen (siehe Abbildung 13) keine einheitlich gefärbten Chromosomenterritorien ergab, sondern ein weit im

Zellkern verstreutes Punktmuster (HSA 19 = grün in Abbildung 33). Zur Interpretation der 3D-RRD Auswertung wurden die Ergebnisse beider Chromosomen-Paints herangezogen.

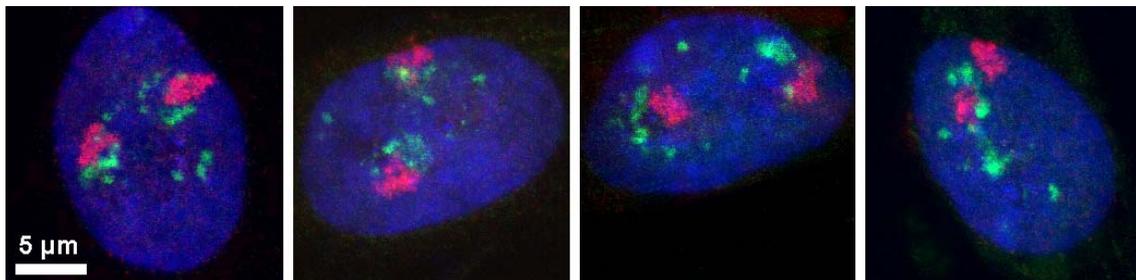


Abbildung 33: Die Projektionen konfokaler Schnitte menschlicher Fibroblastenkerne

HSA 18 in rot und HSA 19 in grün. In dieser Experimentserie zeigten die Chromosomen-Paints für HSA 18 ein kompaktes Territorium, während HSA 19 in mehrere Unterbereiche zerfällt und zerfasert erscheint.

Betrachtet man die radiale Verteilung von HSA 18 (Abbildung 34a), so fällt auf, dass drei Kurven (für 18-bio-Cy3, -dig-Cy3 und -dig-FITC) ihr Maximum annähernd an derselben Position (62-64% des Kernradius) haben und sich auch von der Gestalt her gleichen. Die Kurve, die aus dem Rahmen fällt, gehört zu HSA 18-dig-Cy3. Ihr Maximum liegt bei 82% des Kernradius. Damit unterscheidet sie sich signifikant von den anderen drei Kurven ($p < 0.05$). Die einzelnen Verteilungskurven der unterschiedlich markierten HSA 19 (Abbildung 34b) dagegen lassen keine großen Abweichung erkennen ($p > 0.1$). In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der zusammengefassten Einzelkurven für je ein Chromosom zu sehen. Im Vergleich der beiden Kurven für HSA 18 und 19 erkennt man, dass das Maximum von HSA 19 ein kleines Stück weiter innen liegt als das von HSA 18, aber das Ergebnis ist statistisch nicht signifikant ($p > 0.1$).

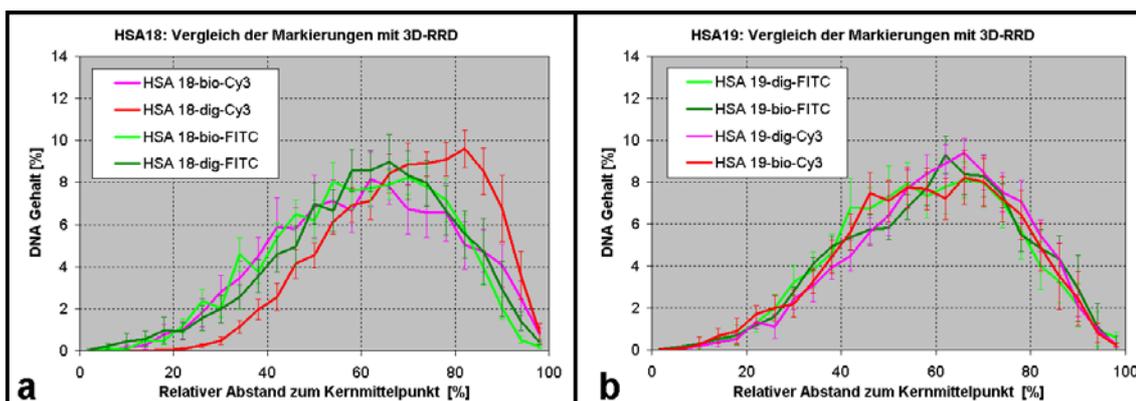


Abbildung 34: 3D-RRD mit HSA 18 und 19 in humanen Fibroblasten

a | Die radiale Verteilung von HSA 18 Chromosomen-Paints: Der mit Digoxigenin markierte und mit Cy3 nachgewiesene Paint für HSA 18 (rot) zeigt eine randständigere Orientierung als die drei anderen Verteilungskurven.

b | Die radiale Verteilung von HSA 19 Chromosomen-Paints: Die Maxima der radialen Verteilung von HSA 19 (b) liegen alle eng zusammen bei ca. 66% des Kernradius.

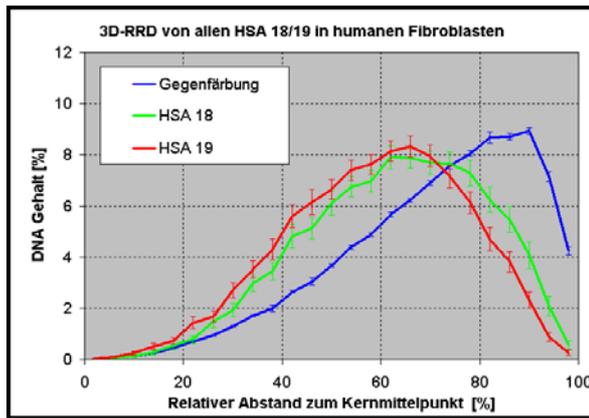


Abbildung 35: Die zusammengefasste 3D-RRD Auswertung von HSA 18 und 19 in humanen Fibroblasten. Dazu wurden die Bilddaten von allen Hapten- und Antikörperkombinationen zusammengeführt. Die Verteilungskurve von HSA 19 liegt geringfügig weiter innen als die von HSA 18.

Die Bildstapel der Territorien von HSA 18 und 19 wurden auch einer Analyse durch das OC-2-Programm unterzogen (Vorgehen siehe 2.10.4). Die gezählten Objektzahlen der acht Datensätze wurden in Abbildung 36 dargestellt. Drei Kurven in Abbildung 36a zeigen über den relevanten Bereich (100-160) mit kleineren Schwankungen einen Wert von vier Objekten. Die Ausnahme bildet die Kurve für HSA 18-dig-FITC. Sie formt ein höheres Plateau und zeigt so eine höhere Anzahl von Objekten über den relevanten Schwellwertbereich an. Der Anstieg liegt durchschnittlich bei 50% und schwankt um die sechs Objekte. Der Objektkurvenverlauf der beiden mit Biotin markierten Chromosomen-Paints von HSA 18 ist nahezu identisch, die unterschiedlichen Antikörper beim Nachweis beeinflussen den Verlauf nicht, obwohl sie auf getrennten Präparaten hybridisiert und detektiert wurden. Die ANOVA mit Post-HocTest der maximalen Objektzahlen ergibt für diesen Fall keinen Unterschied ($p > 0.8$). Dagegen weist die Kurve von HSA 18-dig-FITC im Vergleich zu den anderen Kurven klar signifikante Unterschiede auf (Tabelle 20a und b). Die OC-2 Auswertung von Daten für HSA 19 ergibt Kurven, die in einer stetigen Weise fallend sind (Abbildung 36b). Der Grund dafür sind die schwachen und zergliederten Signale, die bei höheren Schwellwerten einfach verschwinden und nicht erodieren wie es bei mehr kompakten und geschlossenen Chromosomenterritorien der Fall ist. Zwischen den Mittelwerten der maximalen Objektzahlen der HSA 19 Chromosomenterritorien findet sich kein Unterschied ($p > 0.9$; Tabelle 20).

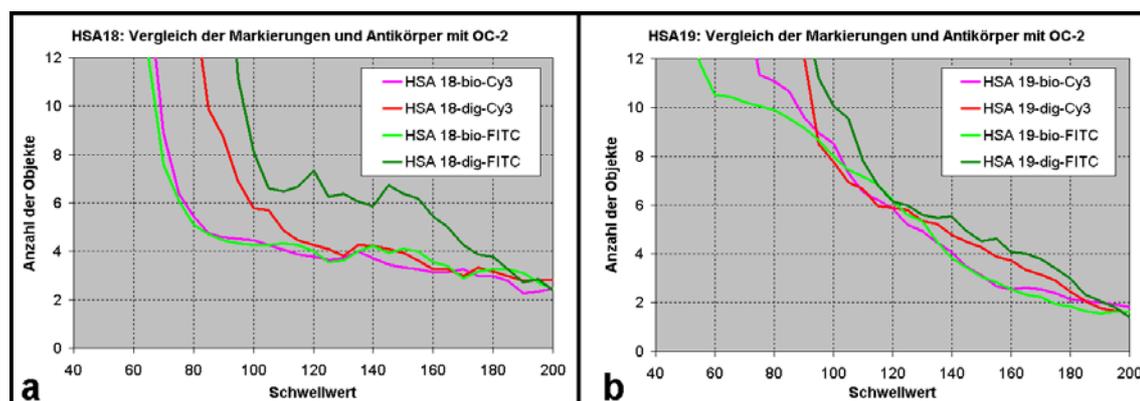


Abbildung 36: Das Ergebnis des Objektzählprogramms OC-2 mit menschlichen Fibroblasten

a | Die vier Kurven der Chromosomen-Paints von HSA 18: Mit der Kombination Digoxigenin-FITC (dunkelgrün) ergeben sich Objektzahlen über 6, ein um ca. 50% erhöhter Werte im Vergleich zu den anderen Kurven.

b | Die vier Kurven der Chromosomen-Paints von HSA 19: Die stetige Abnahme der Objektzahlkurven von HSA 19. Man kann keine Plateaus an den Graphen ausmachen, die Aussagen zu durchschnittlichen Objektzahlen erlauben würden.

ANOVA für HSA 18: $F(3,62)=12.7$; Sign.<0.001			
a			
Post-Hoc: SIDAK			
HSA 18-	dig-FITC	bio-Cy3	dig-Cy3
bio-Cy3	p<0.001		
dig-Cy3	0.03	0.223	
bio-FITC	p<0.001	0.896	0.226
ANOVA für HSA 19: $F(3,62)=0.393$; Sign.=0.76			
b			
Post-Hoc: SIDAK			
HSA 19-	dig-FITC	bio-Cy3	dig-Cy3
bio-Cy3	0.937		
dig-Cy3	0.997	0.998	
bio-FITC	0.919	1	0.998

P-Wert
p>0,1
0,1>p>0,05
0,05>p>0,01
0,01>p>0,005
0,005>p>0,001
p<0.001

Tabelle 20: Ergebnisse der statistischen Auswertung der maximalen Objektzahlen des Markierungs- und Antikörpertests.

a | Die maximalen Objektzahlen von HSA 18-dig-FITC unterscheiden sich laut dem Post-Hoc Test signifikant von denen anderen Kombinationen.

b | Bei HSA 19 ergeben weder die ANOVA noch die Post-Hoc-Tests signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen markierten und nachgewiesenen Chromosomen-Paints

Für den Markierungs- und Antikörpertest mit menschlichen Fibroblasten muss festgehalten werden, dass es bei der Analyse von HSA 18 mit den zwei Methoden (3D-RRD und OC-2), jeweils eine Teilkurve gab, die sich schlecht in das Gesamtbild einfügte. Dieser Tatsache wird in der Diskussion Rechnung getragen. HSA 19 kann aufgrund des zerfaserten 3D-FISH Signals nur eingeschränkter Aussagewert zugerechnet werden.

Zusammenfassung Markierungs- und Antikörpertest:

Es kann ein gewisser Einfluss von Haptenen und Antikörpern auf die Ergebnisse des 3D-RRD-Programms festgestellt werden. Mit Digoxigenin markierte Chromosomenterritorien, die mit Cy3-Antikörpern nachgewiesen wurden, können räumlich konzentriertere, intensivere Signale ergeben, als wenn das gleiche Territorium mit Biotin und FITC/Alexa488-Antikörpern nachgewiesen wird. Als Konsequenz daraus wird vorgeschlagen, Versuche so anzulegen, dass beide Markierungsvarianten wechselseitig verwendet werden. Dadurch werden die möglichen Unterschiede ausgeglichen und die Daten durch eine interne Kontrolle automatisch belastbarer. Winkel- und Abstandsmessungen sind davon nicht betroffen. Auch die Ergebnisse des Objektzählprogramm zeigen keinen direkten Einfluss von Haptenen und Antikörpern.

3.4. Die relative radiale Verteilung der Chromosomen ist größen- und gendichteabhängig, sowie zelltypspezifisch

Die Experimente waren so angelegt, dass von jeder Chromosomenkombination zwei Hybridisierungen gemacht wurden, die sich durch die umgekehrte Haptenmarkierung der Chromosomen-Paints unterschieden. Mit der Frage, ob man diese beiden Einzelergebnisse zusammenfassen konnte, beschäftigte sich der vorhergehend Abschnitt. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass eine Zusammenlegung der Einzeldatensätze statthaft ist.

Für die in Abbildung 37 gezeigten Verteilungskurven wurden 836 Bildstapel von Chromosomenterritorien mit dem 3D-RRD-Programm ausgewertet, zusätzlich die dazugehörigen Bilder der Kerngegenfärbungen, deren Kurven für eine besser Übersichtlichkeit weggelassen wurden (Gegenfärbungen und komplette Graphen siehe Zusatzmaterial).

Bei **Lymphozyten** (Abbildung 37a) zeigte sich der deutlichste Unterschied, der überhaupt in allen untersuchten Zellen festzustellen war. Das genreichste Chromosom MMU 11 ist viel weiter innen zum Kernmittelpunkt positioniert als alle anderen untersuchten Chromosomen in diesem Zelltyp. Die Chromosomen MMU 2 und MMU 9 nehmen eine mittlere radiale Stellung ein und die genarmen MMU 1, MMU 14 und MMU X sind am Rand der Zellkerne positioniert. Die dazugehörigen p-Werte sind in Tabelle 21 aufgelistet. Trägt man die Mittelwerte der erhaltenen Mediane gegen die Gendichte im jeweiligen Chromosom auf, so zeigen die Chromosomen in diesem Zelltyp eine gendichteabhängige Verteilung. Durch eine steile Trendlinie nahe an den Datenpunkten wird ein starker Zusammenhang sichtbar (Abbildung 38a). Die lineare Regressionsanalyse ergab für die gendichteabhängige Verteilung einen Korrelationskoeffizienten von $R=0,62$ für Lymphozyten, den höchsten Wert von allen Zelltypen (Abbildung 38). Die Wahrscheinlichkeitsanalyse ergibt für diese Korrelation einen p-Wert kleiner als 0.001, somit kann die Nullhypothese, dass die Korrelation zufällig zustande kam, abgelehnt werden.

Im statistischen Vergleich ist die innere Position des MMU 11 immer signifikant verschieden von allen anderen Chromosomenterritorien in diesem Zelltyp. Dies lässt sich an den p-Werten erkennen, die signifikante Unterschiede von MMU 11 zu allen anderen Chromosomen in Lymphozyten belegen (Tabelle 21, S. 81). Auch wenn man die radiale Position von Chromosom MMU 11 in Lymphozyten mit den Anordnungen in Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen vergleicht, ergeben sich signifikante Unterschiede (Tabelle 22, S. 81). Des weiteren ergeben sich noch Unterschiede zwischen den MMU 9 und MMU X, ansonsten liefern die Vergleiche von Chromosomenterritorien innerhalb der Lymphozyten keine weiteren signifikanten Auffälligkeiten. A. Brero veröffentlichte bereits Verteilungsdaten von MMU 11 und X in Mauslymphozyten (G0-Phase) mit ebenfalls signifikanten Unterschieden (Brero, 2004). Im Vergleich zu diesen in G0-Phase erhobenen Daten kann man keinen Unterschied zu meinen Lymphozyten in S-Phase feststellen. In den flächenmäßig großen und flachen **Fibroblasten** (Abbildung 37b) sind die Unterschiede in der relativen radialen Verteilung der einzelnen Chromosomen im Zellkern so gering, wie bei sonst keinem hier untersuchten Zelltyp. Nur der Vergleich von MMU 1 mit MMU 11 ergibt einen hochsignifikanten Unterschied von $p=0.001$. Die Unterschiede zwischen MMU 1 und MMU 2 sowie MMU 1 und MMU 9 sind noch so groß, dass das Signifikanzniveau von 5% noch unterschritten wird. Zusammen mit dem MMU 11 liegt auch in Fibroblasten das relativ genreiche

MMU 2 weiter innen als die genärmeren MMU 1, MMU 14 und MMU X. Weitere hochsignifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht aus diesen Beobachtungen (Tabelle 21). Eine leichte größenabhängige Verteilung von großen Chromosomen zum Rand hin kann man beobachten, wenn auch der Korrelationskoeffizient ($R=0.14$) dafür insgesamt niedrig ist und kleiner als der für die Verteilung nach Gendichte ($R=0.16$) (Abbildung 38b).

ES-Zellen (Abbildung 37c) kommen von der Form den Lymphozyten am nächsten, wenn sie ausgehend von ES-Zellkolonien vereinzelt wurden. Sie sind kugelförmig mit unregelmäßigen leichten Einbuchtungen. Trotz der ähnlichen Form gibt es Unterschiede bei der Verteilung der Chromosomenterritorien. So ist zwar das MMU 11 das Chromosom, das am weitesten innen liegt, aber an signifikanten Unterschieden ergibt sich nur der zu MMU X. Im Vergleich zu den Lymphozyten liegen die Chromosomen MMU 1, 9, 14 und X bei ES-Zellen insgesamt weiter innen, Die MMU 2 liegen in ES-Zellen und Lymphozyten an ähnlicher Position, bei Makrophagen wandert das MMU 2 weiter nach außen, bei Fibroblasten weiter nach innen. MMU 11 ist bei ES-Zellen im Vergleich zu Lymphozyten aus der Kernmitte herausgerückt. Nur das MMU X liegt in einer so randständigen Position, dass es signifikante Unterschiede zu allen anderen Chromosomen aufweist (Tabelle 21). Die Korrelationskoeffizienten sind für beide Verteilungsmodelle gleich ($R=0.21$) (Abbildung 38c).

In postmitotischen **Makrophagen**, die aus den ES-Zellen differenziert wurden, zeigen sich drei Unterschiede von MMU 1 zu den MMU 2, 9, und 11. MMU 1 hat in Makrophagen (zusammen mit MMU 14 und X) die randständigste Lage eingenommen (Abbildung 37d). Ebenfalls zeigt das Chromosomenpaar MMU 11 und X eine klaren Trennung ($p=0.04$) in zentrale und periphere Lage (Tabelle 21). Beim Übergang von ES-Zellen zu Makrophagen tritt eine signifikante Positionsveränderungen beim Chromosomenterritorium MMU 1 auf ($p=0.009$; Tabelle 22). Die durchschnittlichen Medianwerte für MMU 1 steigen von 71% in ES-Zellen auf 77% in Makrophagen. Das größte Chromosom hat die randständigste Lage eingenommen. Der Korrelationskoeffizient für eine gendichteabhängige Verteilung ist in Makrophagen kleiner als der R-Wert für eine größen-abhängige Verteilung ($R=0.21$) (Abbildung 38d).

Die p-Werte für die beobachteten Korrelationen befinden sich für alle Verteilungen unter dem Signifikanzniveau von 5%, es ist also unwahrscheinlich, dass die Beobachtungen nur auf Zufall beruhen.

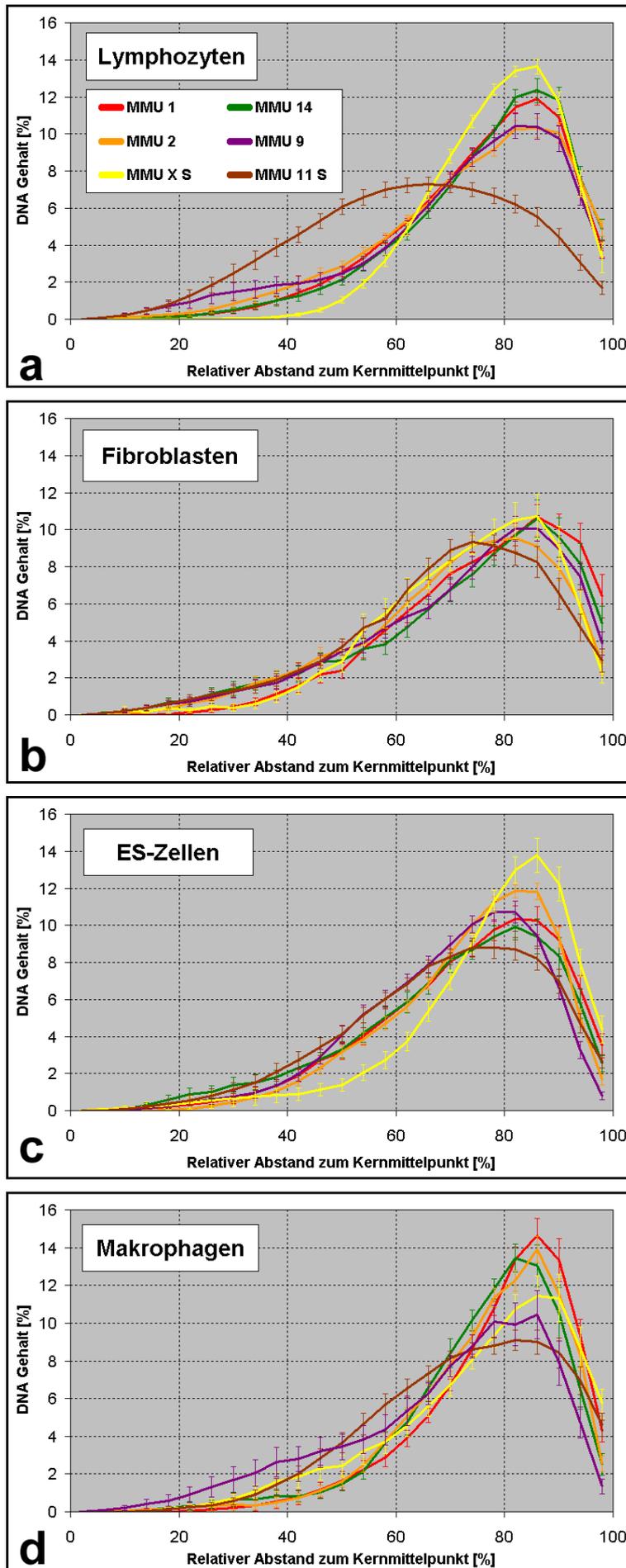


Abbildung 37: Radiale Verteilung der untersuchten Chromosomen MMU 1, 2, 9, 11, 14 und X in Lymphozyten, Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen. Die eingezeichneten Fehlerbalken bezeichnen die Standardfehler des Durchschnitts (standard error of the mean). Die farbige Kodierung für die unterschiedlichen Chromosomen bei den Lymphozyten gilt auch für die anderen Zelltypen.

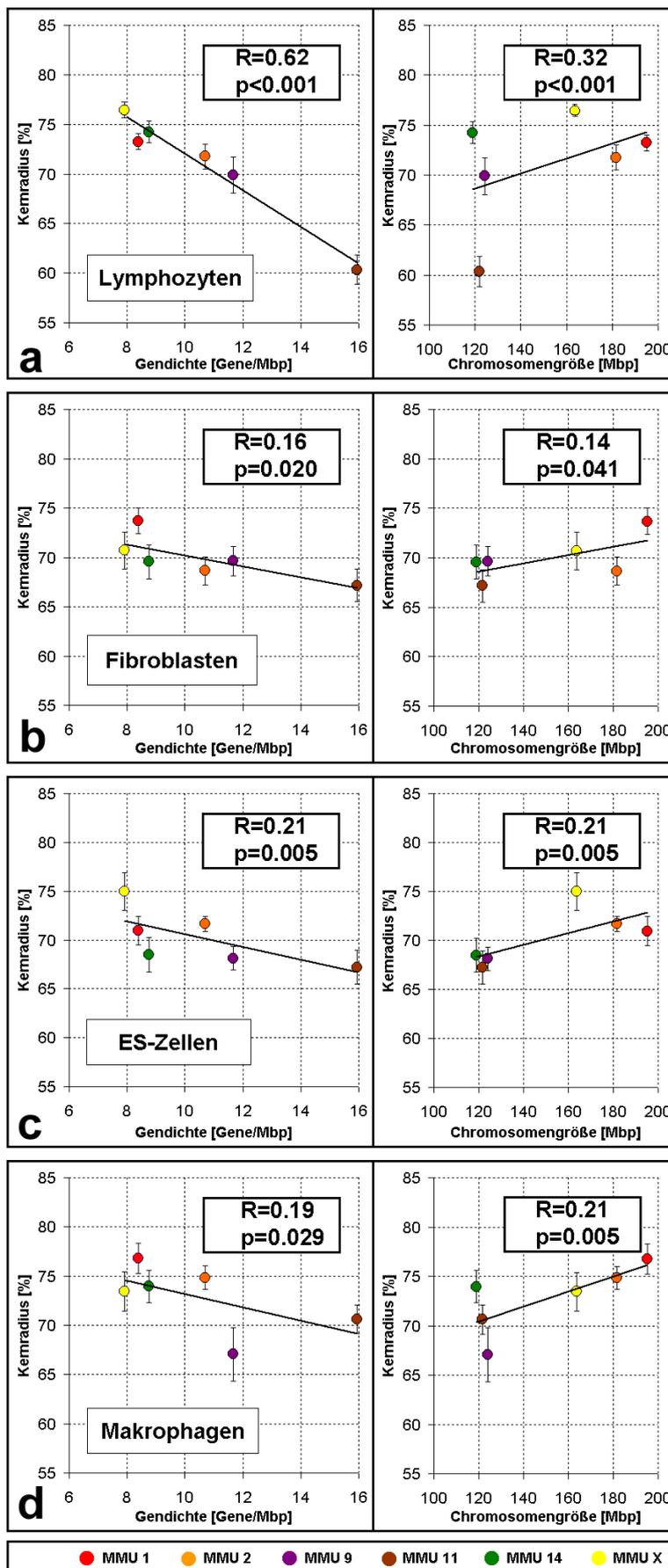


Abbildung 38: Die Auswertung der radialen Verteilung durch lineare Regressionsanalyse.

Linke Spalte: Die Mittelwerte der Mediane (Fehlerbalken: SEM/standard error of the mean) aufgetragen nach der Gendichte auf den einzelnen Chromosomen.

Rechte Spalte: Die Mittelwerte der Mediane aufgetragen gegen die Chromosomengröße. Zusätzlich wurde in Excel eine Trendlinie für die eingezeichneten Mittelwerte der Mediane eingefügt. In den Kästchen gibt R (von 0 bis 1) den Korrelationskoeffizienten für die Gesamtheit der Medianwerte der Chromosomenterritorien in Abhängigkeit von Gendichte bzw. Chromosomengröße an. Darunter der p-Wert, die Wahrscheinlichkeit, dass die beobachtete Korrelation lediglich auf einem Zufallsereignis beruht.

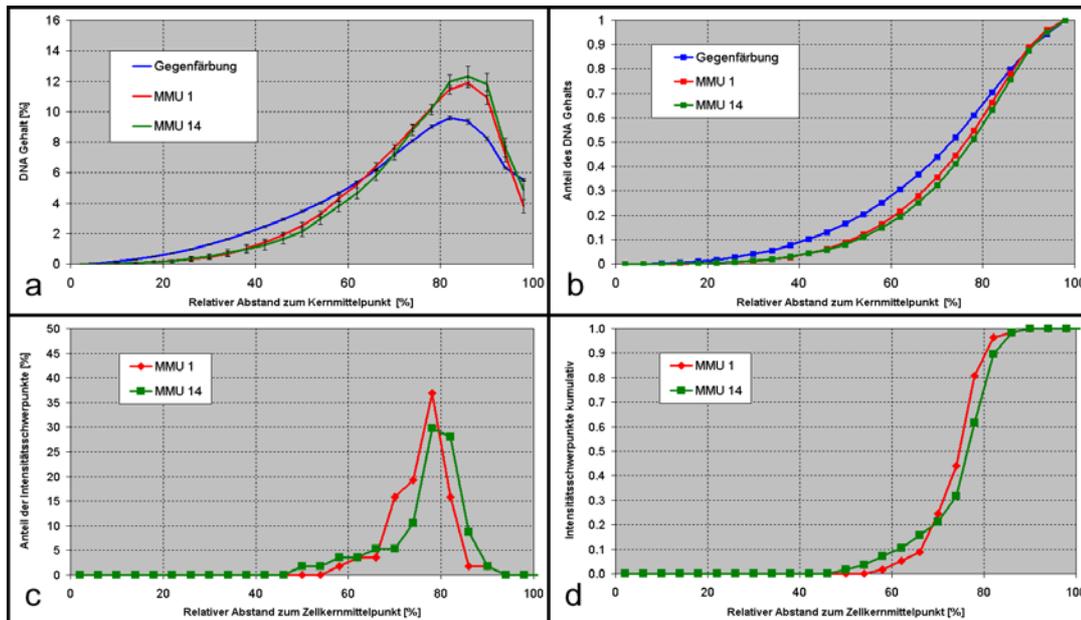


Abbildung 39: Vier Arten der Darstellung radialer Verteilung. Als Beispiel dienen die Ergebnisse für MMU 1 und MMU 14 in Lymphozyten.

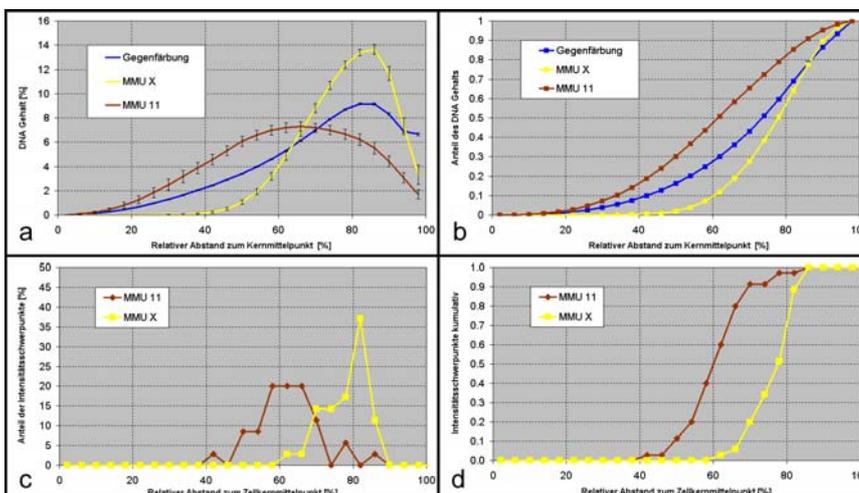
a | zeigt die vom 3D-RRD-Programm ausgegebenen Daten der prozentualen radialen Verteilung mit Fehlerbalken der Standardabweichung.

b | werden dieselben Werte in kumulativen Kurven dargestellt. Es besteht nur ein geringer vertikaler Abstand zwischen den Kurven von MMU 1 und 14.

c | Nach der Berechnung der radialen Verteilungen mit dem Programm 3D-RRD erhält man durch ein zusätzliches Programmelement (siehe 2.11.1) die einzelnen Mediane für jede Verteilung (in dem Fall: Chromosomen-Paints). In Graph c wird die Häufigkeitsverteilung der Medianwerte der einzelnen Kerne aufgetragen. Beispiel: In über 35% der Zellkerne haben die Chromosomen MMU 1 ihren Intensitätsschwerpunkt bei 78% des Kernradius.

d | Die Häufigkeitsverteilung der Mediane kann man auch wieder kumulativ zeichnen, wobei wie in (b) kaum vertikaler Abstand festgestellt werden kann.

Abbildung 40: Die Art der Darstellung ist wie in Abbildung 39, aber hier sind die Kurven der Auswertung von MMU 11 und MMU X in Lymphozyten gezeigt.



Die kumulativen Kurven (b und d) ergeben hier große vertikale Abstände. Diese Größe (D_{max}) spielt eine wichtige Rolle im angewandten Kolmogorov-Smirnov-Test.

Chromosomenpaare	Lymphozyten (S)	Fibroblasten	ES-Zellen	Makrophagen	Gendichte
MMU 1 — MMU 2	0.889	0.046	0.529	0.036	Hoch
MMU 1 — MMU 9	0.255	0.039	0.112	0.014	Mittel
MMU 1 — MMU 11	<0.001	0.001	0.22	0.013	Niedrig
MMU 1 — MMU 14	0.064	0.134	0.22	0.24	
MMU 1 — MMU X	0.028	0.549	0.014	0.291	
MMU 2 — MMU 9	0.815	0.448	0.253	0.076	
MMU 2 — MMU 11	<0.001	0.646	0.157	0.1	
MMU 2 — MMU 14	0.049	0.468	0.054	0.604	
MMU 2 — MMU X	0.057	0.051	0.001	0.38	
MMU 9 — MMU 11	<0.001	0.843	0.811	0.589	
MMU 9 — MMU 14	0.143	0.947	0.204	0.127	
MMU 9 — MMU X	0.002	0.448	<0.001	0.107	
MMU 11 — MMU 14	<0.001	0.442	0.367	0.264	
MMU 11 — MMU X	<0.001	0.097	<0.001	0.04	
MMU 14 — MMU X	0.166	0.417	0.002	0.377	

P-Wert
p>0,1
0,1>p>0,05
0,05>p>0,01
0,01>p>0,005
0,005>p>0,001
p<0.001

Tabelle 21: Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der radialen Verteilung zwischen Chromosomenterritorien.

Die p-Werte beziehen sich auf die Vergleiche zwischen Chromosomenterritorien jeweils innerhalb eines Zelltyps. Rote Felder weisen auf höchst signifikante Unterschiede hin. Der in Abbildung 40 dargestellte große Unterschied zwischen MMU 11 und MMU X in Lymphozyten ist nur einer von fünf Vergleichen in Lymphozyten, bei denen der p-Wert kleiner als 0.001 war. MMU 11 war in Lymphozyten zu jedem anderen Chromosom verschieden, als weiterer signifikanter Unterschied kann noch die Verteilung von MMU 9 und MMU X mit $p=0.002$ dazugerechnet werden. In ES-Zellen gibt es noch fünf signifikante ($p<0.05$) Unterschiede, alle durch die randständige Lage des MMU X verursacht.

Zelltypen Chromosomen	Lymphozyten Fibroblasten	Lymphozyten ES Zellen	Lymphozyten Makrophagen	Gendichte
MMU1	0.443	0.173	0.005	Hoch
MMU2	0.212	0.408	0.371	Mittel
MMU9	0.757	0.04	0.295	Niedrig
MMU11	0.01	<0.001	<0.001	
MMU14	0.018	0.006	0.904	
MMUX	0.001	0.625	0.049	

Zelltypen Chromosomen	Fibroblasten ES Zellen	Fibroblasten Makrophagen	ES Zellen Makrophagen	P-Wert
MMU1	0.115	0.067	0.009	p>0,1
MMU2	0.014	0.032	0.066	0,1>p>0,05
MMU9	0.057	0.972	0.469	0,05>p>0,01
MMU11	0.51	0.047	0.201	0,01>p>0,005
MMU14	0.863	0.308	0.098	0,005>p>0,001
MMUX	0.106	0.3	0.468	p<0.001

Tabelle 22: Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der radialen Verteilung zwischen Zelltypen.

Die p-Werte, die sich aus den Vergleichen jeweils eines Chromosomenterritoriums zwischen den Zelltypen ergeben. Es bestätigt sich die Sonderstellung der Lymphozyten, die im Vergleich zu anderen Zelltypen auf die meisten hoch signifikanten Unterschiede kommen. Dabei spielen die besonders unterschiedlich verteilten Chromosomen MMU 11 und X eine Rolle.

Zusammenfassung radiale Verteilung:

Die Untersuchung der relativen radialen Verteilungen von sechs Chromosomenterritorien der Maus ergaben sowohl eine gendichteabhängige, als auch eine größenabhängige Verteilung. Ein kugeligen Lymphozytenkern korreliert die Gendichte stärker mit der radialen Verteilung als Größeneffekte. In Fibroblasten sind beide Korrelationen schwächer, aber nachweisbar, in ES-Zellen sind die Korrelationskoeffizienten etwas höher und für beide Verteilungsmodelle gleich, in Makrophagen überwiegt die größenabhängige Verteilung der Chromosomenterritorien. Das genreichste Chromosom MMU 11 ist in den Lymphozyten für die meisten Unterschiede zu anderen Chromosomenterritorien verantwortlich, während sich das MMU X in den untersuchten männlichen ES-Zellen durch seine extreme Randlage von den anderen unterscheidet. In den Fibroblasten und Makrophagen gibt es vergleichsweise wenig signifikante Unterschiede zwischen den radialen Positionen der untersuchten Chromosomenterritorien.

3.5. Lage und Anzahl der Chromozentren ist zelltypspezifisch

Wie A. Brero zeigen konnte, sind die Signale, die man mit DNA-Sonden des „mouse major-satellite“ (MSM) mittels FISH nachweisen kann, zum überwiegenden Teil identisch mit den hervorstechend hellen Bereichen, die sich mit dem AT-selektivem DNA-Farbstoff TO-PRO-3 anfärben lassen. Bei diesen Bereichen handelt es sich um Bereiche dichten Heterochromatins, sogenannte Chromozentren, in denen sich wenige bis viele Zentromere verschiedener Chromosomen zusammenlagern. Die Chromozentren sind keine irreversiblen Zusammenlagerungen, sondern können sich während der Zelldifferenzierung entweder aufspalten oder weiter fusionieren, in Einzelfällen sogar bis zu einem einzigen Chromozentrum (Kösem, 2005).

3.5.1. Die Lage der Chromozentren:

Durch die TO-PRO-3-Färbung war es möglich, an den bisher untersuchten Zellen auch die radiale Verteilung der Chromozentren einfach zu bestimmen. Die Hauptanteile der Chromozentren-DNA liegt in jedem Zelltyp weiter innen als die gesamte DNA des Zellkerns (Gegenfärbung). Dies gilt für alle untersuchten Zelltypen (Abbildung 41). Die zentralsten Anordnungen der Chromozentren verglichen mit den anderen Zelltypen findet sich in Fibroblasten und Makrophagen, bei Lymphozyten und ES Zellen liegen sie mehr zum Rand hin gelagert. Die Statistikergänzung des 3D-RRD Programms liefert auch für die Chromozentren Medianwerte. Jeder einzelne dieser Zahlenwerte gibt den relativen Abstand zum Kernmittelpunkt an, an dem sich 50% der Gesamtintensität der Signals innerhalb und 50% der Gesamtintensität des Signals außerhalb dieses Punkts befinden (Median). Werden die Mediane zusammengefasst, kann man anhand der Häufigkeitsverteilung schon erkennen, wo Unterschiede zwischen den Zelltypen zu erwarten sind (Abbildung 42a). Die Mittelwerte der Mediane und der dazugehörigen Gegenfärbungen zeigen auch noch einmal die klare Orientierung der Chromozentren zum Kernmittelpunkt hin (Abbildung 42b). Die Standardfehler der Durchschnittswerte sind klein. Die Gegenfärbungen unterscheiden sich mit $p < 0.001$ immer hochsignifikant von den Chromozentren (Tabelle 23a). Wird die Lage der Chromozentren zwischen den Zelltypen verglichen, ergeben sich signifikante Unterschiede der Chromozentrenlokalisierung

zwischen allen Zelltypen, mit Ausnahme von Fibroblasten und Makrophagen, die gleiche Verteilung aufweisen (Abbildung 42b und Tabelle 23b).

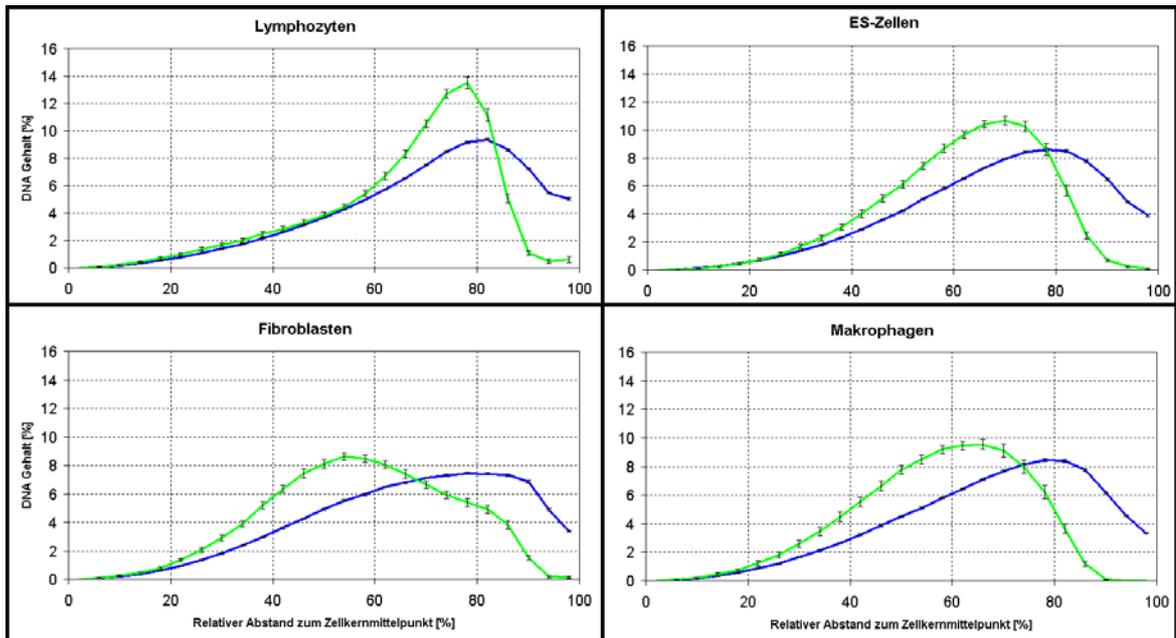


Abbildung 41: Die radiale Verteilung der Chromozentren (para- und perizentrisches Heterochromatin) in den verschiedenen Zelltypen.

Die Masse des DNA-Gehalts der Chromozentren (grün) liegt zentraler verteilt als die Gegenfärbung (blau). Besonders in Fibroblasten ist eine Orientierung der Chromozentren weg vom Kernrand festzustellen.

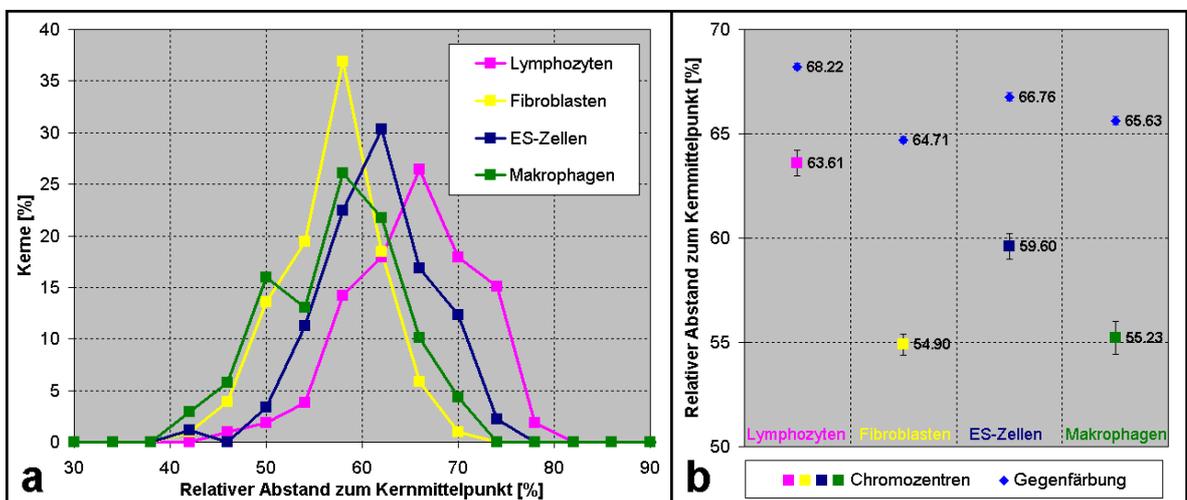


Abbildung 42: Die Medianen der radialen Verteilung der Chromozentren

a | Die Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Mediane der Chromozentren. Die Medianwerte der Chromozentren jedes Kerns wurden in die 25 Schalen der radialen Auswertung einklassiert.

b | Die Mittelwerte der Mediane für Chromozentren und DNA-Gegenfärbung. Fibroblasten und Makrophagen weisen durchschnittlich die zentralste Anordnung von Chromozentren auf, die bei 55% des Kernradius liegen Über jedem Wert der Chromozentren liegen die Mittelwerte der Gegenfärbungen.

a	Lymphozyten (n=35)	Fibroblasten (n=103)	ES-Zellen (n=89)	Makrophagen (n=69)	P-Wert
	p<0.001	p<0.001	p<0.001	p<0.001	
b	Zelltypen	Fibroblasten (n=103)	ES-Zellen (n=89)	Makrophagen (n=69)	p>0,1
	Lymphozyten (n=35)	p<0.001	p<0.001	p<0.001	0,1>p>0,05
	Fibroblasten (n=103)		p<0.001	0.322	0,05>p>0,01
	ES-Zellen (n=89)			0.001	0,01>p>0,005
					0,005>p>0,001
					p<0.001

Tabelle 23: Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der radialen Verteilung der Chromozentren.

a | Die radialen Positionen von Chromozentren unterscheiden sich immer von denen der Kerngegenfärbungen

b | Die radiale Position von Chromozentren ist zum Teil zelltypspezifisch: Nur zwischen Fibroblasten und Makrophagen kann man keinen Unterschied feststellen.

A. Brero hat ebenfalls die Lokalisation von Heterochromatinbereichen untersucht (Brero, 2004). Für einen Vergleich mit diesen Daten wurden die beiden Datensätze mit durchschnittlichen relativen Radien der Chromozentren in Lymphozyten, ES-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten in ein Diagramm eingetragen (Abbildung 43). Die Werte zeigen eine einheitliche horizontale Abweichung, was aber die Vergleichbarkeit der Daten grundsätzlich nicht beeinflusst. Die jeweiligen zelltypspezifischen Verteilungen der Chromozentren bestätigen sich.

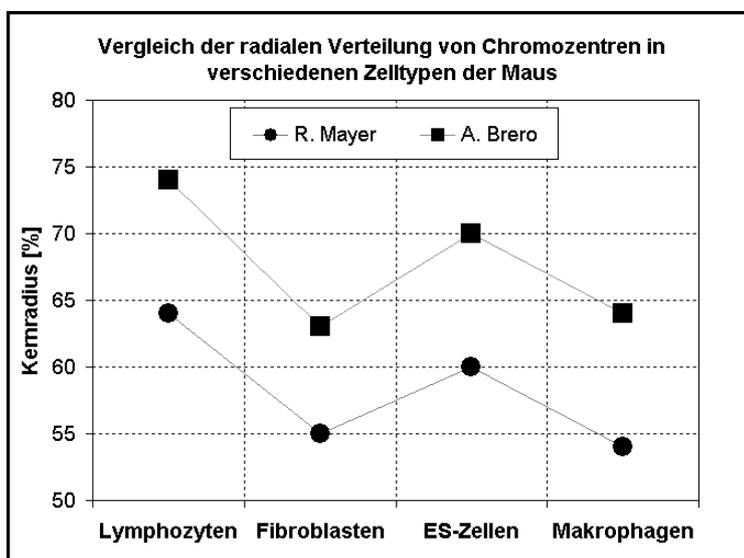


Abbildung 43: Vergleich der radialen Verteilung von Chromozentren in verschiedenen Zelltypen der Maus. Nur zur Verdeutlichung wurden die Punkte durch Linien verbunden. Bei A. Brero liegen alle Chromozentren, bezogen auf den Kernradius, um etwas mehr als 10% weiter außen (Brero, 2004).

3.5.2. Die Anzahl der Chromozentren:

Als Maß für die Anzahl der Chromozentren in den verschiedenen Zelltypen können die Ergebnisse des OC-2 Programm (Funktionsweise siehe 2.10.4) herangezogen werden, denn mit steigendem Schwellwert treten die Chromozentren als helle Objekte hervor (Abbildung 20, S. 56, erste Bildzeile). Dabei können eventuell auch kleinere Objekte (Hintergrund), die nicht zu den Chromozentren gehören, fälschlich mitgezählt werden. Der entstehende Fehler bleibt aber klein, da Mittelwerte der Objektzahlen über viele Bildstapel berechnet werden. Die prinzipielle Vergleichbarkeit zwischen den Zelltypen bleibt auch unberührt, wenn man annimmt, dass in jedem Zelltyp vergleichbare

Hintergrundsignale auftauchen könnten. Die möglichen Fehler werden billigend in Kauf genommen, weil die automatisierte Messmethode mit OC-2 um vieles schneller und komfortabler arbeitet als eine umständliche interaktive Messung mit einem Bildprogramm (z.B. Zeiss Image Browser).

Die Chromozentren, die aufgrund ihrer starken Intensität über eine weite Strecke der Schwellwerte relativ stabil bleiben, wurden gezählt. Die Objektzahlen eines Zelltyps sind für jeden Schwellwertschritt gemittelt. Daraus ergeben sich die Kurven in Abbildung 44a. Wenn sich darin abzeichnet, dass die vielen Hintergrundsignale bei niedrigen Schwellwerten verschwinden und die Zellkernsignale sich in die hellen Chromozentren aufzuspalten beginnen, werden die Maxima der Kurven als Chromozentrenzahl angenommen. Fibroblasten haben die meisten Chromozentren, ein Plateau der Kurve liegt bei 18. Klarere Maxima im Kurvenverlauf erreichen die anderen Zelltypen: Lymphozyten in S-Phase erreichen Werte um 12, ES-Zellen und Makrophagen sie weisen durchschnittlich um die zehn Chromozentren pro Zellkern auf.

Die Abbildung 44b dagegen zeigt die Anzahl der Chromozentren, wenn man den Durchschnitt aus den Maximalwerten jeder einzelnen Kurve ab einem Schwellwert von 90 bildet. Da man Kurven wie in Abbildung 44a nicht statistisch miteinander vergleichen kann, muss man die Gruppen der einzelnen Maximalwerte miteinander vergleichen (ANOVA). Der Maximalwert der Objektzahlen wird von jedem einzelnen Kern bestimmt. Der Schwellwert 90 hat sich bei Betrachtung der Daten als geeignet herausgestellt, weil um diesen Wert 90 herum die Objekte, die zum Hintergrund eines Bildes gehören und nicht zum eigentlichen Signal, bereits unter der Schwellwertgrenze liegen und nicht mehr mitgezählt werden. Bei Einzelbildern mit helleren Hintergrundsignalen sollte der Schwellwert individuell über die 90 angehoben werden. Von den Maximalwerten eines Zelltyps wird der Mittelwert gebildet. Mit angegeben in Abbildung 44b ist die Standardabweichung als schwarzer Indikator.

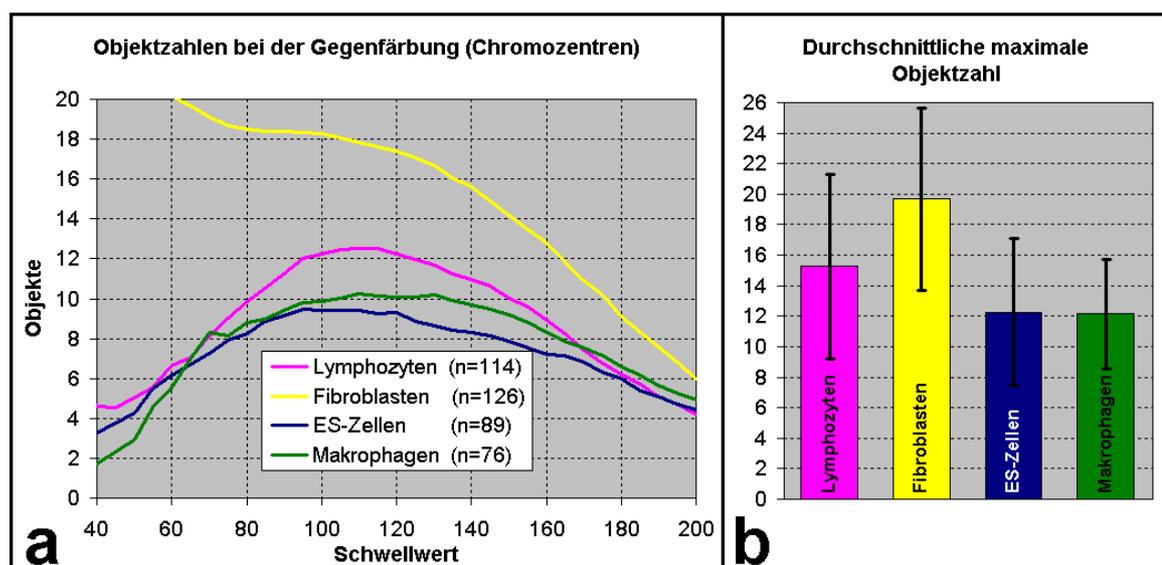


Abbildung 44: Zwei graphische Darstellungen der Chromozentrenzahl.

a | Der Objektkurvenverlauf der TO-PRO-3 Gegenfärbung in den vier Zelltypen.

b | Die durchschnittlichen maximalen Objektzahlen jeder Kernserie, ab einem Schwellwert von 90, dargestellt mit den Standardabweichungen der maximalen Objektzahlen.

Objektzahlen können aus beiden Darstellungen abgelesen werden. Der Wert des Maximums der zusammengefassten Objektkurven Abbildung 44a oder man

bestimmt einen Durchschnittswert aus den maximalen Objektzahlen der Einzelkurven. Letzterer ist immer etwas höher, da er nur aus Maximalwerten besteht (siehe Abbildung 44a und b). Als Ergebnis für die Chromozentrenzahl nehme ich den Mittelwert der beiden Werte an, um noch einmal Ungenauigkeiten auszugleichen. Ähnlich wie bei der radialen Verteilung der Chromozentren, geht es hier mehr um die relativen Unterschiede zwischen den Zelltypen, als um einen exakten Zahlenwert. Die Chromozentrenzahl bei Lymphozyten liegt so um 13,8, bei Fibroblasten um 18,9, bei ES-Zellen um 10,9 und bei Makrophagen um 11,2 Chromozentren pro Kern. Die Unterschiede zwischen den gefundenen maximalen Chromozentrenzahlen sind **nur** zwischen ES-Zellen und Makrophagen **nicht** signifikant voneinander (p-Werte siehe Tabelle 24).

ANOVA für Chromozentren: $F(3,432)=52.7$; $\text{Sign.}<0.001$

Post-Hoc: SIDAK

Chromozentren	Lymphozyten	Fibroblasten	ES-Zellen
Fibroblasten	p<0.001		
ES-Zellen	0.001	p<0.001	
Makrophagen	0.001	p<0.001	0.998

Tabelle 24: Die Ergebnisse der Post-Hoc Tests nach der ANOVA für die maximalen Objektzahlen der Chromozentrenbestimmung mit OC-2. Die Zahl der Chromozentren unterscheidet sich nicht zwischen ES-Zellen und Makrophagen.

Ein Vergleich meiner Ergebnisse (farbig) der Chromozentrenanzahl mit Werten, die A. Brero durch manuelles Zählen von FISH-Signalen (schwarz) erhalten hat (Brero, 2004) ist in Abbildung 45 dargestellt.

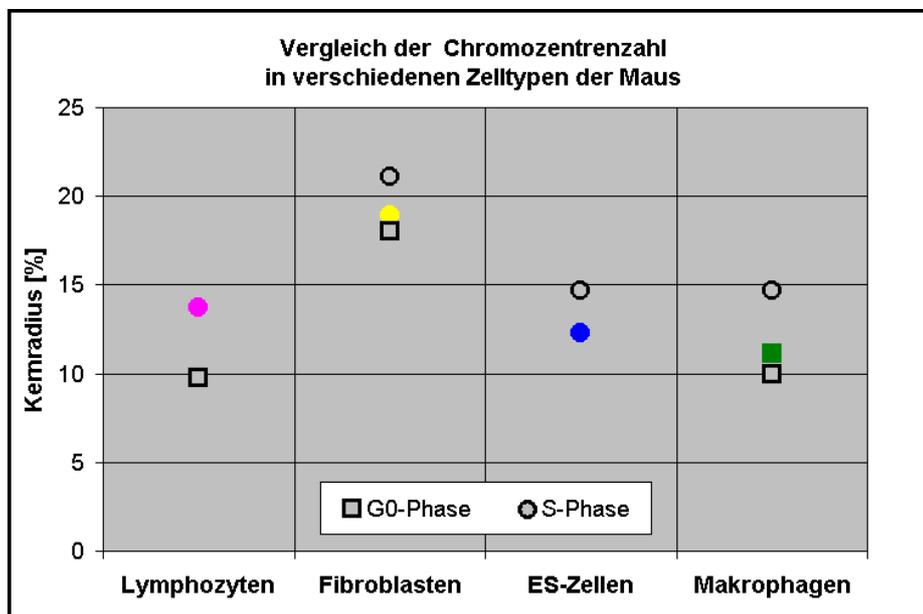


Abbildung 45: Anzahl der mit OC-2 bestimmten Chromozentrenzahlen.

Zum Vergleich sind die Chromozentrenzahlen mit schwarz umrandeten Symbolen angegeben, die A. Brero gezählt hat (Brero, 2004). Die Form der Datenpunkte gibt Auskunft über den Zellzyklusstatus der ausgewerteten Kerne, G0-Phase oder S-Phase. Die Unterschiede können zum einen durch die automatische Auszählung mit OC-2 zustande kommen. Das Programm zählt auch hellere Bereiche in der Gegenfärbung mit, die möglicherweise nicht zu den Chromozentren gehören.

3.6. Volumen der Zellkerne

Das 3D-RRD-Programm ermöglicht es auch, die Kernvolumina der verschiedenen Zelltypen zu errechnen (siehe 2.10.1). In Abbildung 46 sind die Kernvolumina der Größe nach sortiert dargestellt. Die Lymphozyten stellen den kleinsten Wert mit $297 \mu\text{m}^3$ und die folgenden Werte sind im Durchschnitt immer kleiner als die anderen Zelltypen, obwohl von allen das Volumen 400 bis $600 \mu\text{m}^3$ erreicht wird. Lymphozyten unterscheiden sich signifikant von Fibroblasten und ES-Zellen, nicht jedoch von Makrophagen.

Makrophagenkerne überschreiten kaum das Volumen von $600 \mu\text{m}^3$, während mehr als 50% der Fibroblasten und ES-Zellen größer als $600 \mu\text{m}^3$ sind und manchen Kernen ein Volumen von über $900 \mu\text{m}^3$ aufweisen. ES-Zellen nehmen in ihren Kernvolumen den größten Bereich von 364 bis $977 \mu\text{m}^3$ ein, ein Hinweis auf ihre meist unregelmäßige Form und das schnelle Wachstum.

Es gibt somit zwei Gruppen mit je zwei Zellkerntypen: Lymphozyten und Makrophagen haben die kleineren Zellkerne, Fibroblasten und ES-Zellen die größeren. Innerhalb der Gruppe gibt es keinen signifikanten Unterschied, zwischen den Gruppen jedoch schon (Tabelle 26). Die ANOVA für die vier Gruppen ergab einen hohen F-Wert (3,352) von 45.8. Zwischen den Kerngrößen gibt es einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$).

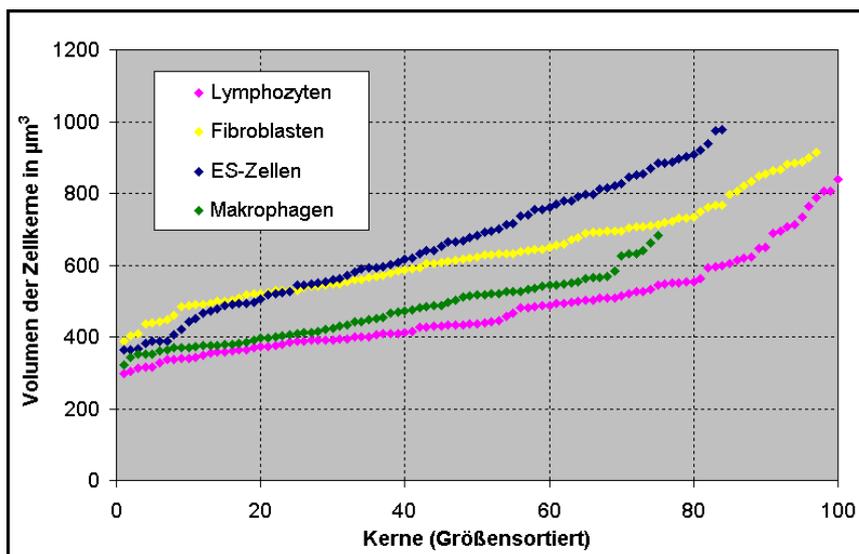


Abbildung 46: Kernvolumen der vier verschiedenen Zelltypen

Die Volumina sind der Größe nach sortiert und in μm^3 angegeben.

Zelltyp	Mittelwert	STABW	SEM
Lymphozyten	481.2	130.7	13.0
Fibroblasten	630.0	126.6	12.9
ES-Zellen	647.9	166.7	18.2
Makrophagen	468.4	86.9	10.0

Tabelle 25: Messwerte der Bestimmung des Zellkernvolumens. Die Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Kernvolumenmessung mit 3D-RRD.

ANOVA für Zellkernvolumen: F(3,352)=45.8; Sign.<0.001

Post-Hoc: SIDAK

Kernvolumen	Lymphozyten	Fibroblasten	ES-Zellen
Fibroblasten	p<0.001		
ES-Zellen	p<0.001	0.933	
Makrophagen	0.977	p<0.001	p<0.001

Tabelle 26:
Statistik der Zellkernvolumenmessung.
ANOVA und die p-Werte der Post-Hoc-Tests.

Ein Vergleich der eben bestimmten Volumenwerte mit Daten von A. Brero wird in Tabelle 27 zusammengefasst. Für die Volumenbestimmungen mit ImageJ bestimmte A. Brero die Längen, Breiten und Höhen der Kerne und errechnete das Volumen näherungsweise mit der Formel für Ellipsoide ($V = 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b \cdot c$, wobei a, b und c die Radien in der Länge, Breite und Höhe bezeichnen). Das von mir bestimmte Volumen von ES-Zellkernen liegt deutlich unter den Werten von A. Brero, trotzdem sind sie größer als alle anderen Zelltypen. Die schnell wachsenden ES-Zellen besitzen aber auch in beiden Messreihen die höchste Standardabweichung. Die nicht-zyklierenden Makrophagen haben den kleinsten Volumenmittelwert und die geringste Standardabweichung.

	R. Mayer (3D-RRD)		A. Brero (3D-RRD)		A. Brero (ImageJ)	
	Volumen	STABW	Volumen	STABW	Volumen	STABW
Lymphozyten G0-Phase	---	---	410 μm^3	37	340 μm^3	42
Lymphozyten S-Phase	480 μm^3	131	---	---	---	---
Fibroblasten S-Phase	630 μm^3	127	---	---	---	---
ES-Zellen S-Phase	650 μm^3	167	900 μm^3	136		138
Makrophagen G0-Phase	470 μm^3	87	480 μm^3	63	510 μm^3	59

Tabelle 27: Zellkernvolumen: Unterschiedliche der Zellkernvolumenbestimmung von Mauszelltypen im Vergleich.

Zusammenfassung Chromozentren und Zellkernvolumen:

Die Lage der Chromozentren ist zelltypspezifisch. im Gegensatz zu den untersuchten Chromosomenterritorien liegen die Chromozentren in Fibroblasten und Makrophagen in relativ zentralen Positionen. In Lymphozyten sind die Chromozentren am weitesten nach außen zum Zellkernrand gelangt, gefolgt von den ES-Zellen. Die Anzahl der Chromozentren ist zelltypspezifisch. Ausgehend von der Chromozentrenzahl in ES-Zellen nimmt die Zahl der Chromozentren in differenzierteren Zellen zu (Lymphozyten, Fibroblasten) oder bleibt gleich (Makrophagen).

Die Zellkernvolumina wurden bestimmt und sie liegen zwischen 470 und 650 μm^3 . Lymphozyten b im Durchschnitt die kleinsten Kerne der zyklierenden Zelltypen, ES-Zellen die größten. Die Makrophagen befinden sich in der G0-Phase, ihre Zellkerne sind am kleinsten und weisen auch die geringste Standardabweichung auf.

3.7. Abstände und Winkel zwischen Chromosomenterritorien zeigen keine Hinweise auf nicht-zufällige Verteilung

3.7.1. Vergleich der Messmethoden

Um die Reproduzierbarkeit der automatischen Winkelmessung zu überprüfen, wurden Ergebnisse aus einer bestimmten Bilderserie von A. Brero (mit manueller Winkelbestimmung) mit den Ergebnissen des Programms ADMT (siehe 2.10.3) verglichen (Abbildung 47a). A. Brero hat die Lage des Intensitätsschwerpunkts der Chromosomen MMU 11 in Lymphozyten mit Hilfe des Plug-In "Sync-Measure 3D" in ImageJ bestimmt (Brero, 2004).

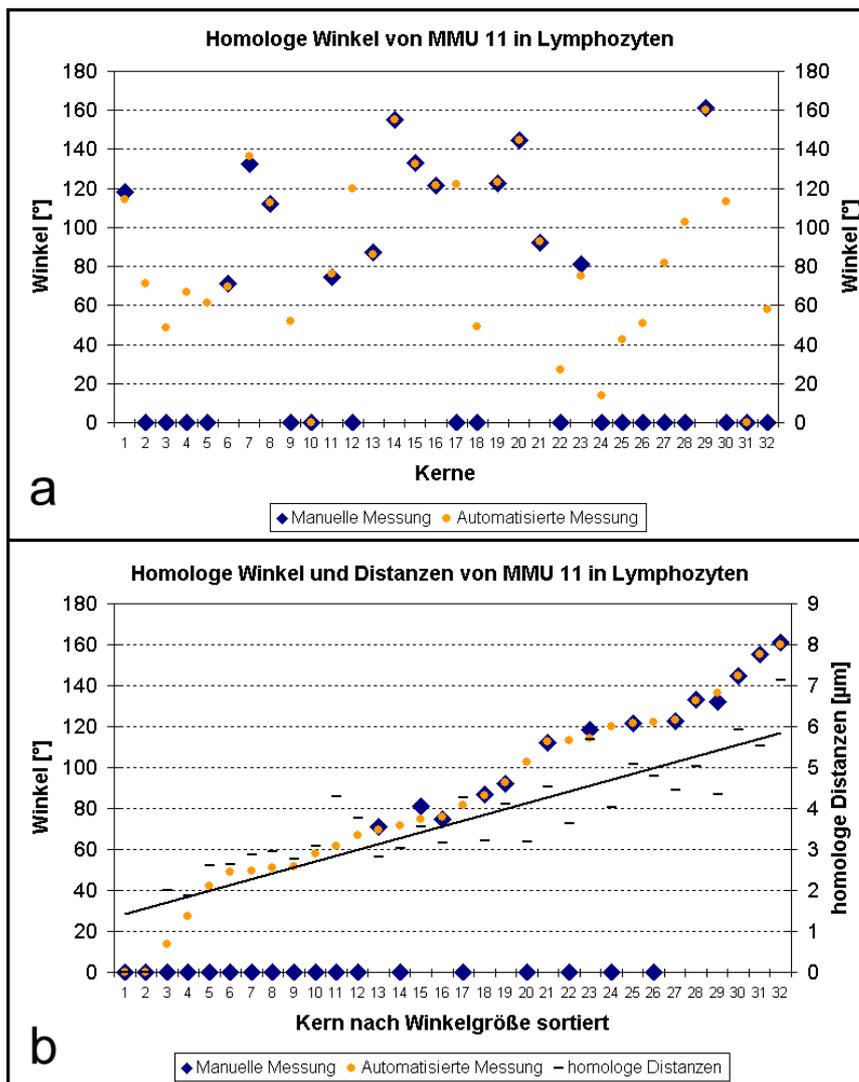


Abbildung 47: Vergleich zwischen manueller und automatischer Winkelmessung. Ausgehend von den 3D-Koordinaten wurden die Abstände und die Winkel in Excel nach den Formeln in Abbildung 18 berechnet. Damit verglichen wurden die gleichen Chromosomenterritorien, die mit dem Programm ADMT ausgewertet wurden. Die Ergebnisse von A. Brero sind in blauen Raute (\blacklozenge) dargestellt. Die von mir mit ADMT bestimmten Werte wurden mit orangefarbene Punkten (\bullet) eingezeichnet.

a | Die Winkel in der ungeordneten Reihenfolge der Messung

b | Die Winkel gemessenen Winkel der Größe nach geordnet. Zusätzlich sind die dazugehörigen homologen Distanzen zwischen den Schwerpunkten der Territorien aufgetragen (-). Die Achse für die Distanzen befindet sich rechts. Eine Trendlinie durch die Datenpunkte der Distanzen verdeutlicht den Zusammenhang zwischen größer werdenden Winkeln und längeren Distanzen.

Die Werte bei Winkeln größer als 0° fallen bei beiden Messmethoden mit minimalen Abweichungen zusammen. Der kleinste Winkel, den A. Brero zwischen zwei MMU 11 in Lymphozyten maß, betrug 71° . Durch die interaktive Schwellwertbestimmung für ADMT konnten viele kleinere Winkel bestimmt werden, nur zwei homologe Chromosomenpaare waren nicht zu trennen. (Abbildung 47b). Wenn man sie der Größe nach ordnet, scheinen sich die Winkel in Lymphozyten gleichmäßig zu verteilen (Abbildung 47b). Generell nehmen auch die Abstände zwischen den beiden homologen Chromosomenterritorien mit größer werdendem Winkel zu, dies ist aber nicht zwingend der Fall; so kann bei einem Abstand von $4,3 \mu\text{m}$ sowohl ein Winkel von 61° als auch 137° gemessen werden (Abbildung 47b).

Das Programm ADMT ist somit sehr gut für die Winkelmessung geeignet und wurde folglich für alle weiteren Messungen (inklusive Abstände) verwendet.

3.7.2. Winkelmessungen zwischen homologen Chromosomen

Die Winkelmessungen ergaben bei allen untersuchten Zelltypen für die homologen Chromosomenterritorien jeweils Werte, die fast den gesamten Winkelbereich von 0° bis 180° abdecken. Eine Häufung bestimmter Winkelklassen über das normale Maß hinaus wurde nicht festgestellt. Bei den Lymphozyten zeichnet sich zwar bei der prozentualen Verteilung eine größere Anzahl mittlerer Winkelklassen ab, aber der Grund dafür liegt in der Geometrie der Kerne. In runden Kernen besteht die Möglichkeit bei gleich großen Chromosomenterritorien öfter in Winkeln um 90° anzuordnen, als bei flachen Kernen (Fibroblasten und Makrophagen). Weil sich Territorien in Fibroblasten und Makrophagen, überspitzt ausgedrückt, nur in zwei Dimensionen verteilen können und quasi die dritte Dimension wie in Lymphozyten und S-Zellen fehlt.

Der Sachverhalt einer ungerichteten Winkel-Verteilung wird bei der Darstellung der Winkel in kumulativen Kurven in deutlich, am besten bei ES-Zellen. Die Kurven für die erhaltenen Winkel der verschiedenen homologen Chromosomenpaare liegen eng beisammen und durchqueren die Diagrammfläche nahezu diagonal. Das spiegelt sich auch in der statistischen Auswertung wieder, bei der die Winkelverteilungen in ES-Zellen als einzige keinerlei Unterschied zueinander erkennen lassen (Tabelle 28). Bei den kumulativen Darstellungen stechen noch die Kurven für die Winkel in Makrophagen heraus. Als Grund dafür kann man die vielen nichttrennbaren MMU 1 Territorien und die Winkeln über 150° ausmachen, die von MMU 11 aufgespannt werden. Der Mittelwerte aller gemessenen Winkel von MMU 1 in Makrophagen liegt als einziger von allen unter 70° , bei 47° (Tabelle 28 links). Deshalb ergeben sich zwei hochsignifikante Unterschiede zwischen den Verteilungen von MMU 1-Winkeln mit denen von MMU 11 und MMU 14 (Tabelle 28 rechts). Abgesehen von der Ausnahme bei Makrophagen lassen die gefundenen Mittelwerte mit den sehr hohen Standardabweichungen den Schluss zu, dass es weder eine Häufung von besonders kleinen Winkeln noch ein Bevorzugung von großen Winkeln gibt. Diese Konstellationen wären Voraussetzung für die Annahmen der Homologenpaarung oder der parentalen Separation mit gegenüberliegenden Chromosomen (Nagele et al., 1999).

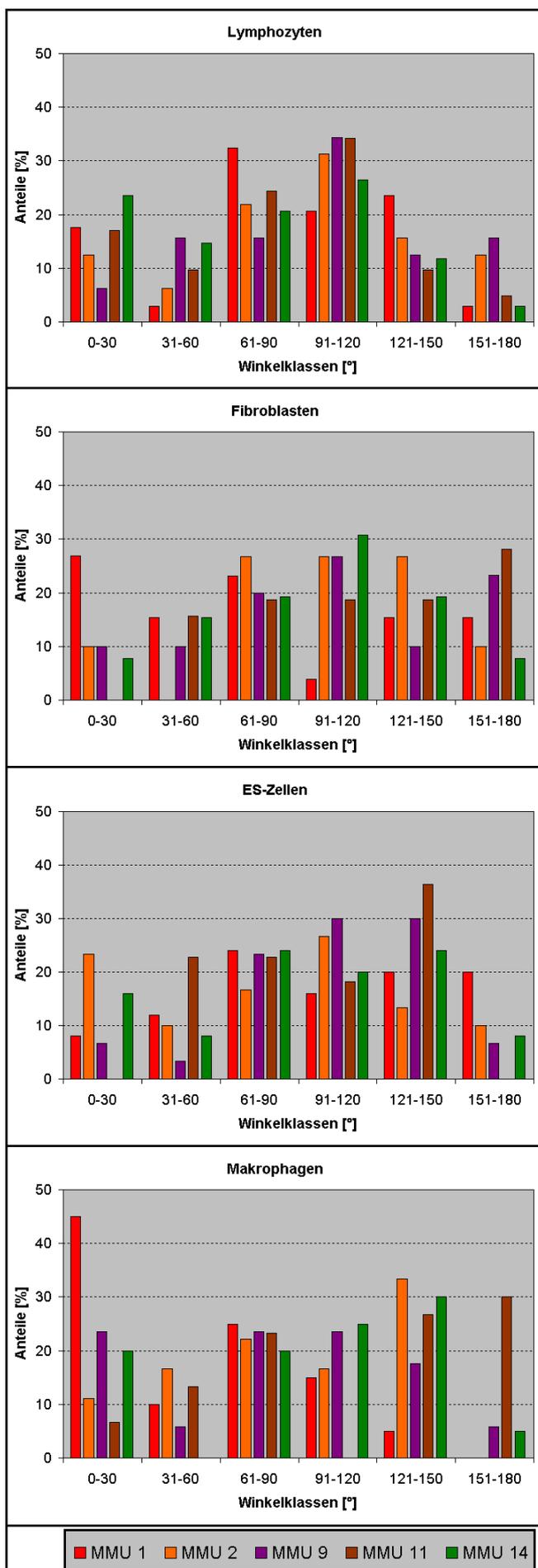


Abbildung 48: Winkelmessung zwischen den homologen Chromosomenpaaren.

Dargestellt ist das prozentuale Vorkommen von bestimmten Winkelklassen (in 30°-Bereichen) bei den verschiedenen Zelltypen. Zusammengezählt ergeben sich für jedes Chromosom immer 100%. So kann trotz unterschiedlicher N zwischen den Zelllinien verglichen werden. Lymphozyten und ES-Zellen weisen mehr Winkel in den mittleren Klassen auf, was mit der kugeligen Gestalt der Zellkerne zu begründen ist.

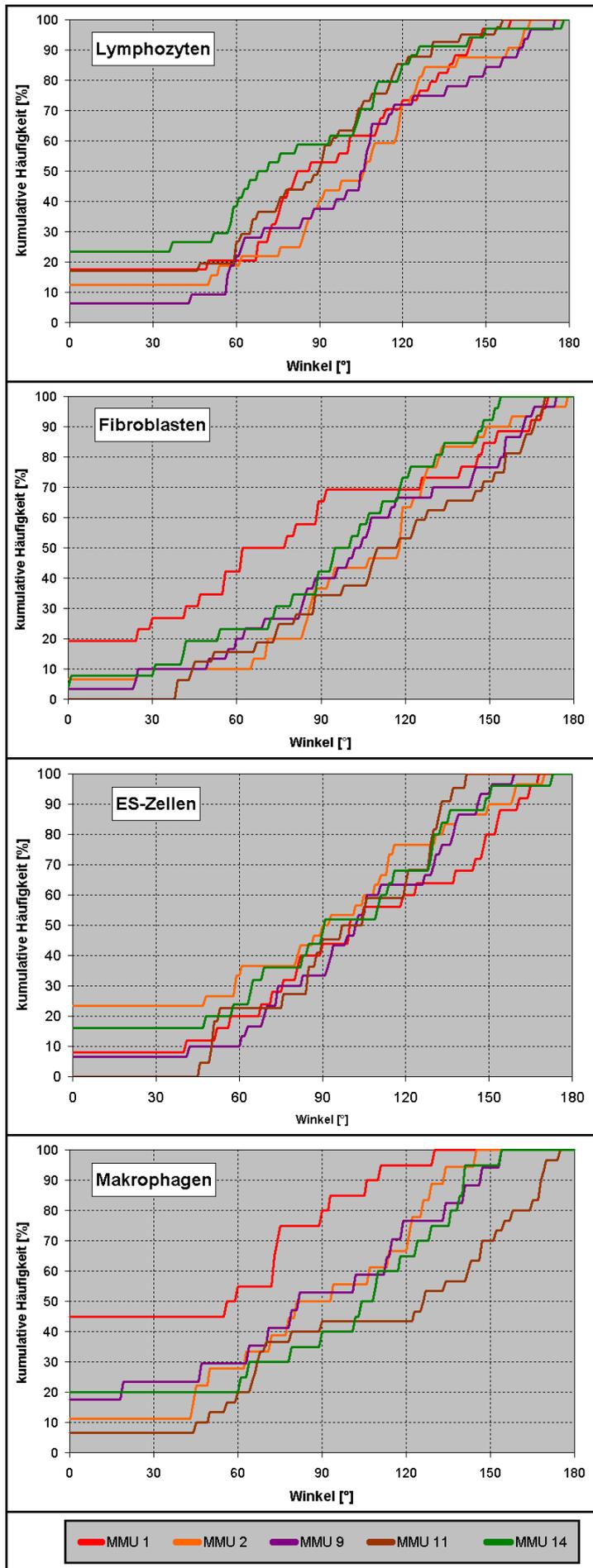


Abbildung 49: Winkelmessung zwischen den homologen Chromosomenpaaren.

Die Winkel zwischen den fünf homologen Chromosomenpaaren sind kumulativ für jeden Zelltyp dargestellt und auf 100% normiert. Die Chromosomenpaare in ES-Zellen weisen eine besonders gleichmäßige Verteilung über alle Winkelgrößen auf.

Lymphozyten	n	MW	Median	STABW
MMU1	34	85.0	83.9	48.5
MMU2	32	95.3	105.6	46.9
MMU9	32	99.5	105.5	44.8
MMU11	41	79.4	89.4	44.4
MMU14	34	71.7	69.9	50.5
Fibroblasten				
n	MW	Median	STABW	
MMU1	26	77.5	69.8	58.4
MMU2	30	103.4	118.0	43.0
MMU9	30	102.5	103.1	46.5
MMU11	31	112.2	113.2	42.9
MMU14	26	92.2	97.4	43.7
ES-Zellen				
n	MW	Median	STABW	
MMU1	25	101.4	99.2	49.1
MMU2	30	82.0	90.8	55.0
MMU9	30	98.8	102.0	40.9
MMU11	22	97.5	100.6	32.5
MMU14	25	89.0	90.5	50.6
Makrophagen				
n	MW	Median	STABW	
MMU1	20	46.8	57.6	46.5
MMU2	18	84.2	87.1	44.2
MMU9	17	81.1	81.0	52.9
MMU11	30	109.1	126.3	52.9
MMU14	20	89.7	106.1	52.4

	MMU 2	MMU 9	MMU 11	MMU 14
MMU1	0.254	0.608	0.728	0.185
MMU2		0.964	0.176	0.044
MMU9			0.146	0.163
MMU11				0.532
MMU14				
Fibroblasten				
	MMU 2	MMU 9	MMU 11	MMU 14
MMU1	0.023	0.137	0.061	0.303
MMU2		0.586	0.512	0.682
MMU9			0.783	0.434
MMU11				0.331
MMU14				
ES-Zellen				
	MMU 2	MMU 9	MMU 11	MMU 14
MMU1	0.605	0.564	0.182	0.468
MMU2		0.388	0.494	0.981
MMU9			0.761	0.729
MMU11				0.899
MMU14				
Makrophagen				
	MMU 2	MMU 9	MMU 11	MMU 14
MMU1	0.169	0.18	0.003	0.035
MMU2		0.999	0.081	0.866
MMU9			0.184	0.929
MMU11				0.059
MMU14				

Tabelle 28: Die statistische Auswertung der Winkelmessungen zwischen homologen Chromosomenpaaren

linker Teil | Hier erfolgte die Zusammenfassung aller Winkel eines homologen Chromosomenpaars zu Mittelwert, Median und Standardabweichung.

rechter Teil | Die Ergebnissen der Kolmogorov-Smirnov-Tests mit SPSS. Die absoluten Winkelwerte zwischen den verschiedenen Chromosomenkombinationen wurden innerhalb eines Zelltyps miteinander verglichen. Nur in ES-Zellen ergeben sich überhaupt keine Unterschiede

3.7.3. Winkelmessungen zwischen den heterologen Chromosomen

Das Programm ADMT misst auch von jedem Chromosomenterritorium den Winkel zu den beiden anderen, nicht-homologen Territorien. Diese Winkel sind Experimenten getrennt in Abbildung 50 nach prozentualer Häufigkeit kumulativ aufgetragen. Die in Abbildung 51a und b dargestellte Konstellation gibt die spezielle Anordnung der Chromosomen in Interphasezellkernen als Ergebnis einer beibehaltenen antiparallelen Anordnung von Chromosomen aus der Metaphaseplatte wieder. Schematisch und übertrieben ist das Aussehen des Graphen, der eine strenge Zellkernorganisation (die homologen Chromosomen immer in festen Positionen zueinander) wiedergeben würde. Es würden (vom Zufall von 90° zu 90° abgesehen) daraus immer zwei kleine und zwei große Winkel resultieren.

An den Graphen erkennt man, dass sich die heterologen Winkel in ihrer Verteilung nicht voneinander unterscheiden. Die Winkel durchmessen die Graphen in nahezu diagonalen Linien, ein Verlauf, der keine Bevorzugung irgendeiner Winkelklasse erkennen lässt. So lassen auch die Ergebnisse der Kolmogorov-Smirnov-Tests mit SPSS keinen Hinweis auf eine nichtzufällige Verteilung der Winkel erkennen.

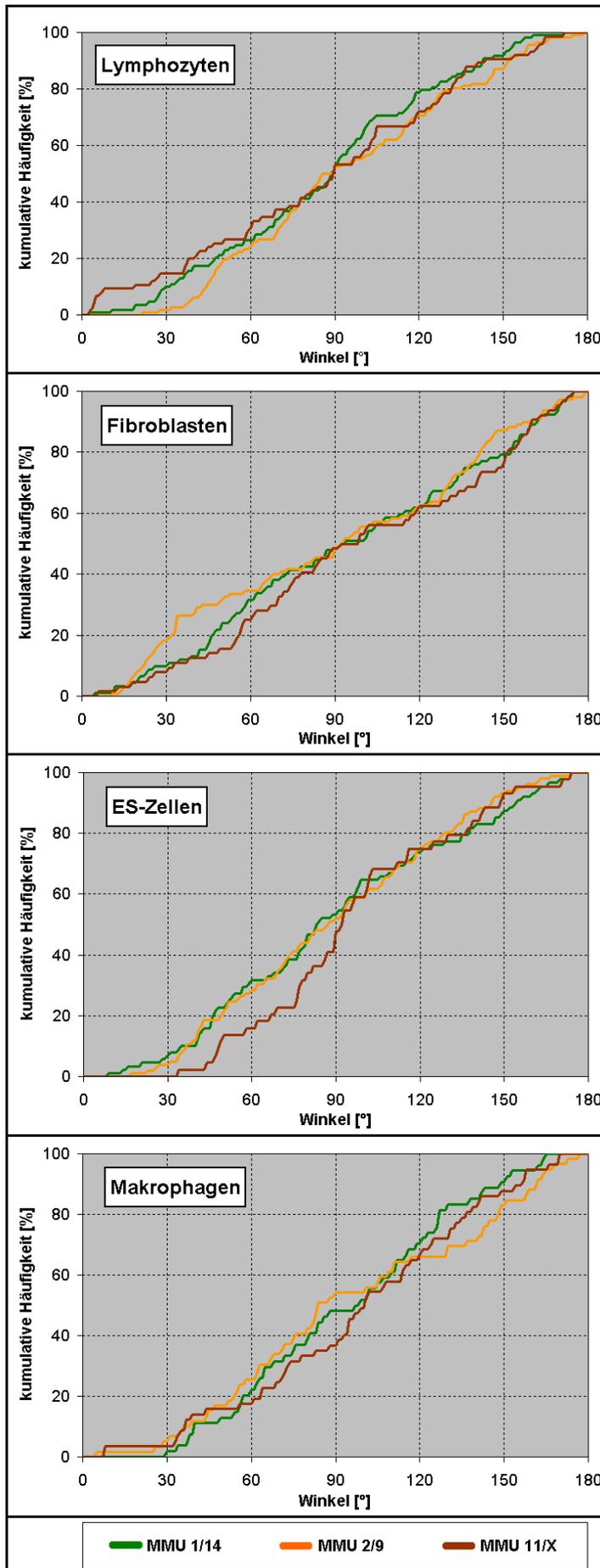


Abbildung 50: Winkelmessung zwischen den heterologen Chromosomenpaaren.

Die gemessenen Winkel zwischen den drei Chromosomenkombinationen sind kumulativ für jeden Zelltyp dargestellt und auf 100% normiert. Dargestellt sind die heterologen Winkel, die zwischen den Chromosomenpaaren MMU 1/14, MMU 2/9 und MMU 11/X aufgespannt werden.

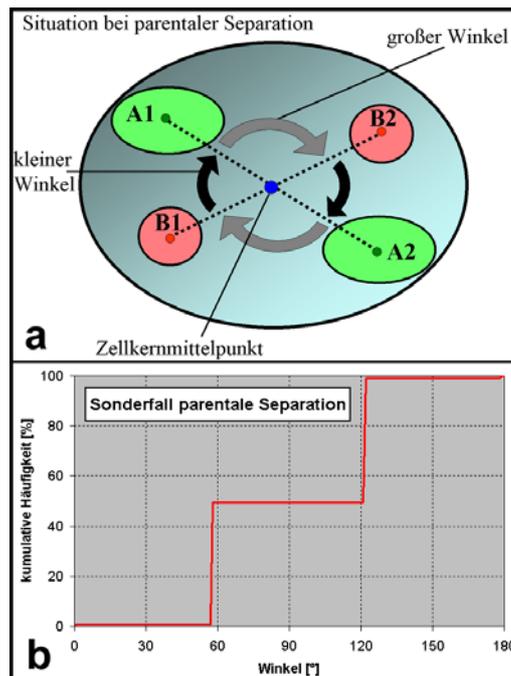


Abbildung 51: Darstellung des Sonderfalls „Parentale Separation“

a | Schema der Winkelmessung beim Sonderfall von angenommener parentaler Separation der Chromosomen mit dem Auftreten von je zwei größeren und zwei kleineren Winkeln.

b | Darstellung einer angenommenen kumulativen Verteilung bei starrer Chromosomenanordnung mit parentaler Separation und gegenüberliegenden Chromosomen, bei der kleiner Winkel größeren Winkeln gegenüberstehen (Nagele et al., 1999).

3.7.4. Abstandsmessungen zwischen der Chromosomenterritorien

Parallel zu den Winkelwerten errechnet das ADMT-Programm auch die Distanzen in μm zwischen allen Schwerpunkten (Kern und Chromosomenterritorien). Die Distanzen zwischen dem Kernschwerpunkt und denen der Chromosomenterritorien wurden in kumulativen Kurven zusammengefasst und nach prozentualer Häufigkeit aufgetragen. In Abbildung 52a-d sind sie dargestellt. Maximale Distanzen werden in Fibroblasten mit Werten von mehr als $8 \mu\text{m}$ erreicht. Wenn für eine allgemeine Betrachtung man die oberen und unteren 20% der Distanzwerte ausblendet, sieht man schon, dass in jedem Zelltyp ein charakteristischer Wertebereich durchschritten wird, der je nach Zelltyp einmal schmaler und einmal breiter ausfällt. In Lymphozyten liegen 60% der Werte in einem Bereich von $2,3 \mu\text{m}$ bis $5 \mu\text{m}$, bei Fibroblasten von $3,8 \mu\text{m}$ bis $7,2 \mu\text{m}$. Den engsten Wertebereich weisen die ES-Zellen auf, 60% der Abstände liegen dort zwischen $2,9$ bis $4,9 \mu\text{m}$. Die Makrophagen nehmen mit den Lymphozyten eine Mittelstellung ein; mit Kern-Territorienabständen von $2,7 \mu\text{m}$ bis $5,0 \mu\text{m}$.

Die gleiche Darstellung wurde auch für die Abstände zwischen den homologen Chromosomenterritorien gewählt (Abbildung 52e-h). Alle Wertebereiche umfassen nun größere Distanzen, denn die Abstände zwischen den Territorien-schwerpunkten können theoretisch bis an den Zellkerndurchmesser heranreichen. In Lymphozyten wurden keine Abstände größer als $11,4 \mu\text{m}$ (bei MMU 9) gemessen, ein Wert, der nahe an den weitesten Durchmesser von Lymphozytenkernen herankommt. Die kleinsten Werte weisen MMU 11 auf, deren Schwerpunkte sich maximal $5,7 \mu\text{m}$ voneinander entfernt haben, insgesamt aber Werte zwischen 3 und $5 \mu\text{m}$ bevorzugen, was der bedeutenden zentralen Lage der MMU 11 in Lymphozytenkernen geschuldet ist. Die größten Abstände wurden in Fibroblasten gemessen, einzelne Abstände zwischen den Homologen von MMU 1, 2, und 11 liegen über $14 \mu\text{m}$. Auch der Wertebereich mit 60% der Distanzen ist bei Fibroblasten am umfassendsten, er geht von 4 bis $11,4 \mu\text{m}$. Lässt man MMU 1 einmal außer Acht, kann man sagen, dass 50% der Distanzen größer als $7,1 \mu\text{m}$ sind, ein hoher Wert, der sich durch die flachen, großen Fibroblastenkerne begründen lässt. Die ES-Zellen weisen (wie

auch schon bei den Kernmittelpunkt-Territoriidistanzen) den 60%-Bereich mit der geringsten Ausdehnung auf, von 3,6 bis 8 μm . Bei den Makrophagen fallen die 45% an untrennbaren Territorien von MMU 1 auf, die MMU 11 erreichen einen maximalen Abstand von 10 μm , der 60%-Bereich geht von 3 bis 8,1 μm .

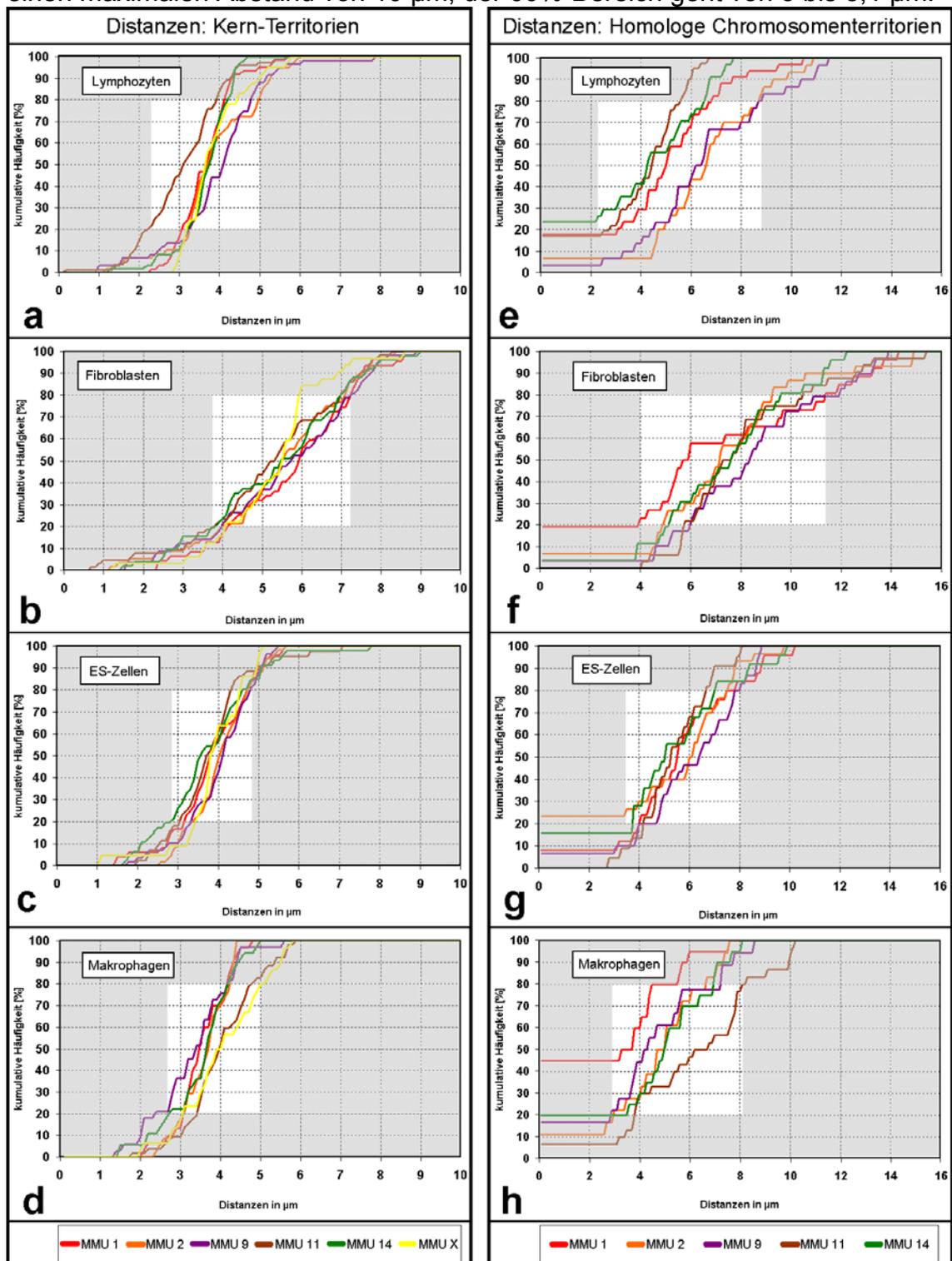


Abbildung 52: Distanzen zwischen den homologen Chromosomenpaaren

a-d | Die gemessenen Abstände von den Zellkernmittelpunkten zu den Schwerpunkten der Chromosomenterritorien.

e-h | Die Abstände der homologen Chromosomenterritorien voneinander. Das weiße Rechteck verdeutlicht immer den Bereich, in dem 60% der Werte liegen.

Zusammenfassung Winkel und Abstände:

Die Bestimmung der Winkel und Abstände der Chromosomenterritorien in den vier untersuchten Zelltypen ergab keinen Hinweis für eine Abweichung von einer zufälligen Verteilung. Keines der untersuchten Chromosomenpaare weist eine Assoziation von Homologen auf (von einer Häufung nicht trennbarer MMU 1 in Makrophagen abgesehen), auch findet sich keine Häufung großer Winkel, ein Hinweis für eine antiparallele Anordnung von homologen Chromosomen, wie sie typisch wäre bei der Annahme einer parentalen Separation der Chromosomensätze.

3.8. Messungen der Chromosomenstruktur mit Objektzählprogrammen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Programme gründlich erprobt, welche die Anzahl von Objekten in einem Bildstapel zählen, bei schrittweiser Erhöhung des Schwellwerts. Grauwerte, die unter dem entsprechenden Schwellwert liegen, werden gleich Null gesetzt und alle Objekte, die aus mehr als 10 Voxeln bestehen, gehen in die Zählung mit ein. Für Objekte gilt die Nachbarschaftsregeln, nach der alle Voxel zu einem Objekt dazugezählt werden, wenn sie mit einem Nachbarvoxel entweder eine Fläche, eine Kante oder eine Ecke teilen (26 Nachbarn möglich pro Voxel). Mit steigenden Schwellwerten zerfallen große Objekte in kleinere Untereinheiten, die schließlich ganz verschwinden. Die Zahl der Objekte wird mit beiden Programmen über einen Schwellwertbereich bestimmt. Das zweite Programm OC-2 gibt noch weitere Parameter wie Volumen, Oberfläche und Intensität der gezählten Objekte an.

3.8.1. Vergleich der Ergebnisse der Programme OC-1 und OC-2

Die Unterschiede in der Bedienung und Arbeitsweise der beiden Objektzählprogramme wurden in Abschnitt 2.10.4 ausgeführt. OC-1 gibt nur die Zahl der Objekte aus und wurde schon in einer Publikation vorgestellt (Stadler et al., 2004). Für einen Vergleich mit den Ergebnissen von OC-2 wurden diese Ergebnisse herangezogen. Eine Serie von Fibroblastenkernen diente zum Vergleich der Berechnungsmethoden (Abbildung 53). Die Kurven weisen eine hohe Übereinstimmung auf, wenn man von dem Abschnitt des Schwellwertbereichs kleiner als 50 absieht. Weil bei Werten unter 50 die Signale von einem hohen Hintergrundrauschen betroffen sind, kommen die Auswertungsprogramme mit ihren unterschiedlichen Filterprozessen und Berechnungsalgorithmen in diesem Bereich zu größeren Unterschieden, als wenn einzelne, klar von einander zu unterscheidende Signale zu zählen sind.

Die zwei unabhängig voneinander entwickelten Programme mit unterschiedlichen Berechnungsarten führen über einen großen Schwellwertbereich zu gleichen Ergebnissen, die Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Durch diese Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann man Fehlerquellen in der Berechnung ausschließen. Für die weiteren Untersuchungen werden nur noch die Ergebnisse betrachtet, die mit OC-2 berechnet wurden.

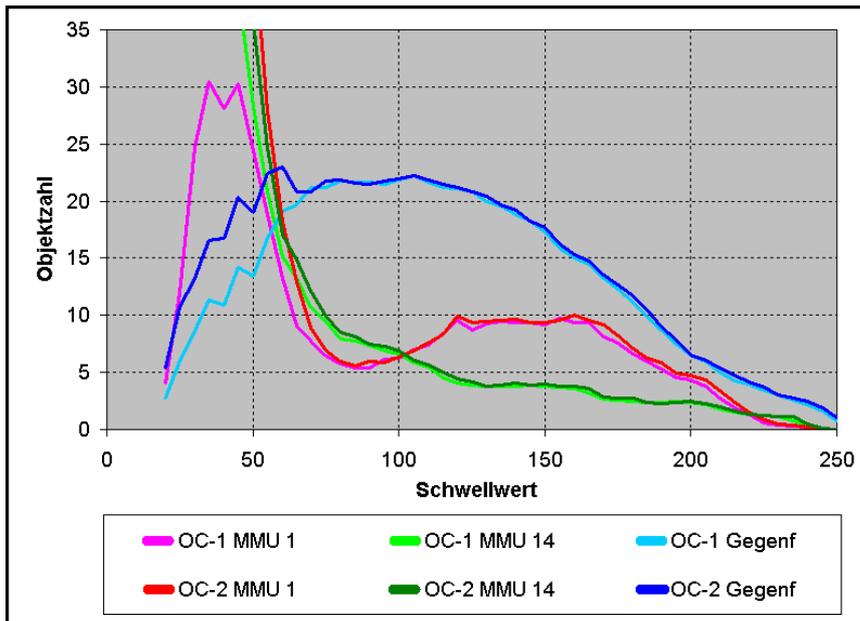


Abbildung 53: Vergleich der beiden Objektzählprogramme OC-1 und OC-2.

In Fibroblasten wurden die Objektzahlen von zwei Chromosomen-Paints und der Kerngegenfärbung mit OC-1 und OC-2 berechnet und in einem Diagramm zum Vergleich aufgetragen.

3.8.2. Ergebnisse von OC-2 bei den Mauszelltypen

Das Programm OC-2 gibt für jeden Bildstapel zwölf verschiedene Parameter aus (Tabelle 29). Das Endergebnis für ein Chromosomenpaar oder die Kerngegenfärbung enthält in einer Exceldatei die zusammengefassten Mittelwerte aller Kerne einer Experimentserie. Die Kurven aller Parameter der Experimente mit sechs untersuchten Chromsomen sind nach Zelltypen getrennt in den Abbildung 54-Abbildung 57 zu sehen. Jede Abbildung enthält 12 Graphen für die unterschiedlichen Messwerte.

a	Anzahl der Objekte
b	Gesamtvolumen aller gezählter Objekte
c	Gesamtoberfläche aller gezählter Objekte
d	Gesamtintensität aller gezählter Objekte
e	Verhältnis Gesamtvolumen zu Gesamtintensität
f	Verhältnis Gesamtoberfläche zu Gesamtintensität
g	Verhältnis Gesamtoberfläche zu Gesamtvolumen
h	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektvolumen zu Objektintensität
i	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektfläche zu Objektintensität
j	Mittelwert der Einzelobjekt-Quotienten: Objektfläche zu Objektvolumen
k	Durchschnittliche „Rundheit“ der Objekte
l	Durchschnittliche „Glattheit“ der Objekte

Tabelle 29: OC-2, die Bedeutung der 12 ausgegebenen Parameter von a-l.

Lymphozyten

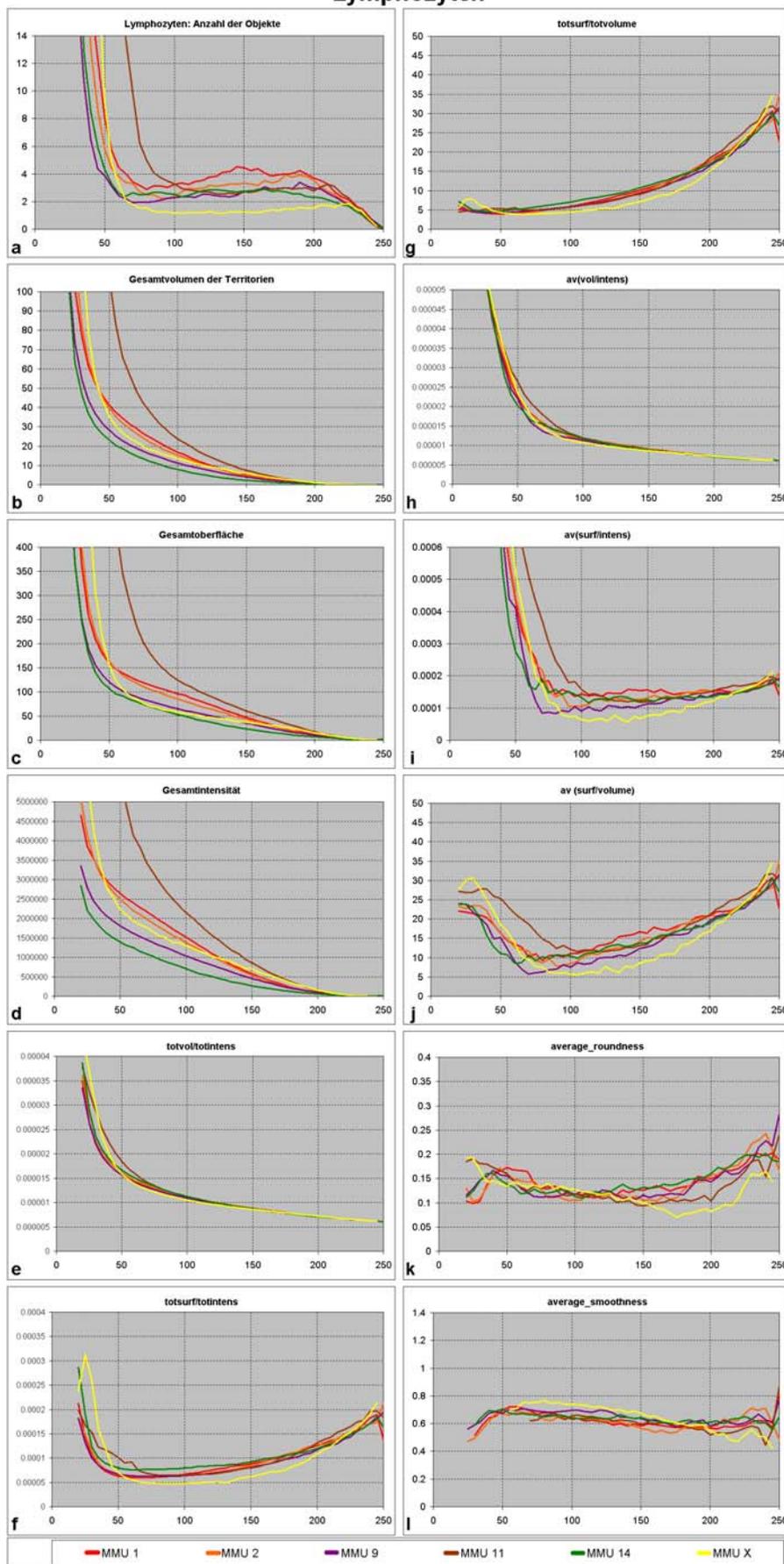


Abbildung 54: Objektzählprogramm OC-2 bei Lymphozyten. Die Kurven aller Parameter aus den OC-2 Berechnungen für die sechs untersuchten Chromosomen in Lymphozyten.

Fibroblasten

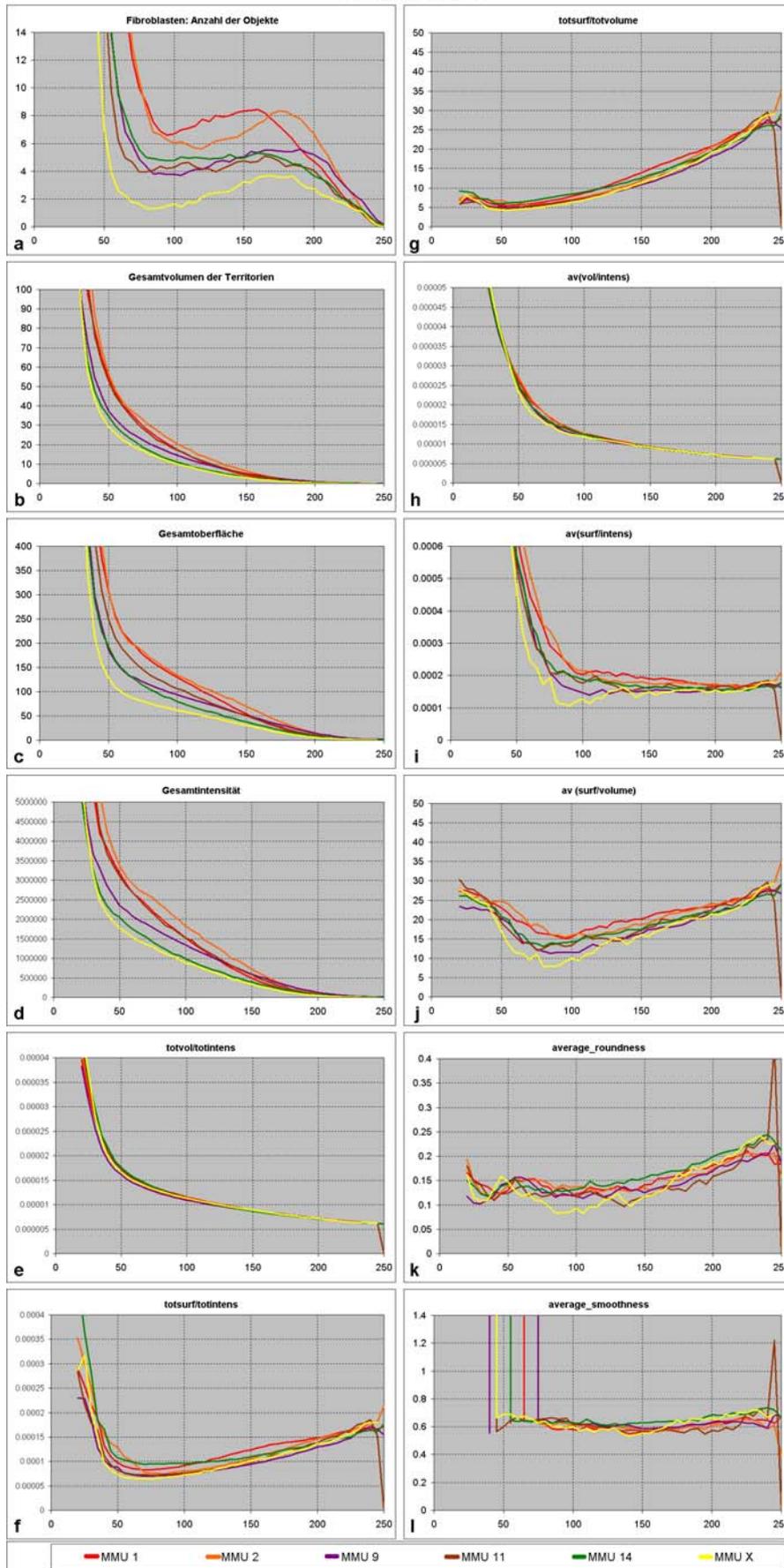


Abbildung 55: Objektzählprogramm OC-2 bei Fibroblasten. Die Kurven aller Parameter aus den OC-2 Berechnungen für die sechs untersuchten Chromosomen in Fibroblasten.

ES-Zellen

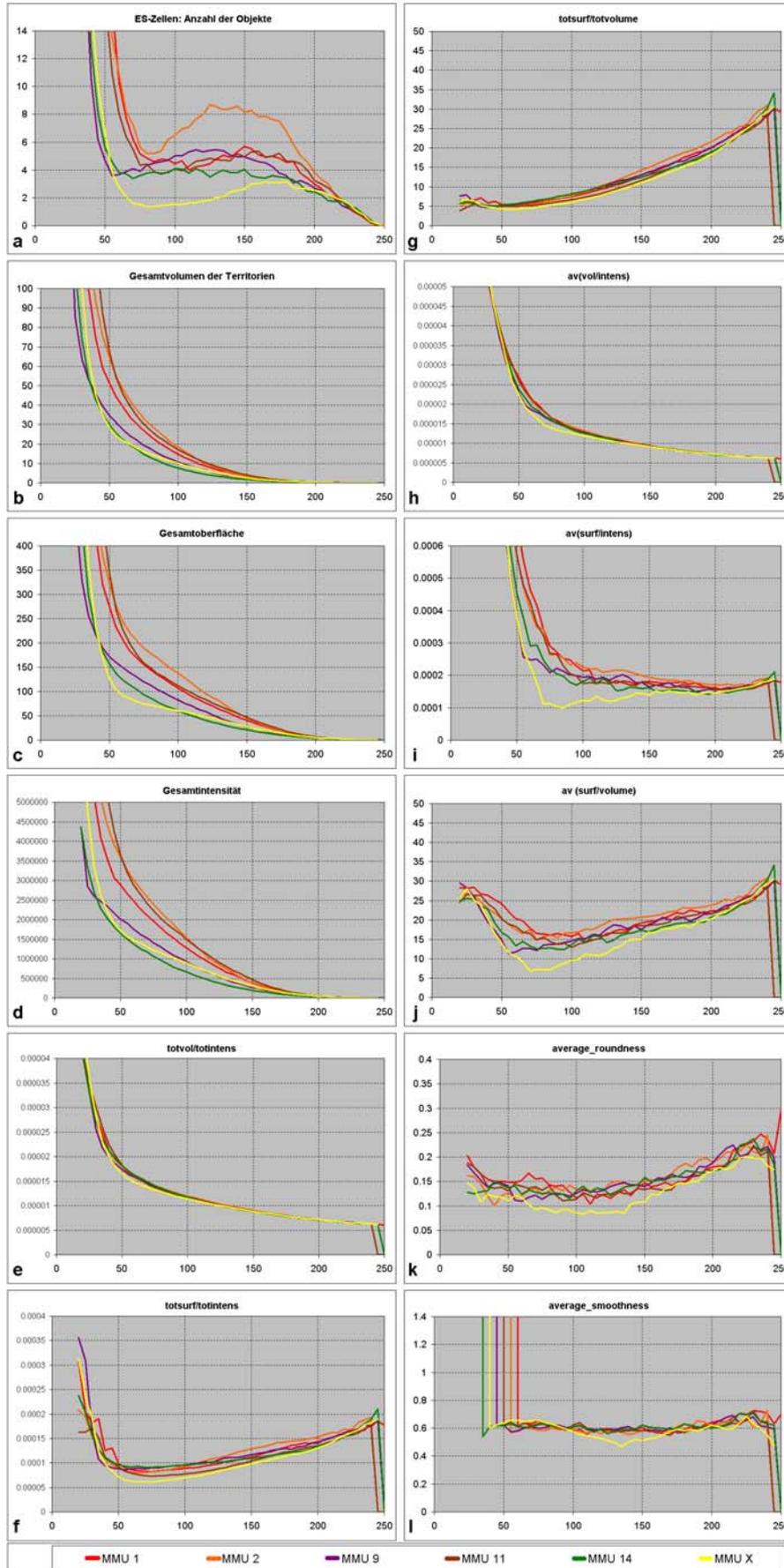


Abbildung 56: Objektzählprogramm OC-2 bei ES-Zellen. Die Kurven aller Parameter aus den OC-2 Berechnungen für die sechs untersuchten Chromosomen in ES-Zellen.

Makrophagen

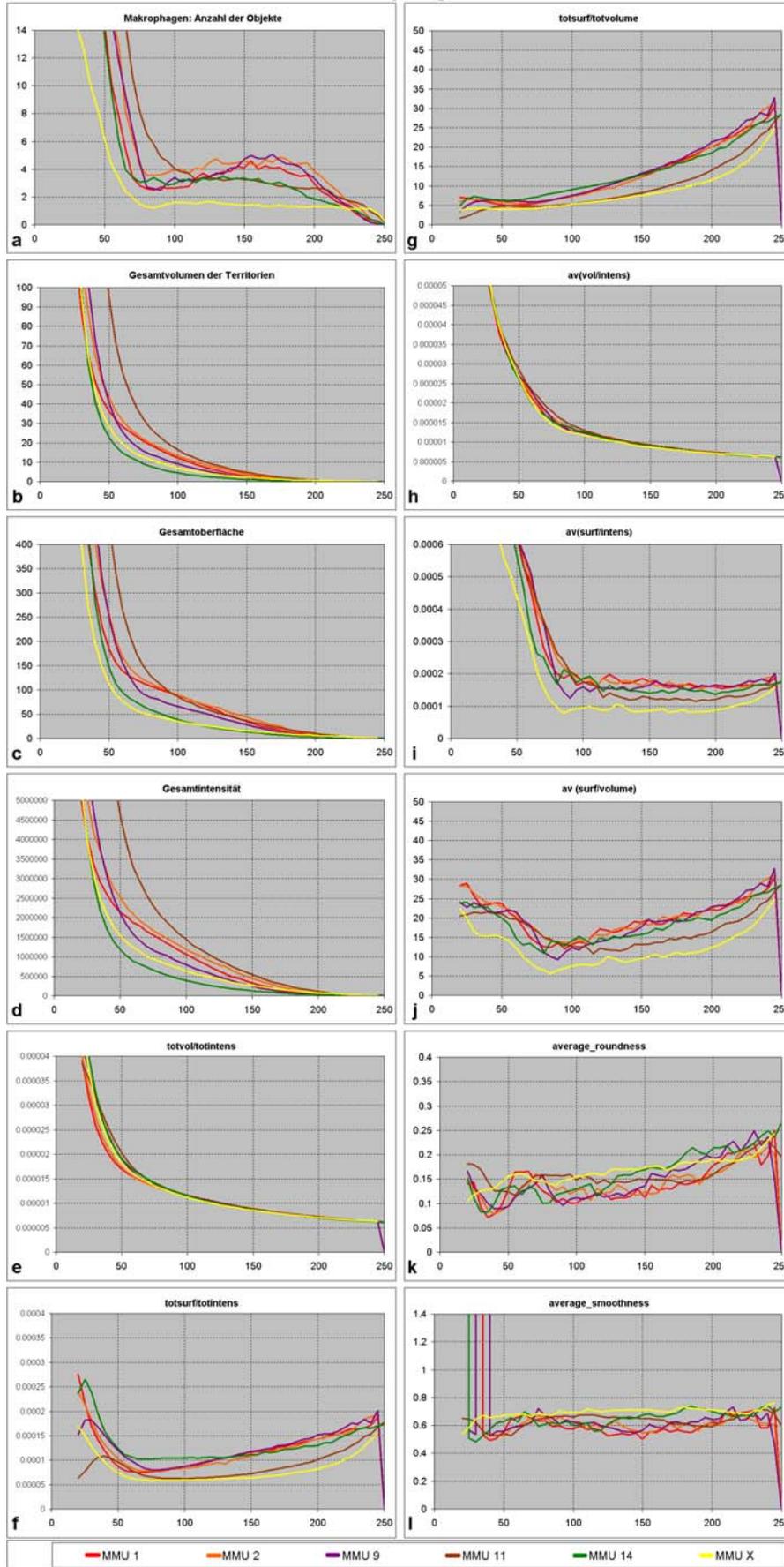


Abbildung 57: Objektzählprogramm OC-2 bei Makrophagen. Die Kurven aller Parameter aus den OC-2 Berechnungen für die sechs untersuchten Chromosomen in Makrophagen.

Elf der zwölf dargestellten Parameter in den letzten vier Abbildungen (jeweils b-l) zeigten keine nennenswerten Unterschiede, so dass nur mit der Anzahl der Objekte (a) eine weitergehenden Auswertung betrieben wird. In Abbildung 58 a-d werden für jeden Zelltyp die Objektkurven der sechs untersuchten Chromosomenterritorien in dem Schwellwertbereich von 40 bis 200 dargestellt. Durch Einschränkung des Schwellwertbereichs werden Unterschiede zwischen den Kurven besser sichtbar. Da die hohen Objektzahlen bei niedrigen Schwellwerten keinen Aussagewert haben, weil dunkle Hintergrundsignale mitgezählt werden, werden Schwellwerte erst ab 40 aufgetragen. Dadurch können die y-Achsen angepasst werden und die Kurven lassen sich besser unterscheiden. Die Objektzahlen ab Schwellwert 200 laufen alle direkt auf Null zu, sie enthalten keine maßgebliche Information und werden deswegen auch nicht mehr dargestellt.

Vor der Betrachtung der Kurven sollte man sich noch einmal die Zellzyklusphasen der untersuchten Zelltypen erwähnen. Mit Ausnahme der Makrophagen befanden sich Lymphozyten, Fibroblasten und ES-Zellen in S-Phase. Die Makrophagen befanden sich in der G₀-Phase.

Zuerst werden die Objektzahlen betrachtet, wie sie original vom Programm OC-2 bestimmt wurden. In allen Zelltypen fällt dabei das X-Chromosom auf, das immer unter zwei Objekte fällt und im Falle der Lymphozyten und Makrophagen dort auch über einen langen Bereich verbleibt. Der Grund dafür ist die Verwendung männlicher Zellen mit nur einem X-Chromosom.

Bei den **Lymphozyten** (Abbildung 58 a) kann man nur bei den Objektkurven der Chromosomen MMU 1 und 2 eine leichte Tendenz feststellen, in mehr Objekte als die Chromosomen MMU 9, 11 und 14 zu zerfallen, diese verbleiben bei Werten über 2, aber unter 4 Objekten. Lymphozyten ergaben von den Objektzahlen her das geschlossenste Bild von allen Zelltypen, die Chromosomenterritorien haben eher eine kompakte Struktur (siehe auch Abbildung 30, S. 69), die den Zerfall in kleinere Objekte verhindert. Die Verschiebung der Kurve von MMU 11 nach rechts beruht auf einem allgemein erhöhten Signal/Rauschverhältnis, durch das die Chromosomenterritorien erst bei einem höheren Schwellenwert als einzelne Objekte hervortreten.

Fibroblasten (Abbildung 58 b) und **ES-Zellen** (Abbildung 58 c) weisen die größte Aufspaltung und die höchsten Werte der Objektkurven auf. Der Wertebereich geht von 2 bis über 8 Objekte. In Fibroblasten erreichen die MMU 1 zusammen bis zu acht Objekte, bei MMU 2 kann man von 6 Objekten ausgehen. Die durchschnittlichen Werte für MMU X in Fibroblasten liegen deutlich unter 2, was wohl dem einzelnen Chromosom X entspricht, aber auch das Territorium des X-Chromosoms zerfällt bei Fibroblasten mit höheren Schwellwerten in mehr Objekte. MMU 9, 11 und 14 pendeln in einem relativ engen Rahmen um die 4-5 Objekte, deutlich mehr als in Lymphozyten. Ein klarer Gegensatz zu den Fibroblasten findet sich bei den ES-Zellen. Dort nehmen nicht die Chromosomen MMU 1 den Spitzenplatz ein, sondern die MMU 2 zerfallen dort in über 8 Objekte, während bei MMU 1 durchschnittlich nicht mehr als 5 Objekte nachgewiesen wurden.

Die Chromosomen in **Makrophagen** (Abbildung 58 d) ergeben zusammen ein ähnlich geschlossenes Bild wie in Lymphozyten. Ein Grund dafür könnte sein, dass sich die Zellen in der G₀-Phase befinden. Die Makrophagen weisen ein vergleichbar kleines Zellkernvolumen auf wie die Lymphozyten. Im Vergleich zu diesen fallen in Makrophagen nur die MMU 9 auf, die deutlich höhere Objektzahlen erreichen.

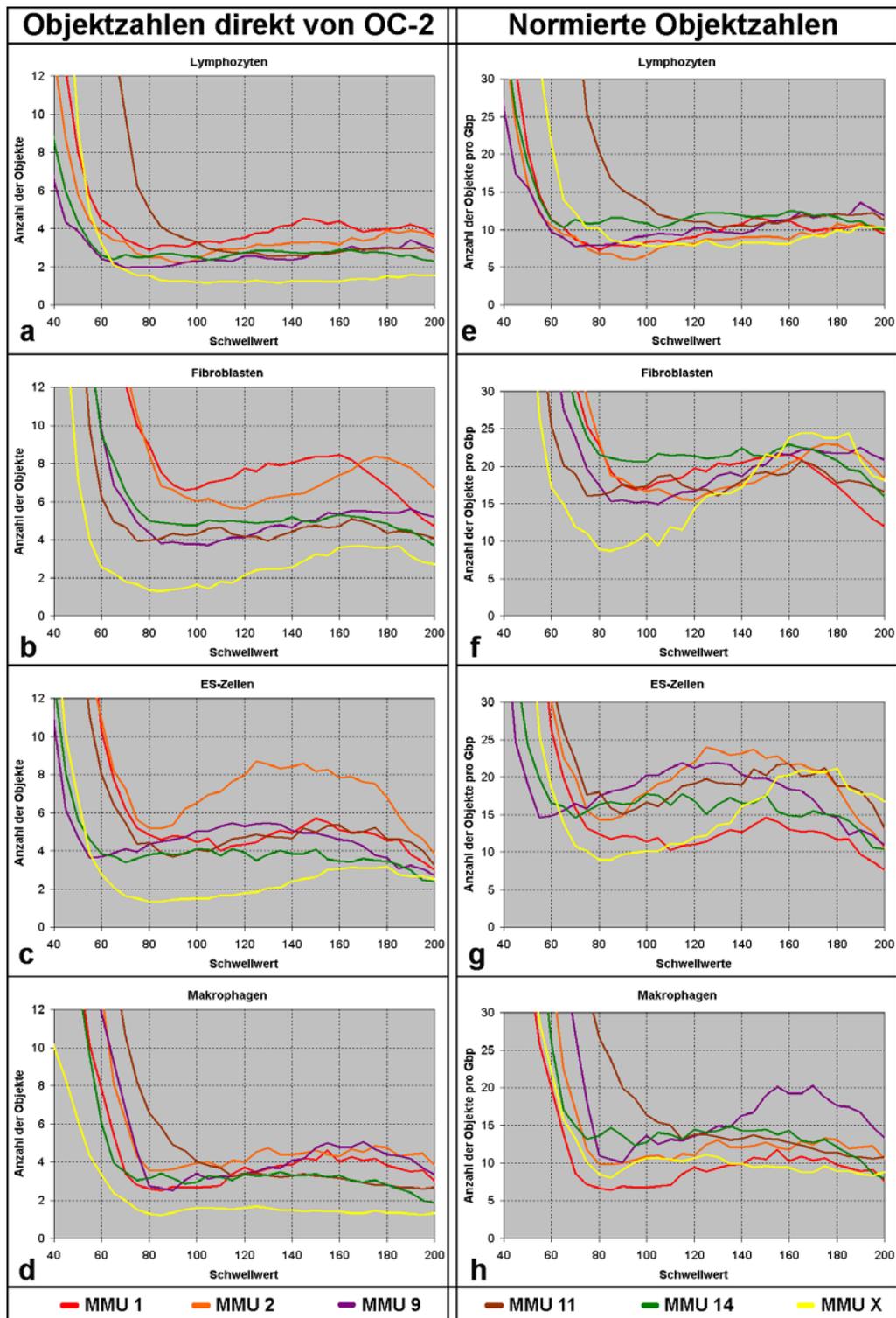


Abbildung 58: Originalwerte und normierte Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Objektzahlen bei steigendem Schwellwert für die sechs Chromosomenterritorien in den vier Mauszelltypen. Wegen der Hintergrundsignale sind die Objektzahlen anfangs sehr hoch, fallen dann aber schnell ab und stellen ab 80 nur noch die Chromosomenterritorien dar.

a-d | Hier sind die originalen Objektzahlen des OC-2 Programms dargestellt.

d-h | Die normierte Anzahl der Objekte, bezogen auf den DNA-Gehalt der untersuchten Chromosomen (in Gbp). Die Kurven des einzelnen X-Chromosoms zeigen, verglichen mit den anderen Autosomen, deutlich höhere Werte als in den Graphen a-d.

Normierung auf den DNA-Gehalt

Bei einem größerem Territorium besteht eher die Möglichkeit, dass es in mehrere kleinere unterscheidbare Objekte zerfällt als ein kleines. Wenn man die gezählten Objekte auf den DNA-Gehalt der jeweiligen Chromosomen normiert, indem die Objektzahlen durch die Basenpaare in Gbp teilt, erhält man vergleichbarere Werte. Feststellbare Unterschiede beruhen bei normierten Werten eher auf charakteristischen Struktureigenschaften, als auf der Länge der Chromosomen. Besonders fallen bei den normierten Graphen die X-Chromosomen auf, deren Kurven nicht mehr getrennt unter den anderen Chromosomen verlaufen, da sie als einzelne Chromosomen nur „halb“ so viel DNA enthalten als die Autosomenpaare (Abbildung 58 e-h). Bei den Lymphozyten, den Fibroblasten und den Makrophagen haben MMU 14, gemessen an ihrem DNA-Gehalt, höhere Objektzahlen als die MMU 1 und 2. Besonders deutlich wird auch die Umkehrung der Objektzahlen von MMU 1. In allen Zelltypen zerfällt das größte Mausechromosom in relativ weniger Objekte als die von MMU 14.

Die statistische Auswertung durch ANOVA und die anschließenden Post-Hoc-Tests betrachtet die Maximalwerte der Einzelkurven ab Schwellwert 90. Deren Mittelwerte sind in Tabelle 30 eingetragen. Dabei fällt besonders bei den **Lymphozyten** der hohe Wert von MMU 11 auf, der sich von den Werten aller anderer untersuchter Autosomen signifikant unterscheidet ($p < 0.001$; Tabelle 31). MMU 2 enthält in Lymphozyten die wenigsten Objekte und unterscheidet sich so zusätzlich noch von MMU X ($p = 0.028$). Durch die Normierung relativieren sich die original großen Abstände zwischen den Kurven bei **Fibroblasten** (vergl. Abbildung 58 b und f) und auf die maximalen, normierten Objektzahlen bezogen, können zwischen den untersuchten Chromosomen keine Unterschiede mehr ausgemacht werden (alle $p > 0.1$; Tabelle 31). Davon unberührt bleibt aber die Tatsache, dass die Chromosomen in Fibroblasten durchschnittlich in die meisten Objekte von den untersuchten Zelltypen zerfallen. In den **ES-Zellen** kommen MMU 1 auf den geringsten normierten Mittelwert, die MMU 1 unterscheiden sich so von allen anderen Chromosomen ($p < 0.023$). Den höchsten Mittelwert in ES-Zellen haben auch nach der Normierung die MMU 2, mit durchschnittlich 34 Objekten pro Gbp (Tabelle 30), dicht gefolgt von MMU 9 mit 33,7 Objekten.

In **Makrophagen** ist die Situation zwiespältig, MMU 1 und MMU X weisen durchschnittlich die wenigsten Objekte auf, während MMU 9 und MMU 11 auf meisten Objekte/Gbp (27.2 bzw. 25.2) kommen ($p < 0.005$). Es ist noch unklar, ob ein Zusammenhang zwischen der Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen und der Abnahme von Objekten in den Chromosomen MMU 2 und MMU X besteht. Beim Übergang von ES-Zellen zu Makrophagen reduzieren sich jedenfalls die Objektzahlen bei diesen Chromosomen höchst signifikant (MMU 2: 34.0 zu 21.0, $p < 0.001$ und MMU X: 31.5 zu 17.1, $p < 0.001$; Tabelle 32). Gleiches ist auch bei MMU 11 zu beobachten (MMU 11: ES-Zellen = 33.7 zu Makrophagen = 25.2, $p = 0.002$), wenngleich MMU 11 immer noch die zweitmeisten Objekte nach MMU 9 (27.2) in Makrophagen aufweist.

Man kann allgemein den Trend beobachten, dass in Fibroblasten und ES-Zellen die untersuchten Chromosomen regelmäßig zu mehr Objekten führen (Tabelle 30).

Zelltyp	Chromosom	n	Ø max. Objektzahl	STABW	SEM	Ø max. Objz. /Gbp
Lymphozyten n=114	MMU 1	39	7.21	2.67	0.43	18.4
	MMU 2	33	6.30	1.83	0.31	17.4
	MMU 9	33	4.73	1.57	0.27	19.0
	MMU 11	42	6.36	2.46	0.37	25.9
	MMU 14	39	4.49	1.32	0.21	19.4
	MMU X	42	3.40	1.27	0.19	22.7
Fibroblasten n=126	MMU 1	50	13.46	7.93	1.12	34.4
	MMU 2	43	12.23	3.88	0.59	33.7
	MMU 9	43	8.63	3.17	0.48	34.7
	MMU 11	33	8.15	1.92	0.33	33.2
	MMU 14	50	8.64	2.95	0.42	37.3
	MMU X	33	5.85	1.60	0.28	39.0
ES-Zellen n=89	MMU 1	29	8.31	2.00	0.37	21.2
	MMU 2	31	12.35	3.51	0.63	34.0
	MMU 9	31	7.90	2.40	0.43	31.7
	MMU 11	29	8.28	2.23	0.41	33.7
	MMU 14	29	6.59	1.92	0.36	28.4
	MMU X	29	4.72	1.28	0.24	31.5
Makrophagen n=77	MMU 1	20	6.75	1.92	0.43	17.2
	MMU 2	18	7.61	2.75	0.65	21.0
	MMU 9	18	6.78	1.86	0.44	27.2
	MMU 11	39	6.18	2.66	0.43	25.2
	MMU 14	20	5.15	1.35	0.29	22.2
	MMU X	39	2.56	0.97	0.21	17.1

Tabelle 30: Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2: Maximale Objektzahlen

Die durchschnittliche maximale Objektzahl der Chromosomenpaare und des einzelnen MMU X. Dazu sind die Standardabweichung der Maximalwerte und die Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die letzte Spalte zeigt die durchschnittliche Objektzahl pro Gbp.

ANOVA				
Chromosom	Lymphozyten	Fibroblasten	ES-Zellen	Makrophagen
df	(5,222)	(5,246)	(5,172)	(5,148)
F	7.67	1.05	9.2	7.33
Sign.	p<0.001	0.388	p<0.001	p<0.001

Post-Hoc: SIDAK				
Chr.kombinationen	Lymphozyten	Fibroblasten	ES-Zellen	Makrophagen
MMU1 — MMU2	1.000	1.000	p<0.001	0.901
MMU1 — MMU9	1.000	1.000	p<0.001	0.002
MMU1 — MMU11	p<0.001	1.000	p<0.001	0.005
MMU1 — MMU14	1.000	0.993	0.023	0.501
MMU1 — MMUX	0.118	0.873	p<0.001	1.000
MMU2 — MMU9	0.999	1.000	0.994	0.237
MMU2 — MMU11	p<0.001	1.000	1.000	0.626
MMU2 — MMU14	0.986	0.968	0.164	1.000
MMU2 — MMUX	0.028	0.772	0.986	0.732
MMU9 — MMU11	0.001	1.000	0.999	0.999
MMU9 — MMU14	1.000	0.998	0.886	0.546
MMU9 — MMUX	0.361	0.938	1.000	p<0.001
MMU11 — MMU14	0.001	0.946	0.268	0.946
MMU11 — MMUX	0.514	0.726	0.998	p<0.001
MMU14 — MMUX	0.463	1.000	0.943	0.243

Gendichte
Hoch
Mittel
Niedrig

P-Wert
p>0,1
0,1>p>0,05
0,05>p>0,01
0,01>p>0,005
0,005>p>0,001
p<0.001

Tabelle 31: Die statistische Auswertung der normierten maximalen Objektzahlen.

Die Bestimmung der maximalen Objektzahlen erfolgte wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, da man Objektkurven wie in Abbildung 58 e-h statistisch nicht miteinander vergleichen kann. Um normierte Objektzahlen zu erhalten, wurden die Werte durch den jeweiligen DNA-Gehalt der entsprechenden Chromosoms geteilt (in Gbp).

a | Es wurden die Gruppen der einzelnen Maximalwerte innerhalb eines Zelltyps verglichen. Die normierten Maximalwerte der Chromosomenterritorien in Fibroblasten sind sich so ähnlich, dass die ANOVA keinen Unterschied ergibt.

b | Aufgeschlüsselt nach Zelltyp gibt die Tabelle die Ergebnisse der Post-Hoc Tests für die zellkerninternen Chromosomenvergleiche an. Die statistische Auswertung betrachtet als Einheit den Zelltyp, in dem die sechs Chromosomen auf ihre unterschiedlichen maximalen Objektzahlen hin untersucht wurden. Die gemittelten Kurven nach Zelltyp sind in Abbildung 58 e-h dargestellt. Beim Vergleich der Objektzahlen der Chromosomen innerhalb eines Zelltyps ergaben sich für jeden Zelltyp außer Fibroblasten signifikante Unterschiede.

Unterschiede zwischen den Zelltypen

Will man die Unterschiede vergleichen, die sich zwischen den Zelltypen ergeben, dann trägt man die Kurven des gleichen Chromosoms aus den vier verschiedenen Zelltypen in ein Diagramm ein, z.B. vier mal Chromosom MMU 1 aus jeweils Lymphozyten, Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen, wie in Abbildung 59 a. Dabei kann man die original von OC-2 erhaltenen Werte verwenden, da gleiche Chromosomen miteinander verglichen werden. Für die statistische Auswertung bleibt es ebenfalls unerheblich, ob mit originalen oder normierten Objektzahlen gerechnet wird.

Beim Betrachten der Diagramme fallen die Kurven der X-Chromosomen auf (Abbildung 59 f), von allen untersuchten Chromosomen scheinen die Kurven von MMU X am einheitlichsten, nur in Fibroblasten und ES-Zellen führen höhere Schwellwerte zu einem Auseinanderbrechen des sonst sehr geschlossen wirkenden Chromosomenterritoriums MMU X.

Die statistische Analyse der maximalen Objektzahlen jedoch ergibt für MMU X den höchsten F-Wert der ANOVA, nämlich $F=46.6$. Damit gibt es nicht nur einen allgemeinen Hinweis auf hoch signifikante Unterschiede ($p<0.001$) zwischen den X-Chromosomen der verschiedenen Zelltypen, sondern auch die

Post-Hoc-Tests zeigen alle hoch signifikante Unterschiede zwischen den Zelltypen bei MMU X (Tabelle 32 b). Das MMU 11 hingegen ist das Chromosom mit dem geringsten F-Wert ($F=7.9$), aber auch hier treten noch vier von sechs möglichen signifikanten Unterschieden auf. Die maximalen Objektzahlen von MMU 11 im Vergleich zwischen Lymphozyten und Makrophagen, sowie zwischen Fibroblasten und ES-Zellen sind aber nicht voneinander zu unterscheiden ($p=1$). Betrachtet man in der Tabelle 32 die Spalten, so stellt man fest, dass sich Fibroblasten am meisten von Lymphozyten und Makrophagen unterscheiden. Im Gegenzug kann man festhalten, dass sich Lymphozyten und Makrophagen von den Objektzahlen der untersuchten Chromosomen her am meisten gleichen.

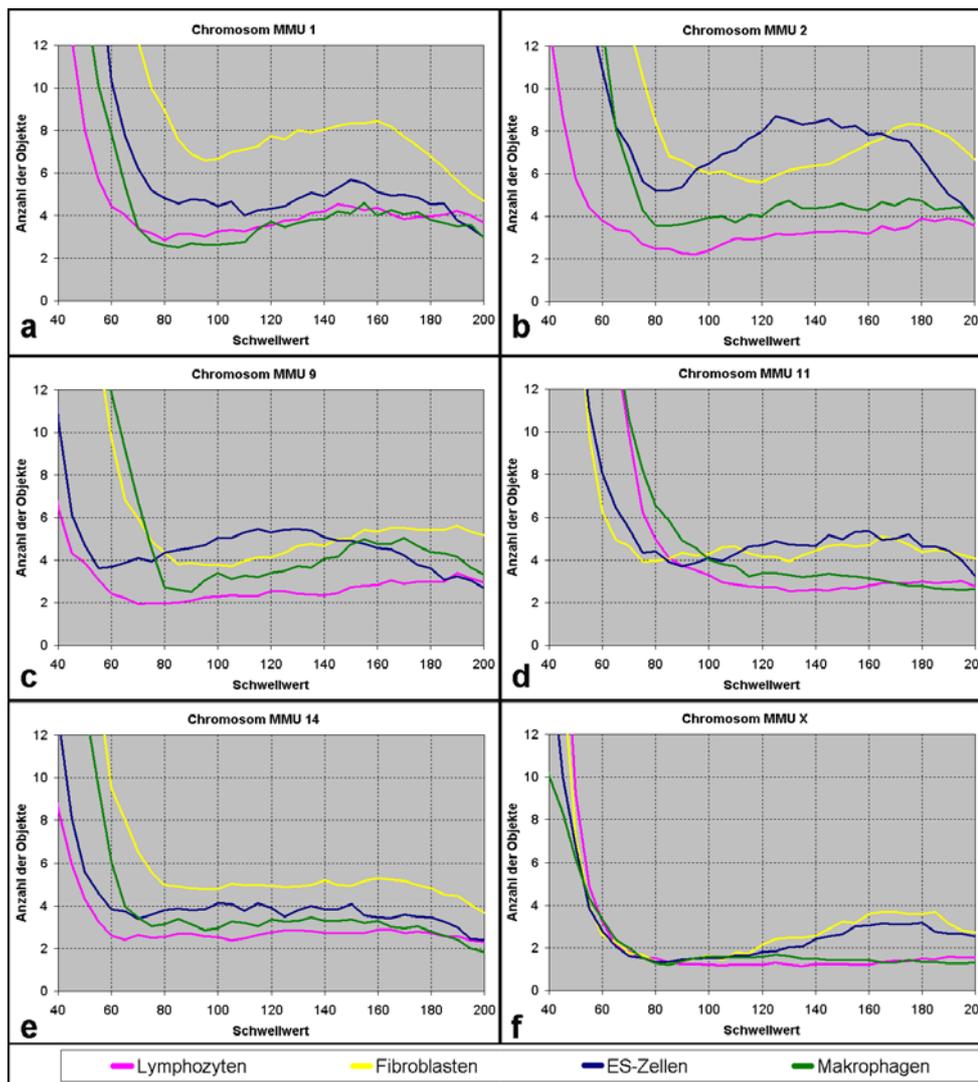


Abbildung 59: Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2 geordnet nach den einzelnen Chromosomen.

Die gleichen Messwerte wie in Abbildung 58 a-d, nur dass hier die gleichen Chromosomen aus den unterschiedlichen Zelltypen in jeweils einem Diagramm zusammengeführt wurden. Eine Bezugnahme auf die Chromosomengröße (Normierung) ist dabei nicht nötig, da immer die gleichen Chromosomen miteinander verglichen werden.

ANOVA				P-Wert	
Chromosom	df	F	Sign.		
MMU 1	(3,134)	14.9	p<0.001	p>0,1	
MMU 2	(3,121)	30.7	p<0.001	0,1>p>0,05	
MMU 9	(3,121)	16.9	p<0.001	0,05>p>0,01	
MMU 11	(3,139)	7.9	p<0.001	0,01>p>0,005	
MMU 14	(3,134)	29.9	p<0.001	0,005>p>0,001	
MMU X	(3,139)	46.6	p<0.001	p<0.001	

Post-Hoc: SIDAK						
Chromosom	Lymphozyten Fibroblasten	Lymphozyten ES Zellen	Lymphozyten Makrophagen	Fibroblasten ES Zellen	Fibroblasten Makrophagen	ES Zellen Makrophagen
MMU 1	p<0.001	0.944	1	p<0.001	p<0.001	0.88
MMU 2	p<0.001	p<0.001	0.661	1	p<0.001	p<0.001
MMU 9	p<0.001	p<0.001	0.031	0.764	0.049	0.552
MMU 11	0.008	0.006	1	1	0.003	0.002
MMU 14	p<0.001	0.001	0.847	0.001	p<0.001	0.137
MMU X	p<0.001	p<0.001	0.019	0.004	p<0.001	p<0.001

Tabelle 32: Statistische Analyse und Vergleich der maximalen Objektzahlen beim Vergleich einzelnen Chromosomen zwischen den Zelltypen. Da die Objektzahlen der gleichen Chromosomen miteinander verglichen werden, ist es egal, ob man die maximalen Objektwerte normiert, oder ob man die direkten Ausgabewerte von OC-2 verwendet.

a | Die Ergebnisse der ANOVA, bei der vom einzelnen Chromosome ausgegangen wird. Bei jedem Chromosome treten signifikante Unterschiede auf, wenn man zwischen den Zelltypen vergleicht.

b | Aufgeschlüsselt nach Zelltypvergleichen gibt die Tabelle nach Post-Hoc-Tests (Sidak) die einzelnen P-Werte an. Bei den maximalen Objektzahlen sind die Lymphozyten den Makrophagen am ähnlichsten, auf der anderen Seite unterscheiden sich die Objektzahlen aller untersuchter Chromosomen in Lymphozyten von denen in Fibroblasten signifikant. Ebenfalls sehr verschieden voneinander sind Fibroblasten und Makrophagen.

3.8.3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Objektzahlen und Gendichte?

Die in Abbildung 60 eingezeichneten Daten sollten einen Überblick über die Verhältnisse von durchschnittlichen maximalen Objektzahlen in Bezug auf die Gendichte erlauben. Es sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den gefundenen maximalen Objektzahlen (unabhängig von der Länge des Chromosoms, also normiert) und der Gendichte auf dem entsprechenden Chromosom besteht. Es wird angenommen, dass auf einem genreichen Chromosom durchschnittlich mehr Gene aktiv sein sollten und die DNA-Struktur sich deswegen lockerer sein müsste. Diese Auflockerung sollte sich in einer höheren Zahl der maximalen Objekte widerspiegeln.

Verbindet man die Punkte, so zeigen die Linien einen unregelmäßigen Verlauf, die Trendlinien (gestrichelt) zeigen bei Lymphozyten, ES-Zellen und Makrophagen eine Steigung und geben so einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Objektzahlen und Gengehalt der jeweiligen Chromosomen. Für Fibroblasten jedoch zeigt die Tendenz nach unten, dort scheinen genreiche Chromosomen tendenziell in weniger Objekte zu zerfallen.

Es ergibt sich also kein einheitliches Bild für die untersuchten Zelltypen.

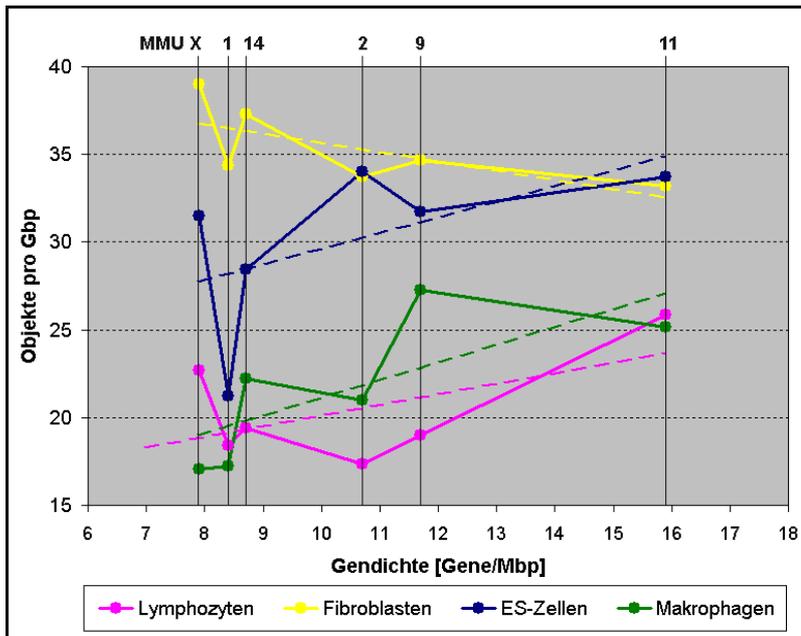


Abbildung 60: Auswertung der Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2

Die Mittelwerte der maximalen Objektzahlen wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Gendichte aufgetragen. Die Unterschiede zwischen den Zelltypen sind teilweise größer als zwischen den unterschiedlichen Chromosomen. Die gestrichelten Linien stellen Trendgeraden dar, die mit Excel eingezeichnet wurden.

Es ist zu bedenken, dass in Fibroblasten die Unterschiede von einem Chromosom zum nächsten sehr gering ausfallen können (MMU 2 zu MMU 9 gleich von 33.7 auf 35.7), während es einen großen Unterschied vom MMU 2 in Fibroblasten zum selben Chromosom in Lymphozyten gibt (33.7 zu 17.4). Die Unterschiede zwischen den Chromosomen innerhalb eines Zelltyps sind also viel geringer als die Unterschiede zwischen den Zelltypen.

Zusammenfassung Objektzählprogramm bei Maus:

Zwei unabhängige Methoden zur Berechnung von Objektzahlen in Bildstapeln führten zu gleichen Ergebnissen. Mit dem Programm OC-2 konnten Unterschiede in der Textur von Chromosomenterritorien bei der Maus innerhalb eines Zelltyps, als auch zwischen Zelltypen festgestellt werden. Es konnte aber kein allgemeiner Zusammenhang zwischen den durchschnittlichen maximalen Objektzahlen und dem Gengehalt der entsprechenden Chromosomen festgestellt werden, vielmehr scheint die Kondition des Chromatins von noch unerkannten, zelltypspezifischen Faktoren beeinflusst zu sein.

3.8.4. Vergleich der Struktur der Chromosomen HSA 18 und 19 in verschiedenen humanen Zelltypen.

Es wurden auch Aufnahmen von menschlichen Zellkernen mit den Chromosomen-Paints HSA 18 und 19 einer Auswertung durch das OC-2 Programm unterzogen. Die Vergleich fanden zwischen normalen Zelltypen und Tumorzelllinien statt. Als normale Zelltypen gingen Lymphozyten (isoliert aus peripherem Blut), GM-CFC (granulocyte-macrophage colony-forming cells, gewonnen aus pluripotenten Blutstammzellen, sie können sich noch weiter differenzieren (Gordon, 1993)), Makrophagen und primäre Fibroblasten in die Untersuchung mit ein. Die Leukämiezelllinie Jurkat und die drei Zelllinien RKO, DLD-1 und SW480 (alle Kolonkarzinom) stehen für Tumorzelltypen. Die Bilddaten mit den FISH-Signalen der menschlichen Zellen wurden von verschiedenen Experimentatoren zur Verfügung gestellt. Es wurde die Chromosomenkombination HSA 18 und 19 untersucht, bei der bereits eine gendichteabhängige Verteilung in humanen Lymphozyten gezeigt werden konnte. Das OC-2 Programm sollte nun darüber Aufschluss geben, ob sich Besonderheiten wie eine aufgelockerte Struktur finden lassen. Eine aufgelockertes Chromosomenterritorium sollte durchschnittlich mehr Objekte ergeben als ein gleich großes kompaktes Chromosomenterritorium. HSA 18 und 19 gehören zum Drittel der kleinsten menschlichen Chromosomen mit 76 bzw. 64 Mbp DNA Gehalt.

Betrachtung der direkten Ergebnisse des OC-2 Programms

In der linken Spalte (a-d) von Abbildung 61 sind die mit OC-2 bestimmten, durchschnittlichen Objektzahlen der Chromosomenterritorien in normalen Zelltypen dargestellt. Optisch kann an den Kurven sowohl in Lymphozyten, als auch in Fibroblasten (beide S-Phase) eine erhöhte Objektzahl für HSA 19 im Vergleich zu HSA 18 festgestellt werden, in den Fibroblasten auch in der G₀-Phase. Bei Lymphozyten in der G₀-Phase verlaufen die Kurven von HSA 18 und 19 sehr eng zusammen. Bei GM-CFC und Makrophagen ist der Unterschied nicht so deutlich, aber in den Kurven ist der Trend zu mehr Objekten bei HSA 19 ist sichtbar.

Bei den Tumorzelltypen in der rechten Spalte (e-h) der Abbildung 61 scheinen die Unterschiede zwischen den Kurven in den ersten drei Zelltypen (Jurkat, RKO und DLD-1) deutlich größer zu sein. Bei den Kurven von SW 480 liefert besonders das HSA 18 eine Kurve, die über weite Strecken flach abfällt und auch HSA 19 zeigt einen untypischen Verlauf. Ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis mit hohem Hintergrund beeinflussen hier die Messung erheblich und eine zuverlässige Aussage kann dazu nicht getroffen werden. Bei Jurkat und DLD-1 dagegen übertreffen die Objektzahlen für HSA 19 die Objektkurve für HSA 18 teilweise sogar um mehr als 60%.

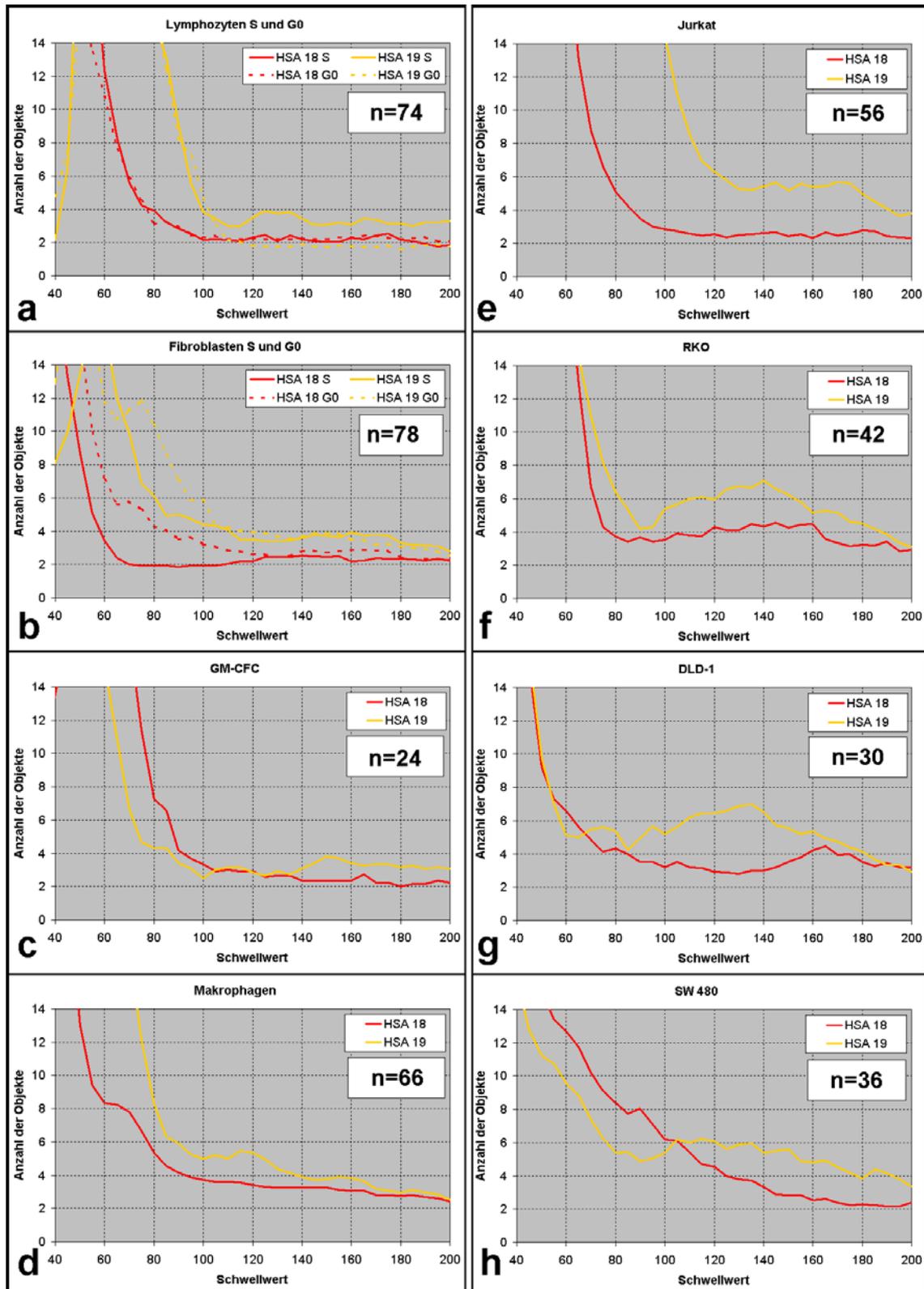


Abbildung 61: Humane Zelltypen, die Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2 mit HSA 18 und 19. Die dargestellten Kurven sind aus den Einzelkurven einer jeden Bildstapelauswertung gemittelt. Die angegebenen n stehen für die Anzahl der berechneten Bildstapel, da teilweise die Auswertung mit unterschiedlichen Anzahlen durchgeführt wurden. Dabei war jeweils nur ein Chromosomenpaar (18 oder 19) pro Zellkern hybridisiert.

a-d | Die Objektkurven in normalen humanen Zelltypen.

e-h | Die Kurven mit den gezählten Objekten in humanen Tumorzelltypen.

Normierung auf den DNA-Gehalt

Für eine Normierung der Objektzahlen der Chromosomenterritorien teilt man die Objektzahlen durch die Länge der Chromosomen in Gigabasenpaare ($2 \times 0.0761 \text{ Gbp} = 0.1522 \text{ Gbp}$ für HSA 18 und $2 \times 0.0638 \text{ Gbp} = 0.1276 \text{ Gbp}$ für HSA 19; siehe Abbildung 2). So erhält man die in Abbildung 62 dargestellten Kurven, von a-d für die normalen Zelltypen, von e-h die der Tumorzelltypen. Bei einer gleichartigen internen Struktur der Chromosomenterritorien wäre zu erwarten, dass die Kurve des Chromosoms HSA 18 in der normierten Darstellung gleichviel Objekte zeigt wie die Kurve von HSA 19. Die Kurven von HSA 19 laufen aber auch in der normierten Darstellung fast alle über denen von HSA 18, manche Kurven erreichen Maxima, die in dem Fall von **Jurkat** sogar doppelt so hoch über dem von HSA 18 liegen, bei 40 (HSA 19) zu 19 Objekten/Gbp bei HSA 18. In **RKO** erreichen HSA 19 um 50 Objekte/Gbp, HSA 18 dagegen nur 30. Genauso in **DLD-1** (50 zu 30). Bei **SW480** dagegen kann man keine klare Aussage treffen.

Vergleicht man die Mittelwerte der normierten, maximalen Objektzahlen mit ANOVA (Tabelle 33a), so erhält man einen F-Wert von 28.5. Die gefundenen Unterschiede sind hochsignifikant ($p < 0.001$). Die Post-Hoc-Tests (Tabelle 33b und c) offenbaren, dass allein die maximalen Objektzahlen in Lymphozyten G0-Phase und in GM-CFC keinen Unterschied erkennen lassen. Bei allen anderen Zelltypen ergeben die HSA 19 deutlich mehr Objekte als HSA 18, als man bei der Annahme von Strukturgleichheit der Chromosomenterritorien hätte erwarten dürfen ($p < 0.009$)

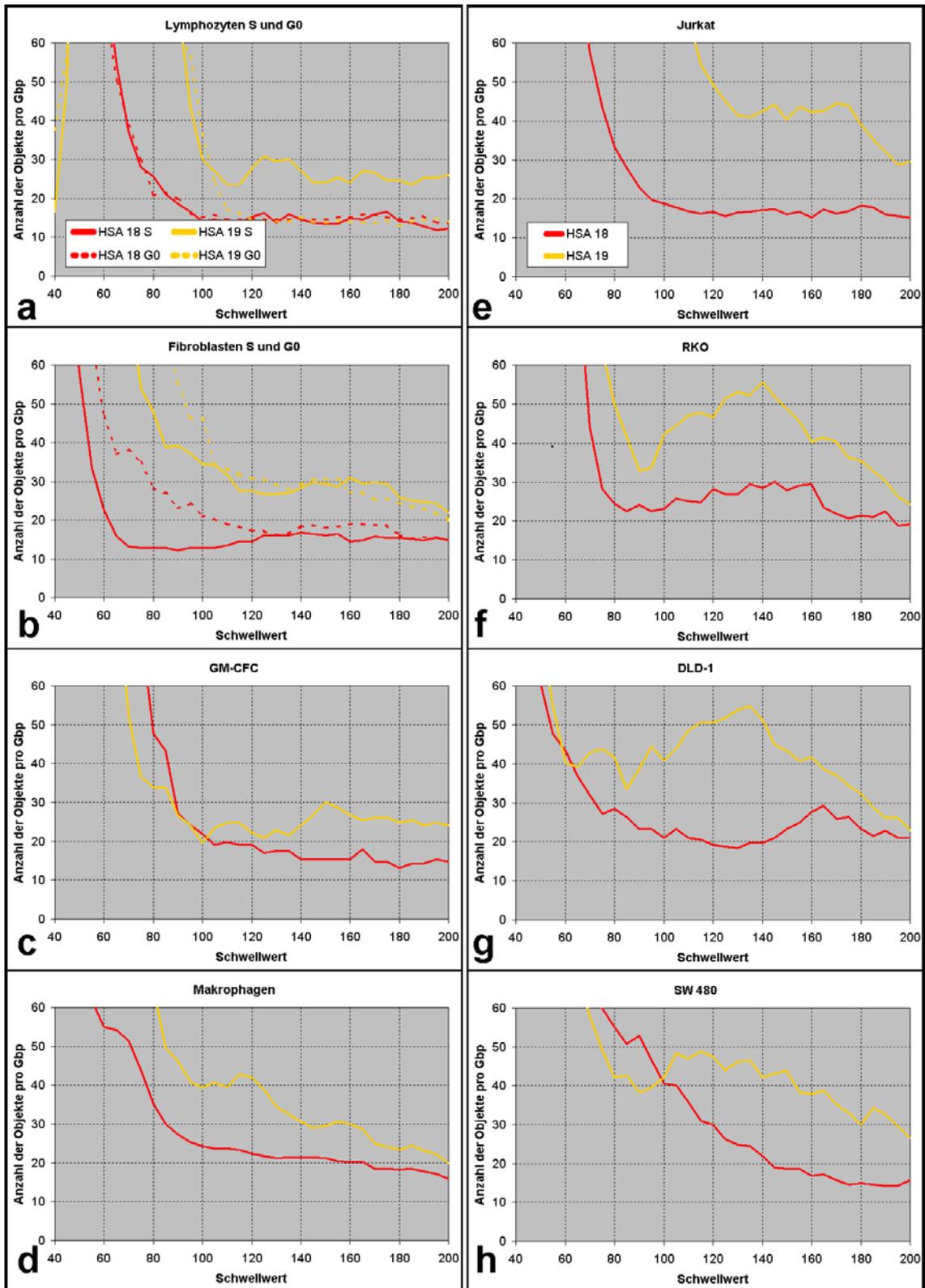


Abbildung 62: Humane Zelltypen, die normierten Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2 mit HSA 18 und 19.

a-d | Die auf den DNA-Gehalt normierten, gemittelten Objektkurven normaler humanen Zelltypen.

e-h | Die auf den DNA-Gehalt normierten Kurven mit den gezählten Objekten in humanen Tumorzelltypen.

a ANOVA: $F(19,398)=28.5$; Sign.<0.001

b Post-Hoc: SIDAK

Normale Zelltypen	HSA 18 - HSA 19	P-Wert
Lymphozyten S-Phase	p<0.009	p>0,1
Lymphozyten G0-Phase	p=1.0	0,1>p>0,05
Fibroblasten S-Phase	p<0.001	0,05>p>0,01
Fibroblasten G0-Phase	p<0.001	0,01>p>0,005
GM-CFC	p=1.0	0,005>p>0,001
Makrophagen	p<0.001	p<0.001

Post-Hoc: SIDAK

Tumorzellen	HSA 18 - HSA 19
Jurkat	p<0.001
RKO	p<0.001
DLD-1	p<0.001
SW 480	p<0.001

c

Tabelle 33: Humane Zelltypen, die statistische Auswertung der maximalen Objektzahlen.

a | Die ANOVA ergibt für alle maximalen, normierten Objektzahlen in humanen Zellen einen F-Wert von 28.5 und $p<0.001$. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der normierten Objektzahlen sind somit nicht zufällig.

b | Die Post-Hoc Tests (SIDAK) zeigen bei den normalen Zelltypen nur bei Lymphozyten in der G0-Phase und bei GM-CFC keine Unterschiede zwischen HSA 18 und HSA 19.

c | In den Tumorzelltypen weisen die Territorien von HSA 19 immer signifikant mehr maximale Objektzahlen auf als die Objekte von HSA 18.

Die durchschnittlichen maximalen Objektzahlen aller normalen Zelltypen

$DMO_{HSA18} = 4.4$ und $DMO_{HSA19} = 5.9$; zusammen $DMO_{Normal} = 5.1$

sind deutlich kleiner als die der Tumorzelllinien

$DMO_{HSA18} = 6.1$ und $DMO_{HSA19} = 9.4$; zusammen $DMO_{Tumor} = 7.7$.

Vergleicht man die maximalen Objektzahlen innerhalb der untersuchten menschlichen Zelllinien, so stellt man fest, dass in den normalen Zelltypen die maximale Objektzahl bei Makrophagen im HSA 19 erreicht wird (6.98), während in den Tumorzelltypen die kleinste „maximale Objektzahl“ erst bei 6.80 beginnt (HSA 18 und DLD-1) (siehe Tabelle 34).

Zelltyp	Chromosom	n	Ø max. Objektzahl	STABW	SEM	Ø max. Objz. /Gbp
Lymphozyten S-Phase	HSA 18	18	4.11	1.78	0.42	27.01
	HSA 19	13	6.31	2.18	0.60	49.43
Lymphozyten G0-Phase	HSA 18	19	3.63	1.12	0.26	23.86
	HSA 19	20	3.95	1.28	0.29	30.96
Fibroblasten S-Phase	HSA 18	20	5.30	2.03	0.45	34.82
	HSA 19	20	6.25	1.74	0.39	48.98
Fibroblasten G0-Phase	HSA 18	19	6.32	2.33	0.54	41.50
	HSA 19	19	6.58	2.73	0.63	51.56
GM-CFC	HSA 18	12	4.92	1.38	0.40	32.30
	HSA 19	13	5.54	2.60	0.72	43.40
Makrophagen	HSA 18	41	6.32	2.08	0.32	41.51
	HSA 19	41	6.98	2.40	0.38	54.67
Jurkat	HSA 18	28	8.82	2.33	0.44	57.96
	HSA 19	28	9.57	2.23	0.42	75.01
RKO	HSA 18	21	9.62	3.38	0.74	63.20
	HSA 19	21	10.10	3.00	0.65	79.12
DLD-1	HSA 18	15	6.80	2.01	0.52	44.68
	HSA 19	15	9.05	3.38	0.87	70.53
SW480	HSA 18	18	8.10	2.79	0.66	52.56
	HSA 19	18	9.02	2.79	0.66	70.53

Tabelle 34: Ergebnisse des Objektzählprogramms OC-2: Maximale Objektzahlen

Die durchschnittliche maximale Objektzahl der Chromosomenpaare HSA 18 und 19. Dazu sind die Standardabweichung der Maximalwerte und die Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Die letzte Spalte zeigt die durchschnittliche Objektzahl pro Gbp.

Unterschiede zwischen den Zelltypen:

Werden die maximalen Objektzahlen der Chromosomen HSA 18 und 19 jeweils über alle Zelltypen hinweg miteinander verglichen, dann ergibt die ANOVA ebenfalls für HSA 18 und 19 F-Werte, die für Werte $p < 0.001$ ausreichen (Tabelle 35a). Die Post-Hoc Tests fallen natürlich unterschiedlich aus. Ein Beispiel dafür sind die Signale von HSA 19 in Lymphozyten (G0-Phase), die sich durchgehend mit höchster Signifikanz von allen HSA 19 in Tumorzellen unterscheiden (Tabelle 35b•). Keine Unterschiede ergeben sich bei Lymphozyten und Fibroblasten, den Zelltypen, die in S-Phase und G0-Phase untersucht wurden (Tabelle 35b•). Es ist auch zu beobachten, dass Unterschiede zwischen den normalen Zelltypen seltener auftreten als wenn normale Zelltypen mit Tumorzelltypen verglichen werden (Tabelle 35b•). Im Gegensatz dazu ergeben die Objektzahlen für HSA 19 beim Vergleich zwischen den Tumorzelltypen keine Unterschiede ($p=1.0$), sie sind sich alle sehr ähnlich (Tabelle 35b•).

a ANOVA für HSA 18: $F(9,201)=14.1$; Sign.<0.001
ANOVA für HSA 19: $F(9,198)=13.1$; Sign.<0.001

Post-Hoc: SIDAK

b

Zelltypenvergleich	HSA 18	HSA 19
Lymphozyten S-Phase - Lymphozyten G0-Phase	1.000	0.296
Lymphozyten S-Phase - Fibroblasten S-Phase	1.000	1.000
Lymphozyten S-Phase - Fibroblasten G0-Phase	1.000	1.000
Lymphozyten S-Phase - GM-CFC	0.787	1.000
Lymphozyten S-Phase - Makrophagen	0.222	1.000
Lymphozyten S-Phase - Jurkat	1.000	0.005
Lymphozyten S-Phase - RKO	p<0.001	0.001
Lymphozyten S-Phase - DLD-1	0.009	0.177
Lymphozyten S-Phase - SW 480	p<0.001	0.126
Lymphozyten G0-Phase - Fibroblasten S-Phase	1.000	0.146
Lymphozyten G0-Phase - Fibroblasten G0-Phase	1.000	0.045
Lymphozyten G0-Phase - GM-CFC	0.185	0.965
Lymphozyten G0-Phase - Makrophagen	0.009	0.001
Lymphozyten G0-Phase - Jurkat	0.943	p<0.001
Lymphozyten G0-Phase - RKO	p<0.001	p<0.001
Lymphozyten G0-Phase - DLD-1	p<0.001	p<0.001
Lymphozyten G0-Phase - SW 480	p<0.001	p<0.001
Fibroblasten S-Phase - Fibroblasten G0-Phase	1.000	1.000
Fibroblasten S-Phase - GM-CFC	0.106	1.000
Fibroblasten S-Phase - Makrophagen	0.003	1.000
Fibroblasten S-Phase - Jurkat	0.804	p<0.001
Fibroblasten S-Phase - RKO	p<0.001	p<0.001
Fibroblasten S-Phase - DLD-1	p<0.001	0.055
Fibroblasten S-Phase - SW 480	p<0.001	0.031
Fibroblasten G0-Phase - GM-CFC	0.901	1.000
Fibroblasten G0-Phase - Makrophagen	0.361	1.000
Fibroblasten G0-Phase - Jurkat	1.000	0.003
Fibroblasten G0-Phase - RKO	p<0.001	p<0.001
Fibroblasten G0-Phase - DLD-1	0.016	0.197
Fibroblasten G0-Phase - SW 480	p<0.001	0.132
GM-CFC - Makrophagen	1.000	0.958
GM-CFC - Jurkat	0.999	p<0.001
GM-CFC - RKO	0.014	p<0.001
GM-CFC - DLD-1	1.000	0.012
GM-CFC - SW 480	0.402	0.007
Makrophagen - Jurkat	0.872	0.001
Makrophagen - RKO	p<0.001	p<0.001
Makrophagen - DLD-1	0.978	0.270
Makrophagen - SW 480	0.038	0.166
Jurkat - RKO	p<0.001	1.000
Jurkat - DLD-1	0.069	1.000
Jurkat - SW 480	p<0.001	1.000
RKO - DLD-1	0.578	1.000
RKO - SW 480	1.000	1.000
DLD-1 - SW 480	1.000	1.000

Tabelle 35: Humane Zelltypen, der Vergleich der maximalen Objektzahlen zwischen den Zelltypen

a | Die ANOVA für die Vergleiche der maximalen Objektzahlen zwischen den Zelltypen. Für beide Chromosomenterritorien HSA 18 und 19 wurden signifikante Unterschiede gefunden.

b | Die Post-Hoc Vergleiche der Chromsomenterritorien HSA 18 oder 19. Die maximalen Objektzahlen wurden zwischen den angegebenen Zelltypen verglichen. Die farbigen Punkte links geben besonders auffällige Konstellationen an, auf die im Text Bezug genommen wird.

Zusammenfassung Chromatintextur bei menschlichen Zellen:

Die Analyse der Chromatinstruktur in normalen menschlichen Zelltypen und in Tumorzelllinien mit dem Objektzählprogramm OC-2 ergab allgemein erhöhte Objektzahlen in den Tumorzellen, verglichen mit den normalen Zelltypen. Davon unabhängig waren auch immer die genreichen HSA 19 durch höhere Objektzahlen charakterisiert als die etwas größeren genarmen HSA 18 in den selben Zelltypen. Vergleicht man die Objektzahlen eines Chromosoms zwischen normalen Zelltypen und Tumorzelllinien, so ergeben sich mehr Unterschiede, als wenn man dies nur innerhalb der normalen Zelltypen tut. Die hier untersuchten Tumorzelllinien weisen eine objektreichere Chromatinstruktur auf, als die ihnen gegenübergestellten normalen Zelltypen.

4. Diskussion

In den folgenden Abschnitten werden neben den biologischen Gesichtspunkten der Ergebnisse auch die methodischen Aspekte der Versuche und der Auswertung angesprochen und diskutiert. Am Ende jeden Abschnitts werden kritische Stellen der Methoden angesprochen und Möglichkeiten zu Verbesserung herausgestellt.

4.1. Radiale Verteilungen

4.1.1. Radiale Verteilungen von Chromosomenterritorien

Die hier vorgelegten Daten ergeben zusammen mit einer weiteren Doktorarbeit (Brero, 2004) detaillierte Einblicke in die Chromosomenverteilungen eines Nicht-Primaten-Säugers.

In Lymphozytenkernen des Menschen wurde eine zentralere Position von Chromosomenterritorien mit hohem Gengehalt beobachtet, während genarme Chromosomenterritorien eher am Rand des Zellkerns lokalisiert sind (Croft et al., 1999; Boyle et al., 2001; Cremer et al., 2001). Ein Zusammenhang zwischen dem Gengehalt der Chromosomen und der radialen Orientierung konnte auch für Hühner gezeigt werden (Habermann et al., 2001), was auf eine hohe evolutionäre Konservierung schließen lässt. In Primaten wurden die Homologen der menschlichen Chromosomen 18 und 19 untersucht, die Ergebnisse ergaben ebenfalls eine gendichteabhängige Verteilung (Tanabe et al., 2002a) (siehe auch Einleitung). Eine evolutionäre Konservierung konnte auch durch die hier gezeigten Untersuchungen weiter belegt werden, denn letzten die gemeinsamen Vorfahren von Mäusen und Menschen lebten vor etwa 87 Millionen Jahren (Springer et al., 2003).

Das Hühnergenom stellt ein besonders ausgeprägtes Beispiel für einen sehr unterschiedlichen Karotyp mit wenigen Makrochromosomen und vielen Mikrochromosomen dar. Es findet sich dort auch ein ausgeprägter reziproker Zusammenhang zwischen Chromosomengröße und Gendichte. Die größten Chromosomen zählen zu den genärmsten. Menschen und Primaten zeigen ebenfalls größere Unterschiede im Karotyp bezüglich Größe und Gendichte. Die Maus dagegen besitzt einen eher homogenen Karyotyp aus 20 akrozentrischen Chromosomen, in dem auch Gendichteunterschiede zwischen den Chromosomen weniger stark ausfallen. Die gefundenen maximalen Unterschiede in der radialen Verteilung der Chromosomen in Maus waren auch kleiner als in Primaten und Hühnern, ein Umstand, der wahrscheinlich mit den eben geschilderten Größen- und Gendichteverhältnissen im Mausgenom zu tun hat (Abbildung 2, S. 13).

Die Methoden zur Bestimmung der radialen Verteilung wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe T. Cremer bereits bei Menschen und Primaten erfolgreich angewandt. Die Daten sind daher direkt vergleichbar. Ein syntener Sequenzabschnitt des genreichsten menschlichen Chromosoms HSA 19 liegt auf MMU 7, weitere Chromosomenteile von HSA 19 sind auf sechs Chromosomen der Maus verteilt. Aus diesem Grund wurde von einem Vergleich mit dem menschlichen HSA 19 Abstand genommen. Das zweit-genreichste menschliche Chromosom HSA 17 hat aber etwa 3/4 syntene Sequenzen mit dem MMU 11 gemeinsam. In G0-Lymphozyten weist das HSA 17 eine durchschnittliche relative radiale Position von 58% auf (Weierich et al., 2003). Im Vergleich zu

HSA 17 liegt das genreichste Mauschromosom MMU 11 weiter außen (66% des Kernradius). Das genreichste menschliche Chromosom 19 kommt auf nur 40-50% des Kernradius, vergleichbare homologe Chromosomen in zehn Primatenspezies auf 40-60% des Kernradius (Tanabe et al., 2002a). Das MMU 11 in Maus nimmt eine radiale Position ein, die im Vergleich zum Menschen ziemlich weit außen liegt. Sowohl im Vergleich zu HSA 17, als auch zur Position des genreichsten HSA 19, ist bei MMU 11 in Lymphozyten keine so ausgeprägte zentrale Anordnung zu beobachten. Trotzdem nehmen MMU 11 in Lymphozyten die zentralste Position ein, die in allen untersuchten Mauszelltypen gemessen wurde.

Ein Vergleich mit den Daten von A. Brero für MMU 11 und X zeigt nur minimale Unterschiede zwischen Lymphozyten in G₀ (Brero) und Lymphozyten in S-Phase (in dieser Arbeit), sowie in ES-Zellen und Makrophagen. In diesen sechs Fällen liegen die Chromosomenterritorien bei A. Brero einheitlich um ein oder zwei Prozentpunkte weiter außen. Diese Übereinstimmung bestätigt die Verlässlichkeit der angewandten Methoden. Meine Beobachtungen zeigen die Verhältnisse in Interphasekernen (frühe bis mittlere S-Phase, mit Ausnahme der Makrophagen, die sich in G₀ befanden), also in Zellzyklusphasen, in denen keine größeren Umlagerungen des Chromatins angenommen werden (Lucas und Cervantes, 2002; Walter et al., 2003). Die Verteilungsunterschiede müssen somit früher etabliert worden sein und unbekannte Mechanismen sorgen dafür, dass sie auch über Zellteilungen hinweg erhalten werden

Neben der gendichteabhängigen Verteilung wurde tendenziell in allen untersuchten Zelltypen eine Korrelation zwischen Chromosomengröße und radialer Verteilung beobachtet (Abbildung 38, rechte Spalte, S. 79). Makrophagen stellen dabei im gewissen Sinn eine Ausnahme unter den untersuchten Zelltypen dar, sie weisen einen höheren Korrelationskoeffizienten für eine größenabhängige Verteilung auf, als sie es für gendichteabhängige Verteilung tun. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Verteilungen je nach Zelltyp unterschiedlich ausfallen.

In menschlichen Fibroblastenkernen wurden sowohl gendichteabhängige (Croft et al., 1999; Bridger et al., 2000; Boyle et al., 2001) als auch größenabhängige (Sun et al., 2000; Cremer et al., 2001; Bolzer et al., 2005) Verteilungsmuster beschrieben. Es ist kürzlich gelungen, beide Thesen miteinander zu vereinbaren, gendichteabhängige und größenabhängige Verteilungsmuster schließen sich bei menschlichen Fibroblasten nicht zwangsläufig aus (Bolzer et al., 2005). HSA 18 und 19 wurden in primären Fibroblasten eng zusammen am Mittelpunkt der Kerne gefunden, ungeachtet der stark unterschiedlichen Gendichte. Es wurde aber auch beobachtet, dass Chromosomenterritorien von HSA 18 in den flachen Fibroblastenkernen mehr in Kontakt zur basalen und apikalen Kernmembran stehen, als HSA 19-Territorien (Bolzer et al., 2005).

Das Chromosom HSA 1 ist ungefähr um den Faktor 3.5 größer als HSA 18 und 19, die beide in humanen Fibroblasten mittig liegen. Bei der Maus hingegen liegt dieser Faktor lediglich bei 1.6, bezogen auf die untersuchten Chromosomen MMU 1 und 14. Dies ist ein möglicher Grund dafür, dass in Mausfibroblasten kein radialer Unterschied zwischen diesen beiden Chromosomen zu sehen ist. Menschliche Chromosomenpaare die ein vergleichbares Größenverhältnis von 1.6 haben, wie etwa HSA 1 und 8, oder HSA 12 und 18, zeigen

ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Bolzer et al., 2005). Wenn man annimmt, dass die Chromosomengröße in Mensch und Maus eine gleichstarke Rolle bei der Anordnung der Chromosomenterritorien spielt, so kann als möglicher Grund für die fehlenden Unterschiede in der radialen Verteilung in Mausfibroblasten die kleineren Größendifferenzen der Chromosomen angenommen werden. Die lineare Regressionsanalyse zeigt jedenfalls für die gendichteabhängige Verteilung einen leicht höheren Wert (0.16) als für die größenabhängige Verteilung (0.14) (Abbildung 38b, S. 79). Möglicherweise muss man sich aber auch von der Vorstellung verabschieden, die Positionen von ganzen Chromosomenterritorien sei ein konstanter Parameter. Gegenstand einer neueren Arbeit war die Beschreibung, dass weniger die Gesamtgendichte eines Chromosoms zur Positionsprognose eines Genlocus im Zellkern beitragen sollte, als dass vielmehr die Gendichte in der Umgebung des Locus (ein Abschnitt von ca. 2 Mbp) die Lage desselben maßgeblich beeinflussen könnte (Murmans et al., 2005). Ein Gen in einer Umgebung mit hoher Gendichte wäre demnach stärker zum Kernmittelpunkt hin lokalisiert, als dasselbe Gen, das durch Translokation in einen genarmen Chromosomenabschnitt gelangt ist (Murmans et al., 2005).

4.1.2. Koexistenz von gendichteabhängiger und größenabhängiger Verteilung:

Hinweise auf eine Koexistenz von größenabhängiger und gendichteabhängiger Verteilung von Chromosomenterritorien wurden auch in humanen Fibroblastenkernen gefunden (Bolzer et al., 2005). Zum einen wurde durch die Hybridisierung markierter ALU-Sequenzen die Lokalisation von genreichem Chromatin sichtbar. In Fibroblasten ergab sich, genauso wie in kugeligen Lymphozyten, ein Rand von genarmem, ALU-freiem Chromatin. Zum anderen führten genaue Abstandsmessungen in Z-Richtung zur Feststellung, dass sich genarme HSA 18 näher am oberen oder unteren Kernrand befinden, als die zentraler gelegenen HSA 19 (Bolzer et al., 2005). Es ist möglich, dass eine größenabhängige Verteilung in 2D-fixierten Fibroblasten auf Auswertungsungenauigkeiten beruht. Andere Bilddaten von Fibroblasten wurden mit neuer Auswertungssoftware untersucht, die absolute Abstände zum Zellkernrand anstellt (ADS) (von Hase, 2006, in Vorbereitung). Dabei konnte auch in den flachen humanen Fibroblasten eine gendichte-abhängige Verteilung von mehreren Chromosomen festgestellt werden. Zwischen genreichen und genarmen Chromosomen, die in einfachen 2D-Projektionen immer in gleicher zentraler Position erscheinen, sind jetzt Unterschiede zu erkennen. So haben kleine, genarme Chromosomen grösserflächigen Kontakt zur Kernhülle. Da auch HSA 19 einen nachweisbaren genarmen Anteil von fast 20% besitzt, ergab eine Unterteilung von HSA 19 in genreiche und genarme Bereiche eine Lokalisation der genarmen Bereiche zur Kernmembran hin, während die genreichen weiter in der Mitte liegen (unveröffentlichte Daten von K. Küpper, 2006, in Vorbereitung).

4.1.3. Evolutionärer Aspekt der Verteilungsmuster

Eine Koexistenz des gendichteabhängigen und des größenabhängigen Verteilungsmusters konnte man in Hühnerzellen nachweisen (Habermann et al., 2001; Stadler et al., 2004). Kleine Mikrochromosomen, die eine viel höhere Gendichte aufweisen als die wenigen Makrochromosomen, sind im Zentrum des Zellkerns konzentriert. Einen zusätzlichen Hinweis auf die gendichteabhängige Verteilung von Chromatin liefern Untersuchungen zu Replikationszeitpunkten des Chromatins in verschiedenen Kernbereichen. Bei der Analyse von

Replikationsmustern konnte zwischen zentral angeordnetem, früh-replizierendem Chromatin und mittel-spät replizierendem Chromatin unterschieden werden, das sich mehr am Kernrand und rund um den Nukleolus befindet (O'Keefe et al., 1992). Dieses Schema wurde nicht nur in Säugern (Sadoni et al., 1999), sondern auch in Vögeln (Habermann et al., 2001) und sogar in Wirbellosen gefunden. Zwei neuere Arbeiten zeigen, dass sich auch in Zellkernen von Hydra (Stamm Cnidaria) und in Mikronuklei von *Stylonychia lemnae* (Stamm Ciliata) das frühreplizierende Chromatin im Inneren der Zellkerne befindet, während mittel-spät replizierendes DNA-Material mit der Zellkernhülle verbunden ist (Alexandrova et al., 2003; Postberg et al., 2005).

Von Vertebraten bis Einzellern wurde also eine Schicht von mittel-spät replizierendem Chromatin am Kernrand und um Nukleoli herum gefunden, die aus genarmen Sequenzabschnitten besteht. Die Replikation von genreichem Chromatin wiederum findet zu Beginn der S-Phase in inneren Bereichen des Zellkerns und in perinukleolärer Umgebung statt. Wenn man unterstellt, dass auch in niederen Organismen der Replikationszeitpunkt mit dem Gengehalt verknüpft ist, dann könnte man davon ausgehen, dass seit der Entstehung eukaryontischer Zellen nie eine zufällige Verteilung des Chromatins im Zellkern gegeben war. Dieser Befund einer evolutionären Konservierung des Anordnungsmusters plädiert auf einen noch unbekanntem adaptiven Nutzen.

Eine vorgeschlagene Schutzfunktion von genreicher DNA durch genarme DNA vor äußeren Einflüssen ist umstritten, weil induzierte Doppelstrangbrüche häufiger in genreichen (innen) R-Banden der Chromosomen stattfinden als in genarmen (außen) G-Banden (Gazave et al., 2005).

4.1.4. Zelltypspezifische Unterschiede

Neben den gefundenen Unterschieden der gendichteabhängigen und größenabhängigen Verteilung von Chromosomen in Maus finden sich noch weitere, signifikante Abweichungen in der Lokalisation einzelner Chromosomen von einem Zelltyp zu einem anderen. Am bemerkenswertesten war der Vergleich zwischen Lymphozyten und ES-Zellen, die beide einen kugeligen Kern haben. Die Chromosomen MMU 9, 11 und 14 unterschieden sich in ihrer Verteilung zwischen den beiden Zelltypen signifikant (siehe Tabelle 22, S. 81), besonders das genreiche MMU 11 rückt in ES-Zellen weiter zum Rand, während die MMU 9 und 14 sich von außen nach innen verlagern. Da die Kerne eine sehr ähnliche Form besitzen, kann man drei mögliche Einflüsse auf die veränderte Positionierung der Chromosomen ausschließen: Die Zellkernform, die Gendichte und die Chromosomengröße. Andere, komplexere Mechanismen müssen dafür verantwortlich sein. Es ist wäre logisch, anzunehmen, dass sich Chromosomenanordnungen zwischen zwei Zelltypen umso mehr unterscheiden, je weiter sie sich in unterschiedliche Richtungen differenziert haben (Parada et al., 2004). Umgekehrt gilt: Wenn in näher verwandten Zelltypen ähnlichere Chromosomenverteilungsmuster gefunden werden als in entfernteren Zelltypen, spricht das für diese Annahme. In kleinen und großen Lungenzellen von Maus wurden keine Unterschiede in einer radialen Anordnung von sechs untersuchten Chromosomen gefunden (Parada et al., 2004). Jedoch ergaben sich in der hier vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede zwischen Lymphozyten und Makrophagen (beide Blutzelltypen). Dort hat möglicherweise die terminale Differenzierung mit zelltypspezifischen Umlagerungen bewirkt, dass sich die chromosomalen Anordnungen geändert haben.

Von der Vorstellung, dass eine gendichteabhängige Verteilung ein jederzeit all-gemeingültiges Ordnungsprinzip für alle Zelltypen sein könnte, darf man nicht unbedingt ausgehen. Neueste, noch unpublizierte Daten aus Stäbchenzellen der Retina (Maus), zeigen genreiches Chromatin am Zellkernrand. Das würde einer Umkehrung der bisher beschriebenen Ordnung entsprechen (I. Solovej, persönliche Auskunft).

4.1.5. Mögliche Mechanismen der nicht-zufälligen Verteilung

Die Kräfte für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Verteilungsmustern sind nicht bekannt. Im Folgenden werden zwei Modelle diskutiert, die beispielsweise erklären sollten, warum in runden Kernen das genarme Chromatin am Zellkernrand lokalisiert ist (Cremer et al., 2001; Schermelleh, 2003).

Modell 1: Einfluss der Kernhülle

Es ist noch unerforscht, ob ein aktiver Verlagerungsvorgang von genarmem Chromatin oder eine passive Verdrängung durch genreiches Chromatin im Kerninneren zu den beobachteten Zuständen in runden Zellkernen führt. Unberührt davon bleibt die Frage, was diesen Zustand aufrecht erhält. Die Kernhülle mit ihren zahlreichen Membranproteinen bietet sich als Verankerungsgrundlage für genarmes Chromatin an. Genarmes Chromatin wird in einer Modellvorstellung über Wechselwirkungen, wie zwischen HP-1 und Adaptermoleküle, die speziell genarme Heterochromatinregionen erkennen, und Kernhüllenproteinen (z.B. Lamin) stärker zum Kernrand gezogen als genreiches Chromatin. Gerade bei der Neuentstehung der Kernhülle nach der Zellteilung könnte eine Verankerung des genarmen Chromatins am Kernrand auch für den Verlagerungsvorgang verantwortlich sein (Burke und Ellenberg, 2002). Einen Hinweis auf die Möglichkeit einer solchen Erklärung geben die Beobachtungen zur autosomal dominanten Pelger-Huet-Anomalie. Eine Mutation im Lamin-B-Rezeptor führt neben Entwicklungsstörungen auch zu Formveränderungen des Zellkerns bei neutrophilen Zellen (PHA-Kerne sind nicht mehr gelappt) und zu einer Auflösung der Heterochromatinanordnung (Hoffmann et al., 2002). Auch bei Mäusen wurden Anomalien der Heterochromatinanordnung bei Mutationen im gleichen Locus gefunden (Shultz et al., 2003). Eine indirekte Interaktion von Heterochromatin Protein 1 (HP 1) über einen Histonkomplex mit dem Lamin-B-Rezeptor wurde in vitro nachgewiesen (Polioudaki et al., 2001). In einem flachen Zellkern ist dagegen für jedes Chromosom ein Kontakt zur Kernhülle möglich, hierbei können jedoch die Kontaktflächen unterschiedlich groß ausfallen und so der Großteil eines Chromosomenterritoriums trotz Kontakt innen liegt.

Modell 2: Die „kippende“ Rosette

Die größenabhängige Verteilung von Chromosomenterritorien, wie von Sun (Sun et al., 2000) und Cremer (Cremer et al., 2001) vorgeschlagen, kann mit der Kernhülle-gesteuerten Theorie nicht erklärt werden. Dazu müsste ein zweiter Mechanismus wirken, der mit der Organisationsform der Prometaphaserosette erklärt werden könnte. Im Stadium der Prometaphase befinden sich die kondensierten Chromosomen in einer kreisförmigen Anordnung, bei der die Zentromere auf dem Rand einer imaginären Nabe angeordnet sind. Dadurch sollten kleinere Chromosomen weiter innen (zur „Nabe“ hin) zu liegen kommen (Chaly und Brown, 1988). Bei Zellen, die auf Substrat wachsen, liegt die Prometaphaserosette zuerst waagrecht zum Substrat. Zur Teilung müsste sie aufgestellt werden, danach würde die flache Zellkernform durch ein Zurückkippen

dieser Ringformation wieder erreicht. Nach der Dekondensation der Chromosomen und dem Wiederaufbau der Kernhülle bleiben sie überwiegend an Ort und Stelle. Dies wäre eine Möglichkeit, wie die größenabhängige Verteilung zustande kommt. Dieses Modell wird unterstützt durch die Beobachtung, dass zu Beginn der Interphase die Zentromere in flachen Zellkernen vorzugsweise entweder auf der basalen oder apikalen Seite des adhärenen Zellkerns zu finden waren (Solovei et al., 2004b). Es konnte in menschlichen Fibroblasten gezeigt werden, dass diese größenabhängige Verteilung auch in Interphasekernen weiter beibehalten wird (Bolzer et al., 2005). Die Abbildung 63 zeigt die beschriebenen Verteilungsmuster.

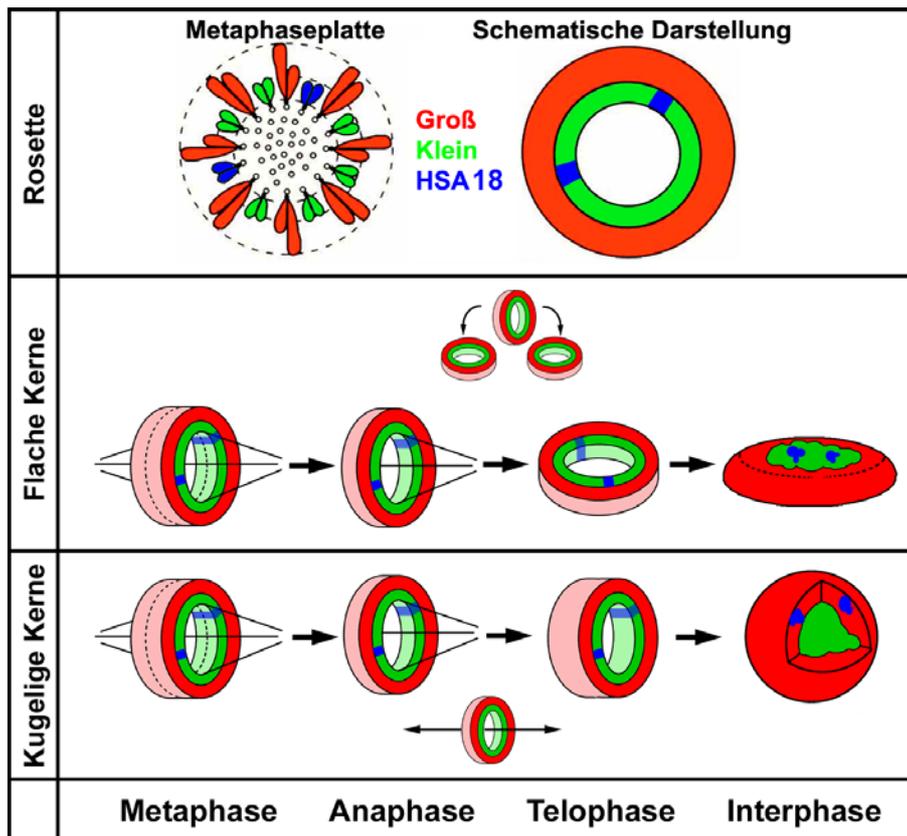


Abbildung 63: Schematische Abbildung hypothetischer Verteilungsmöglichkeiten der Chromosomenterritorien in flache und kugelige Zellkerne. Darstellung nach Habermann und Brero (Habermann et al., 2001; Brero, 2004)

Oben: Die Verteilung von großen und kleinen Chromsomen in humanen Metaphase-Rosetten. Als Beispiel wurde ein kleines Chromosom (HSA 18) besonders in blau hervorgehoben. Der Schwerpunkt der kleinen Chromosomen liegt näher am Mittelpunkt der Metaphaseplatte.

Mitte: Bei flachen Zelltypen „kippt“ die Anaphasen-Konfiguration nach der Mitose und die Chromosomen werden sich parallel zum Substrat ausrichten. Die HSA 18 haben sofort Kontakt zur sich neuaufbauenden Kernhülle.

Unten: Die nicht-adhärenen, kugeligen Zellkerne von Lymphozyten dehnt sich die Anaphasenkonfiguration nach beiden Seiten aus. Während der Expansion zur Wiederherstellung des kugeligen Kerns sorgen ausgedehnte Kontakte zur Kernhülle dafür, dass die HSA 18 Territorien nach außen, an den sich aufbauende Kernrand gezogen werden.

4.1.6. Technischer Aspekt: Beeinflusst die Markierungs- oder Nachweismethode die Daten der radialen Verteilungskurve?

Um potentielle Einflüsse von Haptenmarkierungen und Antikörpernachweisen zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit von Anfang an jedes Experiment so angelegt, dass die Anordnungen von zwei Chromosomenterritorien in doppelten Ansätzen mit wechselnden Haptenen untersucht wurden.

Ein Vergleich von Biotin und Digoxigenin zeigte in den meisten Fällen keine nennenswerten Unterschiede. In einem Fall von elf Teilerperimenten wurde aber ein Unterschied beobachtet, dieser Fall wird kurz dargestellt.

Wie in Abbildung 31a (S. 71) abgebildet, weist die Kurve für MMU 14-dig in Lymphozyten ein höheres Maximum auf und liegt über dem von MMU 1-bio. Dieser Eindruck entsteht, wenn man mit dem Ergebnis des anderen Versuchs- teils mit vertauschten Haptenen vergleicht (Abbildung 31b). Dort liegen die Kurven in umgekehrter horizontaler Orientierung zusammen. MMU 14-bio liegt dort unter MMU 1-dig. Eine Wiederholung des Experiments (Abbildung 31d und e) ergab nach der 3D-RRD Auswertung erneut ein ähnliches Bild: Das Maximum von MMU 14-dig lag wieder über dem von MMU 1-bio.

Dafür kommen zwei Erklärungen in Frage:

Ein Grund für die Höhenunterschiede bei dem ersten Versuch von MMU 1 und 14 mit Lymphozytenkernen kann in Konzentrationsunterschieden der verwendeten Sonden-DNA liegen. Abbildung 64 zeigt das Gelbild, auf dem die für diesen Teilversuch verwendeten Paintsonden aufgetragen sind. Die Sonde MMU 14-bio zeigt darauf ein schwächeres Signal als MMU 14-dig. Da von allen Chromosomen-Paints die gleiche Menge PCR-Produkt für einen Hybridisierungsmix eingesetzt wurde (2.5.2), könnten die Konzentrationsunterschiede für das schwächere Hybridisierungssignal verantwortlich sein. Im Nachhinein wurde festgestellt, dass für den oben geschilderten Einzelfall die in Abbildung 64 gezeigte Sonden-DNA verwendet wurde.

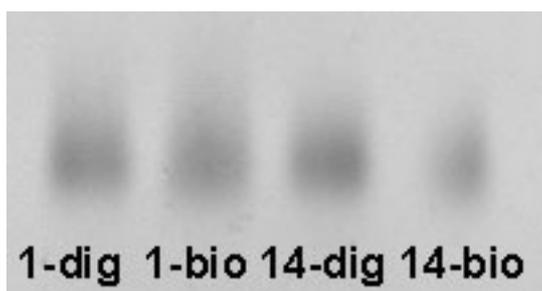


Abbildung 64: Längenüberprüfung der DNA-Fragmente einer Markierungs-PCR

Auf dem Ausschnitt aus einem invertierten Gelbild ist ein deutlicher Konzentrationsunterschied zwischen den Markierungs-PCR-Reaktionen von MMU 14-dig und 14-bio zu erkennen. Es wurden 2 µl DNA, 2 µl Ladepuffer und 4 µl H₂O aufgetragen.

Eine andere Beobachtung zur Erklärung bezieht sich auf den Fluoreszenzfarbstoff. Der Verlauf einer 3D-RRD Kurve kann dann steiler erscheinen, wenn sich mehr Chromosomen-Paint-Signale auf einen engeren Raum konzentrieren. Das könnte beim Nachweis von Digoxigenin-Signalen mit Cy3-Antikörpern der Fall sein.

Die hohe Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 erzeugte ein viel besseres Signal/Hintergrund Verhältnis, als die Antikörper mit FITC/Alexa488, zumindest an dem hier verwendeten Mikroskop Leica TCS4D. Um eine Überbelichtung während der Aufnahmen zu vermeiden, wurde die Empfindlichkeit des Detektors herabgeregelt und schwächere Randbereiche, die sonst möglicherweise zu den Chromosomenterritorien dazugezählt werden würden, fallen weg.

Diese zwei Beispiele zeigen, dass die radiale Verteilung in einem gewissen Maß von der Art der verwendeten Haptene beeinflusst sein kann. Zumindest bei Untersuchungen, die viel kleinere Signale, z.B. BAC-Sonden verwenden, muss man solche möglichen Fehler berücksichtigen.

4.2. Die Anordnung der Chromosomenterritorien relativ zueinander scheint zufällig

Die berechneten radialen Verteilungen geben die gemittelte Verteilung von Chromosomenterritorien in jeweils allen Kernen einer experimentellen Serie an. In einzelnen Kernen kann ein Chromosomenterritorium aber auch eine Position einnehmen, die vom Mittelwert stark abweicht. Darin spiegelt sich die Variabilität der Kernorganisation, die auch dazu führt, dass die Lage der Territorien zueinander stark variiert.

Eine Assoziation von homologen Chromosomen wurde in Interphasezellkernen von *Drosophila melanogaster* gemacht (Henikoff, 1997). Eine homologe Assoziation von Chromosomenterritorien während der Interphase würde viele kleine Winkel zwischen den entsprechenden Territorien nach sich ziehen. Die Daten aus den Winkelmessungen in den hier untersuchten Mauszelltypen ergeben jedoch keine Indizien für eine Abweichung von einer zufälligen Verteilung. Die Winkel zwischen den homologen und heterologen Chromosomenterritorien zeigen keine Häufungen bestimmter Winkel. Eine generelle Assoziation der homologen Chromosomen kann zumindest für die hier untersuchten Zelltypen ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ausnahme stellt der im Ergebnisteil dargestellte Fall (Abbildung 48, S. 91) in Makrophagen dar. Der Mittelwert über alle gefundenen homologen Winkel in MMU 1 war signifikant kleiner als die Mittelwerte der MMU11 und 14 (Tabelle 28, S. 93). Der hohe Prozentsatz an MMU 1 in Makrophagen, die direkt benachbart zueinander lagen und nicht getrennt werden konnten, weist auf eine erhöhte homologe Assoziation von MMU 1 hin.

Eine andere Theorie der Chromosomenverteilung schlägt eine räumliche Trennung der parentalen und maternalen Chromosomensätze vor, mit antiparalleler Anordnung haploider Chromosomen während der Metaphase. Nagele et al. beschrieben in Prophase-Rosetten und Interphase-Zellkernen von HeLa diese antiparallele Anordnung, obwohl zumindest davon ausgegangen werden kann, dass eine Aussage bezüglich Zellkernarchitektur aufgrund der zahllosen Umbauten und Chromosomenverdopplungen in HeLa-Zellen, als nicht übertragbar auf andere Zelltypen angesehen werden kann (Nagele et al., 1995).

Aus einer gegenüberliegenden Positionierung der homologen Chromosomenterritorien auch während der Interphase (Nagele et al., 1995; Nagele et al., 1998) eine Häufung großer Winkel (im Idealfall 180°) abzuleiten. Andere Arbeiten haben in menschlichen Zellen aber keine Hinweise auf eine solche Organisationsform gefunden (Allison und Nestor, 1999; Bolzer et al., 2005). Eine Studie, die sich mit strahlungsinduzierten Chromosomentranslokationen in humanen Lymphozyten beschäftigt, konnte keine Häufung von Translokationen innerhalb bestimmter Chromosomenkombinationen feststellen (Cornforth et al., 2002).

Auch die Ergebnisse meiner Untersuchung an sechs Chromosomenterritorien in vier Mauszelltypen ergeben keinen Hinweis auf eine Trennung in maternale und paternale Chromosomensätze, vielmehr kann aus den Ergebnissen eine hoch

variable Verteilung der Chromosomenterritorien untereinander abgelesen werden.

Auch wenn allgemeingültige, nicht-zufällige Verteilungen bisher nicht gefunden wurden, gibt es doch ernstzunehmende Hinweise auf bevorzugte Nachbarschaften bestimmter Chromosomen in spezifischen Zelltypen, z. B. Milzzellen, in denen die Chromosomen MMU 12, 14 und 15 verstärkt in räumliche Nähe zueinander gelangen (Parada et al., 2002; Parada et al., 2004). Auch Zentromere lagern sich in Blutzellen zu bestimmten Mustern zusammen (Alcobia et al., 2000; Alcobia et al., 2003). Auf chromosomaler Ebene wurde eine Zusammenlagerung von Genen beschrieben. So liegen beispielsweise Gene in bestimmten Zelltypen in engerem Kontakt zueinander, als sie es von den Abständen auf den Chromosomen her eigentlich müssten (Neves et al., 1999; Nikiforova et al., 2000; Lukášová et al., 2002; Roix et al., 2003; Spilianakis et al., 2005). Es wurden auch Fälle von speziellen Homologenpaarungen beschrieben (Arnoldus et al., 1989; Arnoldus et al., 1991; Chandley et al., 1996).

4.3. Verteilung und Anzahl der Chromozentren

4.3.1. Räumliche Verteilung der Chromozentren

Fünf der sechs untersuchten Chromosomenterritorien nehmen eine randständigere Lage im Zellkern ein als die DNA-Gegenfärbung. Nur das genreichste Chromosom MMU 11 ist in Lymphozyten deutlich weiter innen positioniert (Abbildung 37, S. 78).

Es stellte sich daher die Frage, von welchem Kompartiment, von welchen Chromosomen oder Abschnitten von ihnen der innere Teil des Zellkerns eingenommen wird. Der Nukleolus oder die Nukleoli beanspruchen sicher einen zentraleren Teil des Kernvolumens. Eine Nukleolusfärbung wurde jedoch nicht vorgenommen. Abgesehen davon, kommen sowohl die anderen 14 Chromosomenpaare (inklusive der sechs Chromosomen mit NORs) als auch Teile der DNA in Frage, die nicht von der FISH detektiert wurden. Bei FISH von Chromosomen-Paints werden die repetitiven Sequenzen zum Schutz vor Kreuzhybridisierungen mit unmarkierter C_0t -DNA unterdrückt. So können repetitive Zentromere sowie peri- und parazentromerisches Heterochromatin nicht mit Paint-Sonden sichtbar gemacht werden. Mit dem Begriff „peri- und parazentrisches Heterochromatin“ sind die langen repetitiven Bereiche gemeint, die sich vom Zentromer aus gesehen in der Richtung von Chromosomenarmen anschließen. Alle 20 Mausechromosomen sind jedoch akrozentrisch und es gibt zwar zwei kleinere perizentrische Heterochromatinbereiche („minor-satellite“), aber nur einen größeren parazentrischen Heterochromatinbereich („major-satellite“). Zusammen machen sie zwischen 6-17 Mbp je Chromosom aus, insgesamt bestehen schätzungsweise 10% des Mausgenoms aus solchen Abschnitten (Mitchell, 1996). Hauptbestandteil dieses Heterochromatintyps sind tandem-repetitive Sequenzen (von 234 bp DNA). (Mitchell, 1996). „Major“ und „minor“ Satelliten-DNA von Maus verfügen über eine besonders kompakte Struktur (Gilbert und Allan, 2001). Diese Abschnitte lagern sich von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich zusammen und bilden größere Blöcke, die als Chromozentren bezeichnet werden. Die Chromozentren am Nukleolus bauen sich nicht nur aus dem Material von NOR-tragenden Chromosomen auf, sondern können auch Zentromerregionen anderer Chromosomen enthalten. A. Brero

untersuchte in seiner Dissertation (Brero, 2004) ebenfalls die radiale Verteilung von Chromozentren, die er mit FISH-Sonden gegen „mouse major satellite“-DNA nachgewiesen hat. Diese Abschnitte lassen sich besonders gut mit AT-selektiven DNA Farbstoffen wie TO-PRO-3 anfärben. Wie auch schon A. Brero in seiner Dissertation zeigen konnte, sind die von TO-PRO-3 besonders stark gefärbten DNA Bereiche im Zellkern zum größten Teil identisch mit den Arealen, die er mit einer FISH-Sonde für den „mouse major satellite“ zweifelsfrei als heterochromatische Zonen identifizieren konnte (Brero, 2004 S. 120, Fig. 3.14). Die Chromozentren nehmen darin zum überwiegenden Teil einen zentraleren Platz ein, als es die beiden von ihm untersuchten Chromosomenterritorien tun. Ein Ausnahme stellen Lymphozyten dar, in denen das MMU 11 deutlich weiter innen liegt als die Masse der Chromozentren.

Drei der Zelltypen meiner Arbeit befanden sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der S-Phase, nur die Makrophagen wurden als nicht-zyklierende Zellen aufgenommen. Die Ergebnisse der radialen Verteilung beziehen sich auf die Gesamtheit der Chromozentren. Die Verteilung der Chromozentren betreffend (siehe Abbildung 41 auf S. 83), kann man vom Standpunkt der Ontogenie folgende Beobachtungen machen: Die Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen bewirkt eine Verschiebung der Chromozentren nach innen. In Fibroblastenkernen weisen die Chromozentren vergleichbare Werte zu Makrophagen auf. In den Lymphozyten, die ebenfalls am Ende einer Reihe von Differenzierungsschritten stehen, sind die Chromozentren weiter außen lokalisiert als in den ES-Zellen. So entsteht auch der Eindruck, dass die Form des Zellkerns einen Einfluss auf die radiale Anordnung der Chromozentren nehmen könnte. Ausgehend von den Kernen in Lymphozyten, die einer runden Form am nächsten kommen, über ES-Zellkerne, die zwar ebenfalls rund mit geringen Unregelmäßigkeiten sind, bis zu ellipsoid abgeflachten Makrophagenkernen und stark abgeflachten Fibroblastenkernen weichen die Chromozentren immer mehr von Rand ins Innere des Zellkerns zurück (64% → 60% → 55% → 54%).

A. Brero hat ebenfalls die Lokalisation von Heterochromatinbereichen untersucht. Abgesehen von der horizontalen Abweichung (siehe Abbildung 43, S. 84) wird deutlich, dass die Chromozentren in den untersuchten Zelltypen eine sehr ähnliche radiale Verteilung aufweisen. Die jeweiligen zelltypspezifischen Verteilungen der Chromozentren bestätigen sich somit. Als Erklärung für die Abweichungen kann man die zugrundeliegenden Bilddaten annehmen. Die Bilddaten der Chromozentren von A. Brero beruhen auf FISH-Signalen, die gegen die Gegenfärbung gemessen wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Chromozentren jedoch aus der Gegenfärbung selbst durch Anlegen eines hohen Schwellwertes gewonnen. Dadurch wird es fast unmöglich, Teile von Chromozentren in den äußersten der 25 Schalen zu finden. Aus diesem Grund ergibt sich bei meinen Chromozentren generell eine Verschiebung in Richtung Kernmitte. Hier wird deutlich, dass die Kernsegmentierung bei 3D-RRD einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die radiale Verteilungskurve hat. Daher sollten radiale Positionen prinzipiell nicht als absolute Werte betrachtet werden, sondern Schlüsse vielmehr aus dem Vergleich mit anderen Auswertungsreihen/Zelltypen gezogen werden.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass sich Zentromerregionen bestimmter Chromosomengruppen bevorzugt in einem Chromozentrum zusammenfinden (Alcobia et al., 2000). In anderen Zelltypen können wieder andere Chromosomenpaarungen am Aufbau der Chromozentren beteiligt sein

(Alcobia et al., 2000). Die räumlichen Zusammenlagerungen der Zentromere und der perizentromerischen Satellitenregionen zu größeren heterochromatischen Strukturen (den sogenannten Chromozentren) unterscheiden sich in Anordnung und Muster von Zelltyp zu Zelltyp (Manuelidis, 1984). In Säugerzellen wurde die Tendenz zur Zusammenlagerung von Zentromeren um den Nukleolus oder am Kernrand beobachtet. (Haaf und Schmid, 1991). Zentromerpositionen verändern sich auch während der unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus (Ferguson und Ward, 1992; Weimer et al., 1992). Bei der Differenzierung von Rattenmyoblasten wurde eine Umlagerung der Zentromere weg von ungeordneter Verteilung hin zu fast ausschließlich randständigen Orientierung beobachtet (Chaly und Munro, 1996). Gegenteiliges wurde in Purkinje-Zellen beobachtet. Während eines Entwicklungszeitraums von 28 Tagen nahm die randständige Lokalisation von Chromozentren signifikant ab (Solovei et al., 2004a). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die dreidimensionale Organisation des zentromerischen Heterochromatins während der Interphase einen funktionellen Einfluss auf die Regulation der Genexpression nimmt und somit die Wirkung eines epigenetischen Mechanismus ausübt. Für einzelne Gene wurde gezeigt, dass Chromozentrenbereiche transkriptionshemmend wirken, wenn sie in räumlicher Nähe zusammen kommen (Marcand et al., 1996). Ein weiteres Beispiel ist auch die Assoziation von transkriptionell stillgelegten Genen mit „Ikaros“-Proteinkomplexen an zentromerischem Heterochromatin (Brown et al., 1997).

4.3.2. Die Anzahl der Chromozentren ist zelltypabhängig

Die Zahl der Chromozentren wird in einigen Publikationen in einem Zusammenhang mit Differenzierung gesehen. Schon sehr früh wurde in mit Giemsa gefärbten Gewebeschnitten die Tendenz beobachtet, dass weiter differenzierte Zellen weniger Heterochromatinblöcke zeigen als Zellen mit potentieller Proliferationsfähigkeit (Hsu et al., 1971). Die Reorganisation von zentromerischem Heterochromatin wird in einem Zusammenhang von Differenzierungsvorgängen gesehen. Während der *in vitro* Myogenese von Ratten-Myoblasten zu Ratten-Myotuben wurde eine Zunahme von stark kondensiertem Chromatin in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet (Chaly und Munro, 1996). Die Anzahl der Chromozentren kann auch innerhalb einer Zellpopulation gewissen Schwankungen unterliegen, die Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen sind jedoch signifikant. Fibroblasten haben viel mehr Chromozentren als zum Beispiel Lymphozyten. Die Anzahl der Chromozentren scheint mit der Differenzierung von Geweben verknüpft zu sein. An Purkinje-Zellen aus dem Mauskortex wurde dies bereits gezeigt. Darin nimmt die Chromozentrenzahl bis sechs Tage nach der Geburt der Mäuse ab und steigt dann wieder, bis um zehn Chromozentren in den Kernen adulter Tier zu erreichen (Solovei et al., 2004). In den Kernen der von mir untersuchten vier Zelltypen wurde die Anzahl der Chromozentren mit Hilfe des Objektzählprogramms OC-2 bestimmt. Ohne die Hilfe einer geeigneten Software ist es oft schwierig, Signale innerhalb eines Bildstapels nur dem Auge zu zählen, da man die räumlichen Zusammenhänge kaum vollständig erfassen kann. Für die Aufgabe, viel helle Objekte in einem Bildstapel zu bestimmen, ist das Programm OC-2 jedoch sehr gut geeignet, auch weil es über einen Bereich von Schwellwerten die Anzahl der Objekte zählt. Im Fall der Kerngegenfärbung ergibt sich für die Ergebniskurven folgendes Bild: Nach einem ersten Abfall der Kurve (verschwindende Hintergrundsignale) zeigt ein Minimum den kompletten, soliden Zellkern an (minimal ein

Objekt), dann steigt die Kurve an und erreicht am Scheitelpunkt ein Maximum. Dieses Maximum stellt die Anzahl der Chromozentren dar, die bei steigenden Schwellwerten als hellste Objekte stehen bleiben und gezählt werden (siehe auch Abbildung 20 auf S. 56 und Abbildung 53 auf S. 98). Allerdings kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass nicht auch noch andere helle Bereiche mitgezählt werden. Über eine Kernserie hin dürften sich diese möglichen Ungenauigkeiten jedoch ausgleichen. Ähnlich wie bei der radialen Verteilung der Chromozentren, geht es hier mehr um die relativen Unterschiede zwischen den Zelltypen, als um einen exakten Zahlenwert. Die meisten Chromozentren besitzen Fibroblasten, gefolgt von Lymphozyten, ES-Zellen und Makrophagen. Signifikant unterschieden sich die Chromozentrenzahlen lediglich nicht zwischen ES-Zellen und Makrophagen. Während der Differenzierung kam es also zu keiner endgültigen signifikanten Änderung der Chromozentrenzahl, während sich Lymphozyten und Fibroblasten signifikant von den ES-Zellen unterscheiden.

Auch bei den Chromozentrenzahlen konnte mit Daten von A. Brero verglichen werden: Abbildung 45 auf S. 86 zeigt meine Ergebnisse im Vergleich mit Werten, die A. Brero durch manuelles Zählen von FISH-Signalen erhalten hat. Die größere Chromozentrenzahl in S-Phase-Lymphozyten passt zu der von A. Brero gemachten Beobachtung, dass die Zahl der Chromozentren in nicht-zyklierenden Zellen geringer ausfällt (Brero, 2004). Das Ergebnis stützt diese Behauptung in drei von vier Fällen, ES-Zellen treten aufgrund fortwährender Teilungsaktivität nicht in eine G₀-Phase. Der relativ große Unterschied zwischen den Messungen der Chromozentrenzahlen in ES-Zellen könnte seine Ursache auch in den unterschiedlichen Volumina der Zellkerne haben, die im nächsten Abschnitt behandelt werden. Die von A. Brero untersuchten ES-Zellkerne waren um ein gutes Stück größer (siehe Tabelle 27, S. 88), was auch zur Folge haben könnte, dass er durchschnittlich mehr Chromozentren gezählt hat. In einem größeren Volumen liegen sie möglicherweise seltener nebeneinander und so könnten sie eher als zwei Chromozentren getrennt angesehen und gezählt werden. Auch A. Brero konnte in seiner Arbeit eine Abnahme der Chromozentrenzahl in den gleichen Zelltypen (bei Maus) beobachten, ebenso zwischen ES-Zellen und ausgereiften Makrophagen (G₀). Noch zyklierende Makrophagen wiesen dagegen keinen signifikanten Unterschied in der Chromozentrenzahl zu den ES-Zellen auf (Brero, 2004). Fibroblasten, bzw. Lymphozyten haben nach meiner Auswertung mehr Chromozentren als ES-Zellen, aber zwischen Stammzellen und Fibroblasten bzw. Lymphozyten liegen viele verschiedene Differenzierungsschritte. So muss es nicht zwangsläufig bedeuten, dass jede differenzierte Zelle immer weniger Chromozentren aufweist, als die Zelle, von der sie ontogenetisch abstammt. Ein Ansteigen der Chromozentrenzahl ist also ebenfalls möglich, wie es in Purkinje-Zellen beobachtet wurde (Solovei et al., 2004a). In anderen neuronalen Zellen der Maus, den Stäbchenzellen aus der Retina, wurde ein extremes Clustering von Chromozentren beobachtet, das zu durchschnittlich nur 1.6 Chromozentren pro Zellkern führte (Kösem, 2005).

Der Grad der Chromozentren-Kondensation (Clustering) ist nicht nur zelltypspezifisch, sondern auch abhängig von der Spezies. In menschlichen primären Fibroblasten, Lymphoblastoiden Zellen und ES-Zellen ergaben die 46 Chromosomen jeweils mehr als 38, 36 und 34 Zentromersignale und zeigten somit eine

geringere Neigung zur Zusammenlagerung als in den hier untersuchten, vergleichbaren Zelltypen der Maus (Wiblin et al., 2005). Die Chromozentrenzahlen dreier Zelltypen in Mensch und Maus werden in Abbildung 65 verglichen. Man kann für beide Spezies ähnliche Verschiebungen der Chromozentren von Zelltyp zu Zelltyp beobachten. Der Grad des Clustering könnte demnach artspezifisch sein (und auch von der Anzahl der Chromosomen abhängen), die Unterschiede zwischen den Zelltypen könnte speziesübergreifend konserviert sein.

Einen Grund für die höhere Zahl von Chromozentren in Fibroblasten (Mensch wie Maus) könnte man in der Form des Zellkerns finden. In Fibroblastenkernen kann es aufgrund der flachen Form des Kerns rein geometrisch schlechter zur Zusammenlagerung einer größeren Anzahl von Zentromeren kommen, weil die Chromosomen in ihren Verteilungsmöglichkeiten räumlich quasi auf nur zwei Dimensionen beschränkt sind. Eine Zusammenlagerung mehrerer Zentromerregionen in den kugeligen Lymphozyten-Zellkernen führen dort zu einer insgesamt geringeren Anzahl an Chromozentren. Die Kernform allein kann aber nicht allein der Grund für die unterschiedliche Anzahl an Chromozentren sein, weil Lymphozyten und ES-Zellen sich von der Form her zwar gleichen, aber ES-Zellen weniger Chromozentren besitzen als Lymphozyten. Makrophagen sind nicht annähernd so flach wie Fibroblasten und im Gegensatz zu diesen stark differenziert und in G0-Phase.

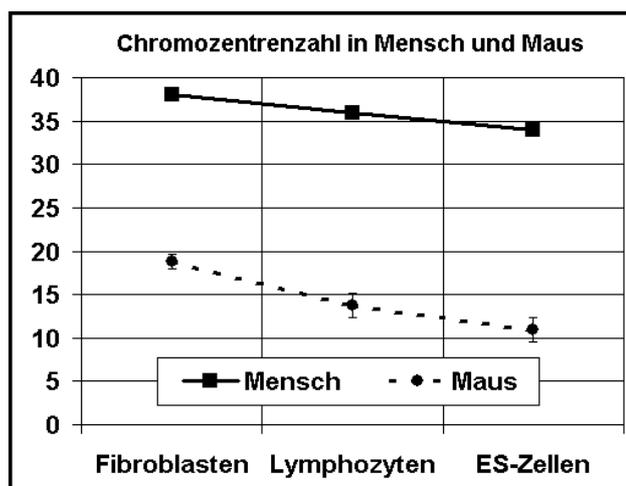


Abbildung 65: Anzahl der Chromozentren. Diese Graphik soll einen Zusammenhang zwischen Chromozentrenzahl und Zelltyp verdeutlichen. Der Vergleich der gleichen Zelltypen von Mensch (Wiblin et al., 2005) und Maus lässt eine Konservierung des Organisationsmusters über evolutionäre Zeiträume möglich erscheinen.

4.4. Die Kernvolumen sind zelltypabhängig

Der Volumenanteil eines Kerns bei sehr kleinen Zellen wie Lymphozyten kann bei über 50% liegen, bei Fettzellen dagegen beträgt der Anteil des Zellkerns am Gesamtvolumen der Zelle bei hoher Lipidspeicherung oft weniger als 1% (Jastrow, 2006). Auch das Volumen von Zellkernen aus unterschiedlichen Geweben variiert beträchtlich. So besitzen Spermien einen winzigen Zellkern, während in neuronalen Zellen oft riesige Zellkerne vorkommen (Kierszenbaum, 2002). Deswegen ist es erstaunlich, dass man in der Literatur nur selten Angaben dazu findet. Dehghani et al. (2005) behaupten, der Zellkern eines typischen Fibroblasten sei $120 \mu\text{m}^3$ groß und die reine DNA inklusive Histone darin würde davon nur etwa 17% des Volumens einnehmen. In eine älteren Arbeit dagegen ist von $500 \mu\text{m}^3$ für einen menschlichen Zellkern die Rede (Carmo-Fonseca et al., 1996). In Lehrbüchern (z. B. Biology von Campbell und Reece, 2002) wird der Durchmesser eines tierischen Zellkerns mit 5-10 μm angegeben, was bei kugelförmiger Form einer Volumenspanne von 65 bis $523 \mu\text{m}^3$ entsprechen würde.

Schon lange ist beispielsweise bekannt, dass während der Reifung von Lymphozyten das Kernvolumen abnimmt (Grundmann, 1958). Eine prinzipielle Abnahme des Kernvolumens mit fortschreitender terminaler Differenzierung wurde zwar vorgeschlagen (Gasser, 2002), aber bei Purkinje-Zellen aus dem Kortex hingegen wurde kürzlich beobachtet, dass das Volumen von Purkinje-Zellkernen im Lauf der Entwicklung stark zunimmt. Am Tag der Geburt wurde ein Zellkernvolumen von $500 \mu\text{m}^3$ gemessen, nach 28 Tagen fortdauernder Entwicklung der dendritischen Verästelungen und Wachstum des Gehirns erreichen die Kerne über $1000 \mu\text{m}^3$ (Solovei et al., 2004a).

Die Rohdaten für die hier durchgeführten Kernvolumenmessung wurden den 3D-RRD Auswertungsergebnissen der Chromozentrenverteilung entnommen. Aus der Gesamtvoxelzahl des segmentierten Kerns wurde das Volumen in μm^3 berechnet. Diese Volumenwerte fügen sich gut in von A. Brero erhobenen Daten ein, die er bei seinen Auswertungen mit bestimmte (siehe Tabelle 27, S. 88). Unstimulierte Lymphozyten in G0 aus frischem Blut, wie sie von A. Brero isoliert wurden, sind kleiner. Die Lymphozyten für diese Arbeit wurden mit ConA stimuliert. Die Stimulation regt die Teilung der Lymphozyten wieder an, mit der DNA-Duplikation während der S-Phase wird das Kernvolumen größer. Diese nun mit Werten belegte Tatsache war auch am Mikroskop deutlich zu sehen. Die Fibroblasten mit ihren großen, aber flachen Kernen liegen vom Volumen her über den Lymphozytenkernen und knapp unter den ES-Zellen (nicht signifikant) (Statistik siehe Tabelle 26, S. 88). Das von mir bestimmte Volumen von ES-Zellkernen liegt deutlich unter den Werten von A. Brero, trotzdem sind sie größer als alle anderen Zelltypen. Die schnell wachsenden ES-Zellen besitzen aber auch in beiden Messreihen die höchste Standardabweichung, ein Hinweis auf die besondere Variabilität der Zellkernformen in ES-Zellen, die normalerweise in Kolonien in engem Kontakt wachsen (siehe Ordner Bilder im Zusatzmaterial, Ordner: ES-Zelle EB5GFP). Die nicht-zyklisierenden Makrophagen haben den kleinsten Volumenmittelwert und die geringste Standardabweichung.

Die relativ großen Unterschiede zwischen meiner Serie von ES-Zellen und der von A. Brero gemessenen könnten ihre Ursache darin haben, dass A. Brero die ES-Zellen vor der Fixierung noch einer schwachen „hypotonischen Behandlung“ unterzogen hat, die bei mir unterblieb (siehe Methoden, 2.2.3). Bereits die einminütige Inkubation der Zellen in $0.5 \times \text{PBS}$ könnte zum Anschwellen des Zellkernvolumens geführt haben und so zu den großen Unterschieden in der Volumenmessung beigetragen haben. Die Werte für Makrophagen hingegen liegen alle recht dicht zusammen, die Schwankungsbreite ist eingeschränkt und liegt im Rahmen dessen, was man als subjektiven Einfluss bezeichnen könnte. Denn die Schwellwerte für eine Segmentierung werden immer noch interaktiv bestimmt, und jeder Experimentator setzt die Schwellwerte ein klein wenig anders. Die Auswirkungen eines veränderten Schwellwerts bemerkt man bei der Betrachtung am Monitor kaum, aber schon kleine Änderungen ergeben bei Volumenberechnungen durch die Wirkung der dritten Potenz erhebliche Unterschiede. So führt bei einer kugeligen Zelle eine Steigung des Radius $4,15 \mu\text{m}$ um nur zehn Prozent zu einem großen Sprung im Volumen, nämlich um ein Drittel, von $300 \mu\text{m}^3$ auf $400 \mu\text{m}^3$. Dieser Sachverhalt der Schwellwertbestimmung stellt auch ein grundlegendes Problem bei der Segmentierung von Zellkernen oder Chromosomenterritorien für 3D-RRD dar.

4.5. Chromatintextur

Bereits früh wurden bestimmte Muster von Heterochromatin-Arealen in terminal differenzierten Zellen beschrieben, wie sie in Blutstammzellen oder Krebszellen nicht vorkommen (Grundmann, 1958; Grundmann und Stein, 1961). Eine fortschreitende Differenzierung führt auch zu einer Zunahme von fakultativem Heterochromatin, weil nicht mehr benötigte Gene so stillgelegt werden können (Dernburg et al., 1996; Csink und Henikoff, 1998). Die Modulierung der Chromatinstruktur ist ein zentraler Bestandteil der Genregulation. Am besten dabei ist die Rolle von Histonmodifikationen untersucht. Die Acetylierung und Methylierung von Lysin-Resten der Histone H3 und H4 gehen je nach Anordnung und Umfang mit Genexpression oder Gensilencing einher (Fischle et al., 2003). Nach einer fraktionierten Auftrennung von verdauter gesamt-genomischer menschlicher DNA in offene und kompakte Chromatinfasern durch Zentrifugation, wurden bestimmte Fraktionen markierter DNA mit FISH auf Metaphasechromosomen hybridisiert. Dabei wurde beschrieben, dass die DNA, die aus der Fraktion „offenes Chromatin“ gewonnen wurde, bei FISH auf Metaphasechromosomen in genreiche Regionen hybridisiert, die aber nicht zwangsläufig auch Teile von transkriptionell aktiven Regionen sein müssen (Gilbert et al., 2004). Chromosomale Bereiche, in denen die offenen Chromatinfasern angereichert liegen, sind auch zytologisch dekondensiert (Gilbert et al., 2004) und entsprechen hoch genreichen Abschnitten des menschlichen Genoms, die T-Banden genannt werden (Holmquist, 1992).

Während sich die oben beschriebenen Beobachtungen auf Veränderungen in der Chromatinstruktur auf molekularer Ebene beziehen, wird schon länger versucht, die Chromatintextur auf Zellkernebene zur Krebsdiagnostik heranzuziehen. Das menschliche Auge ist zwar sehr zuverlässig, wenn es darum geht, Texturunterschiede zu erkennen, wie man es von der Beurteilung von Tumorgewebe durch einen Histologen bereits kennt. So kann das Auge zwar Unterschiede wahrnehmen, aber jeder Beobachter würde sie unterschiedlich beschreiben und unterschiedlich beurteilen. Mit jeweils vier bestimmten Parametern bezüglich Granularität und Kompaktheit des Chromatins konnten Klassifizierungsregeln aufgestellt werden, die eine basale Unterscheidung von verschiedenen Lungenkrebsarten ermöglichten (Schmid et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Textur von Chromosomenterritorien untersucht. Dabei wurde auf diese das auch für Chromozentren verwendete Verfahren des „object-countings“ mit dem Programm OC-2 angewendet.

4.5.1. Vom subjektiven Eindruck zur messbaren Größe

Auch auf Morphologieunterschiede zwischen Chromosomenterritorien wurde schon vor über 20 Jahren hingewiesen. So wurde angenommen, dass die äußere Form beim aktiven X-Chromosom im Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivität steht (Migeon, 1990). Das inaktive X_i -Chromosom erscheint bei Fluoreszenzaufnahmen immer stark kompaktiert (Eils et al., 1996). Innerhalb des X_i konnte keine Transkription festgestellt werden (Verschure et al., 1999). Bei autosomalen Chromosomen in terminal differenzierten und polarisierten menschlichen Bronchialzellen konnten Konformationsunterschiede zwischen homologen Chromosomen festgestellt werden (Koss, 1998). Dabei weist ein Chromosom eine mehr kompakte Form auf, während das andere eine offenere Struktur mit faserigen Ausstülpungen zeigte. Bedenken bei dieser Arbeit sind jedoch an mehreren Stellen angebracht, ein Beispiel dafür sind die Flächenan-

gaben des Autors. Die mittlere Fläche des kleineren Chromosomenterritoriums HSA 1 gibt er mit $90 \mu\text{m}^2$ und $140 \mu\text{m}^2$ für das „offenere“ Territorium an. Quadrate dieser Größenordnung (als kleinstmögliche Flächen) hätte zwischen 9.8 und $11.8 \mu\text{m}$ Seitenlänge, so dass jedes Chromosom alleine bereits die vom Autor abgebildeten Zellkerne bei weitem überragen würde. (Koss, 1998).

Die Beurteilung von Strukturen und Mustern von Chromosomenterritorien nach „Augenmaß“ unterliegt somit natürlich subjektiven Einflüssen, object-counting erlaubt eine objektive, quantitative Auswertung, in der neben der Objektzahl von zerfallenden Chromosomenterritorien weitere Parameter bei schrittweise steigenden Schwellwerten bestimmt werden. So zerfallen kompakte Territorien bei höheren Schwellwerten in eine weniger große Anzahl Objekte, als Territorien, die zu mehr Objekten führen. Bisher konnte in Hühnerzellen nachgewiesen werden, dass in weiter differenzierten Zellen die Anzahl der Objekte des untersuchten Chromosoms 1 ansteigt (Stadler et al., 2004). Eine Zunahme der Objektzahlen während der Differenzierung von Zellen wäre demnach darauf zurückzuführen, dass sich eine größere Anzahl kompakter Chromatinbereiche auflöst und eine Umgestaltung zu offeneren Chromatinbereichen stattfindet. Diese könnten sich voneinander entfernen und dann mikroskopisch feststellbar in mehrere einzelne Bereiche zerfallen. Diese geöffneten Bereiche bieten möglicherweise eine bessere Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und -komplexe aus dem Interchromatinraum, weil sich die Oberfläche der Chromosomenterritorien stark vergrößert. Es sind allerdings noch keine Beweise erbracht worden, dass eine Chromatinverdichtung im Sinne einer höheren Ordnungsebene in direktem Zusammenhang mit Genaktivierung oder Gensilencing zu tun hat.

4.5.2. Unterschiede in den Maus-Zelltypen

In den untersuchten Chromosomenterritorien der vier Maus-Zelltypen ergaben sich signifikante Unterschiede in den Objektzahlen der Chromosomenterritorien und somit der Chromatinstruktur. Einmal zwischen den Chromosomenterritorien eines Zelltyps (siehe Tabelle 31, S. 107), als auch zwischen den Zelltypen selbst (siehe Tabelle 32, S. 109). Es konnten auch Zusammenhänge zwischen den Objektzahlen bei Chromosomenterritorien und dem Differenzierungsstatus des Zelltyps gezeigt werden. Zwischen Gendichte und Objektzahl dagegen konnte kein klarer Zusammenhang nachgewiesen werden.

In einer Modellvorstellung sollte die Verkleinerung des Zellkerns und die Kompaktierung des Chromatins einhergehen mit Einschränkungen der Chromatinmobilität und mit einer verringerten Dynamik im Zellkern (Review: Gasser, 2002). Diese Vorhersage einer stärkeren Kompaktierung des Chromatins in weiter differenzierten Zellen wird beim Vergleich der maximalen Objektzahlen zwischen ES-Zellen und Lymphozyten erfüllt. Die durchschnittlichen maximalen Objektzahlen von Chromosomenterritorien in ES-Zellen sind in allen untersuchten Fällen größer als in Lymphozyten, bei fünf der sechs hier untersuchten Chromosomen sind die Unterschiede signifikant. Beim Vergleich zwischen ES-Zellen und Makrophagen trifft dies nur bei drei Fällen zu. Auffällig ist, dass sich untersuchte Territorien in Lymphozyten und Makrophagen in keinem Fall signifikant voneinander unterscheiden. Lymphozyten und Makrophagen besitzen die kleinsten Zellkerne (siehe 3.6, S. 87) und Makrophagen befinden sich in der G₀-Phase. Zusammen weisen diese beiden Blutzellarten die wenigsten Objekte in den untersuchten Chromosomenterritorien und somit die kompaktesten Ter-

ritorien auf. Eine allgemeine Kompaktierung des Chromatins bei diesen beiden Zelltypen ist mit den Ergebnissen von OC-2 nachweisbar.

Fibroblasten dagegen passen nicht in diese Regel, sie weisen viel mehr Objekte in den sechs untersuchten Chromosomenterritorien auf, als Lymphozyten und Makrophagen und mindestens genauso viel wie ES-Zellen. Die insgesamt hohen Objektzahlen bei Fibroblasten tragen sicher auch dazu bei, dass sich beim statistischen Vergleich (Tabelle 31, S. 107) zwischen den Chromosomen selbst keine Unterschiede ergeben.

Ein Zusammenhang zwischen den durchschnittlichen maximalen Objektzahlen und der Gendichte konnte auch nicht für alle Zellen einheitlich bewiesen werden (siehe 3.8.3, Abbildung 60, S. 110). Die Unterschiede der Objektzahlen innerhalb eines Zelltyps sind jedoch überwiegend kleiner als zwischen den Zelltypen. Es scheint, der Zelltyp übt ebenfalls einen gewissen Einfluss auf die Objektzahlen der Chromosomen aus.

4.5.3. Unterschiede in menschlichen Zelltypen

Die Analyse normaler menschlicher Zelltypen, wie Lymphozyten, Fibroblasten, GM-CFC (granulocyte-macrophage colony-forming cells) und Makrophagen, sowie von Tumorzelllinien (Jurkat, DLD-1, RKO, SW480, siehe 3.8.4 S. 111) hinsichtlich der Objektzahlen in den Chromosomen-Paints von HSA 18 und 19 ergab für HSA19 Territorien einen Zerfall in signifikant mehr Objekte als für jene von HSA 18.

Chromatinveränderungen sind bei Tumorzellen nachweisbar

Bereits die Lageveränderung von Zellkernen untereinander in Geweben wird zur pathologischen Klassifizierung bestimmter Krebsarten verwendet. Erste Versuche einer automatischen Einordnung in Klassen durch ein Computerprogramm zeigten bei Gebärmutterhalskrebs Erfolge (Keenan et al., 2000). Krebsentstehung geht aber nicht nur einher mit Veränderungen der Zellorganisation im Gewebe, sondern auch im Zellkern selbst. Während der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs können in Zellkernen eingreifende strukturelle Abwandlungen ablaufen. Änderungen der Chromatinanordnungen durch Tumorbildung wurden schon früh durch lichtmikroskopische Untersuchungen entdeckt (Grundmann und Stein, 1961). Die Beobachtung, dass auch eine radiale Lagerveränderung von Chromosomenterritorien (Repositionierung) mit einer Krankheit verbunden werden kann, wurde erstmals in humanen Neuronen in Verbindung mit Epilepsie gemacht (Borden und Manuelidis, 1988). Eine Mutation der DNA-Methyltransferase (DNMT) führt zu globaler Hypomethylierung der DNA, was Auswirkungen auf die chromosomale Stabilität hat (Karpf und Matsui, 2005). Dieser Verlust eines epigenetisch wirksamen Mechanismus kann chromosomale Umordnungen durch z.B. Translokationen oder Deletionen zur Folge haben, die zur Tumorentstehung beitragen können (Karpf und Matsui, 2005). In Tumorzellkernen werden oft Anomalien bezüglich der Chromosomenzahl beobachtet. Polyploidien sind häufig, genauso wie ein teilweiser Zugewinn oder Verlust von genetischem Material. Zwei der von Cremer et al. (2003) untersuchten Tumorzelllinien weisen chromosomale Ungleichgewichte (imbalances) bei HSA 18 und 19 auf. Bei Jurkat wurde festgestellt, dass eine Translokation des Chromosoms 18 mit dem X-Chromosom vorliegt. RKO und DLD-1 haben in Bezug auf HSA 18 und 19 einen normalen Karyotyp, in den Zellkernen der Kolonkrebszelllinien SW480 fehlt einem HSA 18 ein q-Arm und es gibt Translokationen von HSA 19 mit anderen Chromosomen, eine CGH

(vergleichende genomische Hybridisierung) lässt aber keine Ungleichgewicht beim Material von Chromosom 19 erkennen (Cremer et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in normalen, als auch in Tumorzelllinien Unterschiede in der radialen Verteilung der Chromosomenterritorien zu finden sind. Die Unterschiede in Tumorzellen sind allerdings signifikant kleiner als in den normalen Zelltypen, dies ist ein Hinweis auf einen teilweisen Verlust der radialen Ordnung in den Kernen maligner Zelllinien (Cremer et al., 2003).

Bilder der von Cremer et al. ausgewerteten Zellkerne wurden für eine Untersuchung der Textur der Chromosomenterritorien im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierbei war von besonderem Interesse, ob Unterschiede zwischen den vier normalen Zelllinien und den vier Tumorzelllinien festgestellt werden können. Vergleicht man die durchschnittlichen maximalen Objektzahlen (DMO), so stellt man fest, dass für normale Zelltypen die größte DMO in Makrophagen HSA 19 erreicht wird. Sie ist vergleichbar mit der kleinsten DMO in Tumorzelltypen (HSA 18 in DLD-1). Die Chromosomenterritorien in Tumorzellen scheinen eine Struktur zu besitzen, die auf mehr Objekten basiert als die Territorien normaler Zelltypen (siehe Tabelle 34, S. 116).

Die durchschnittlichen maximalen Objektzahlen aller normalen Zelltypen sind deutlich kleiner als die der Tumorzelllinien. Beim Vergleich mit normalen Zelltypen zeigt sich demnach, dass bei Tumorzellen eine Veränderung der Chromatinstruktur stattfand, die zu mehr Objekten führte. Offeneres Chromatin deutet darauf hin, dass der Zellkern sich in einer Phase transkriptioneller Aktivitäten befindet, was mit den gesteigerten Zellteilungsraten der hier untersuchten Tumorzelllinien in Übereinstimmung steht.

Die hier vorgestellten Daten eines ersten Vergleiches der Territorienstruktur in menschlichen normalen und Tumorzelllinien müssen jedoch aus folgenden Gründen vorsichtig interpretiert werden: Die Hybridisierungen auf menschliche Zellkerne mit HSA 18 und 19 wiesen stärker schwankende Signalstärken auf als die von der Maus, da die Versuche an menschlichen Zellen von unterschiedlichen Experimentatoren geplant und durchgeführt wurden, die nicht auf einheitliche Markierungs- und Nachweismethoden geachtet haben. So sind die Chromosomen-Paints von HSA 18 und 19 teilweise mit unterschiedlichen Haptenen (auch DNP) markiert, und die Versuche wurden nicht mit wechselnden Haptenen wiederholt, wie bei den Mauszelltypen. Chromosomen-Paints wurden teilweise auf getrennten Präparaten, dafür aber mit den gleichen Haptenen und Antikörpern nachgewiesen (Lymphozyten und Fibroblasten). Darüber hinaus weisen manche Bilddaten unterschiedliche Voxel-Größen auf. Während all diese Unterschiede für die Berechnung einer relativen radialen Verteilung nur eine geringe Rolle spielen, ist das angewendete Verfahren zum object-counting hier empfindlicher. Für eine Vergleichbarkeit der Daten sprechen allerdings die Ergebnisse bei den Jurkat-Zellen. Die Jurkat-Zellkerne wurden in zwei Experimenten hybridisiert, die in einem zeitlichen Abstand von mehr als einem Jahr angefertigt wurden. Die in den einzelnen Serien gefundenen Objektkurven waren einander so ähnlich, dass die Kerne der beiden Serien bedenkenlos zusammengeführt werden konnten. Bei dem Zelltyp SW 480 hingegen wiesen die Bilder ein sehr schlechtes Signal/Hintergrund-Verhältnis auf, aus diesem Grund kommt den Kurven der SW 480 Tumorzelllinie nur ein geringer Aussagewert zu.

4.6. Stammzelltransfektion

Um den Umfang der Bewegungen und die Dynamik von Chromatin zu beobachten, sind Lebendzellbeobachtungen erforderlich. Bei der Beobachtung von Fluoreszenzsignalen in lebenden Zellen entfallen mögliche Fixierungs- und Permeabilisierungsartefakte (Robinett et al., 1996). Besonders interessante Fragestellungen können mit Stammzellen untersucht werden, die über Differenzierungsmöglichkeiten zu anderen Zelltypen verfügen (Schroeder et al., 2003). So können auch Veränderungen, Bewegungen und Umbauten im Chromatin des Zellkerns verfolgt werden.

In dieser Arbeitsgruppe war es bereits gelungen, z.B. CHO-Zellen oder differenzierungsfähige Mausmyoblasten PMI 28 mit dem lac-Operator/lac-Repressor-GFP System zu transfizieren (Hepperger, 2002). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionsversuche mit Maus-Stammzellen (CCE und EB5) führten einerseits zu Zellen mit einem allgemeinen grünen GFP-Signal sowie auch zu Zellen, die nach einer Paralleltransfektion punktförmige YFP-Signale zeigten (siehe 3.1). Über einen Nachweis mit FISH konnten auch die unterschiedlichen Orte der Integration in die Chromosomen visualisiert werden. Dabei zeigte sich, dass der lac-Operator und das lac-Repressor-YFP-Plasmid einerseits in unterschiedliche Chromosomen integrierten, andererseits aber auch gemeinsam an einem Ort eingebaut wurden. Auf den Bildern (Abbildung 28, S. 67) zeigt sich dieser Fall der Kolokalisation durch die Verschmelzung der beiden farbigen Markierungen (grün + rot = gelb). Es war nach der Transfektion jedoch nicht möglich, ES-Zelllinien zu etablieren, die weiterhin die Plasmide stabil exprimierten, es konnten keine reinen Klone isoliert werden. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei offenbar um ein systematisches Problem handelt, da auch in anderen Arbeitsgruppen die dauerhafte und stabile Transfektion von ES-Zellen mit dem lac-Repressor GFP Fusionsprotein nicht möglich war. Möglicherweise ist der Promotor des p3'SS lac-Repressor-GFP-Plasmids für Stammzellen ungeeignet oder das GFP-Fusionsprotein entwickelt in ES-Zellen eine toxische Wirkung, die langfristig zum Absterben der transfizierten Zellen führen.

5. Zusammenfassung

Der Aufbau des Zellkerns und die höheren Organisationsmuster von Chromosomen gehorchen Regeln, die bisher in menschlichen Zellen und Zellen einiger Primaten bestätigt werden konnten.

In dieser Arbeit sollte an einem anderen Säuger, der Maus, untersucht werden, in wie weit sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse auch auf den molekularbiologisch intensiv studierten Modellorganismus der modernen Genomforschung übertragen lassen. Besonders interessant ist die Frage, weil der Karyotyp der Maus nur akrozentrische Chromosomen enthält und viel homogener in Bezug auf Chromosomengröße und Gendichte ist, als der Karyotyp des Menschen oder verschiedener Primaten. Die letzten gemeinsamen Vorfahren von Mäusen und Menschen lebten vor über 80 Mio. Jahren, in dieser Zeitspanne fanden die zahlreichen Veränderungen am Genom der Maus statt.

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Organisation des Chromatins nachzuweisen sind und ob evolutionär konservierte Organisationsmuster zu finden sind.

Die quantitative Untersuchung der Topologie von Chromosomenterritorien und Zentromerregionen erfolgte mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf Zellkernen von vier Zelltypen der Maus. Auf Kerne von Lymphozyten, Fibroblasten, ES-Zellen und Makrophagen wurden die Territorien von sechs Chromosomen mittels Chromosomen-Paint-Sonden hybridisiert. Das ausgewählte Chromosomenset enthielt genreiche, genarme, große und kleine Chromosomen in verschiedenen Kombinationen. Bilddaten wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen und einer digitalen quantitativen Bildanalyse unterzogen.

In allen Mauszelltypen zeigten sich klare Korrelationen zwischen sowohl Gehalt als auch Größe und radialer Verteilung von Chromosomenterritorien. Bei kugeligen Lymphozytenkernen korreliert die Gendichte stärker mit der radialen Verteilung als es die Chromosomengrößen tun. In Fibroblasten sind beide Korrelationen schwächer, aber nachweisbar, in ES-Zellen sind die Korrelationskoeffizienten wieder etwas höher und für beide Verteilungsmodelle gleich, in Makrophagen überwiegt die größenabhängige Verteilung der Chromosomenterritorien. Das genreichste Chromosom MMU 11 zeigt in den Lymphozyten die meisten Unterschiede zu anderen Chromosomenterritorien, während sich das genarme MMU X in den untersuchten männlichen ES-Zellen durch seine extreme Randlage von den anderen unterscheidet. Innerhalb der Fibroblasten und Makrophagen gibt es vergleichsweise wenig signifikante Unterschiede zwischen den radialen Positionen der untersuchten Chromosomenterritorien. Zelltypspezifische Verlagerungen von Chromosomenterritorien zeigten sich auch nach einem Differenzierungsschritt von ES-Zellen zu Makrophagen.

Die Lage der Chromozentren ist zelltypspezifisch. Im Gegensatz zu den untersuchten Chromosomenterritorien liegen die Chromozentren in Fibroblasten und Makrophagen in relativ zentralen Positionen. In Lymphozyten sind die Chromozentren am weitesten nach außen zum Zellkernrand gelangt, gefolgt von den ES-Zellen. Die Anzahl der Chromozentren ist ebenfalls zelltypspezifisch. Ausgehend von der Chromozentrenzahl in ES-Zellen nimmt die Zahl der

Chromozentren in differenzierteren Zellen zu (Lymphozyten, Fibroblasten) oder bleibt gleich (Makrophagen).

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich ausschließen, dass die äußere Form des Zellkerns alleine für die beobachteten Verteilungsunterschiede verantwortlich ist. Allerdings waren die beobachteten Unterschiede kleiner als bei vergleichbaren menschlichen Zelltypen. Mit ein Grund dafür ist sicher die geringere Variabilität der Chromosomengröße und Gendichte im Genom der Maus.

Zellkernvolumina lagen zwischen 470 und 650 μm^3 . Lymphozyten besitzen im Durchschnitt die kleinsten Kerne der zyklierenden Zelltypen, ES-Zellen die größten. Makrophagen befanden sich in der G₀-Phase, ihre Zellkerne waren am kleinsten und wiesen die geringste Standardabweichung auf.

Die Analyse der Winkel und Abstände innerhalb der Chromosomenterritorien zeigte eine sehr flexible Positionierung innerhalb der Grenzen radialer Ordnungsprinzipien. Diese Resultate sind unvereinbar mit einem früher vorgeschlagenen Modell der Trennung des parentalen Genoms. Es gibt keine Hinweise für eine Abweichung von einer zufälligen Verteilung, von einer Häufung nahe beieinanderliegender MMU 1 Homologen in Makrophagen abgesehen.

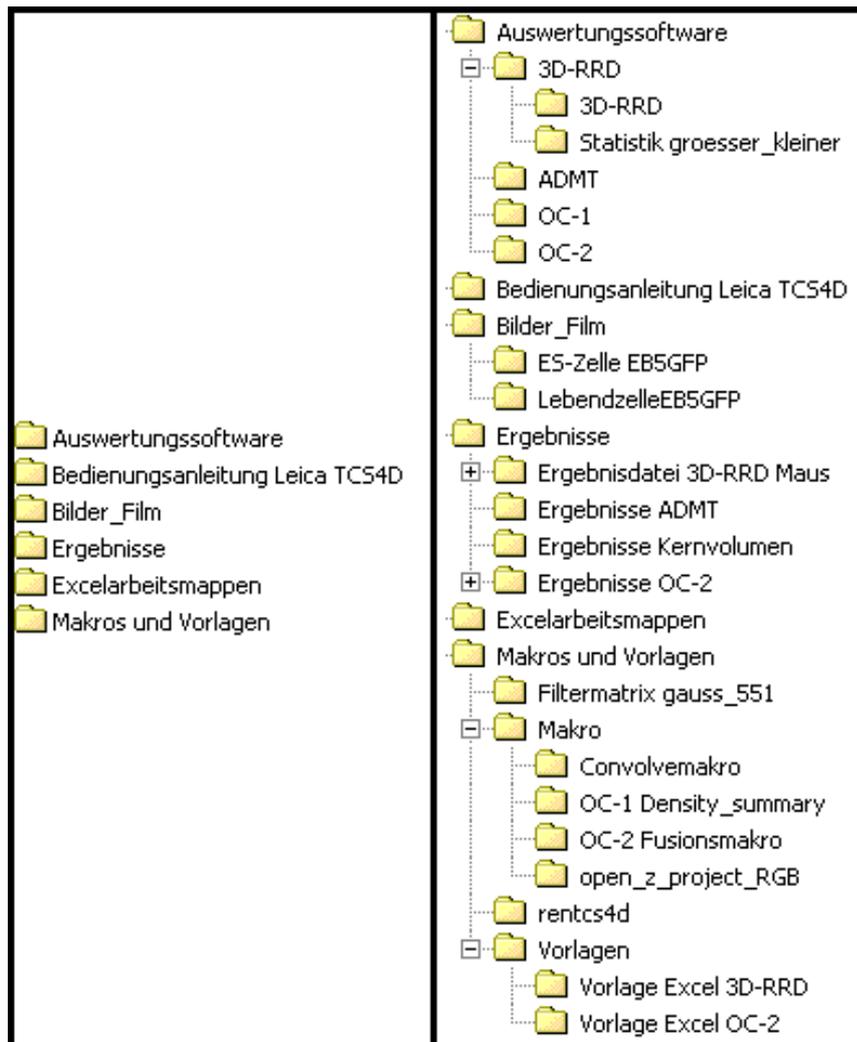
Zur Untersuchung der Struktur von Chromosomenterritorien wurden Programme angewandt, bei denen steigende Schwellwerte zu Zerfällen von Objekten führten, die analysiert wurden. Zwei unabgängige Methoden zur Berechnung von Objektzahlen in Bildstapeln führten zu gleichen Ergebnissen. Mit dem Programm OC-2 konnten Unterschiede in der Textur von Chromosomenterritorien bei der Maus innerhalb eines Zelltyps, als auch zwischen Zelltypen festgestellt werden. Dabei wurden die individuellen Chromosomengrößen mit berücksichtigt. Es konnte kein allgemeiner Zusammenhang zwischen den durchschnittlichen maximalen Objektzahlen und dem Gengehalt der entsprechenden Chromosomen festgestellt werden, vielmehr scheint die Textur des Chromatins von noch unbekanntem, zelltypspezifischen Faktoren beeinflusst zu sein.

Die Analyse der Chromatinstruktur in normalen menschlichen Zelltypen und in Tumorzelllinien mit dem Objektzählprogramm OC-2 ergab allgemein erhöhte Objektzahlen in Tumorzellen, verglichen mit normalen Zelltypen. Davon unabhängig waren auch immer die genreichen HSA 19 durch höhere Objektzahlen charakterisiert als die etwas größeren genarmen HSA 18 in den selben Zelltypen. Vergleiche zwischen den Objektzahlen eines Chromosoms in normalen Zelltypen und Tumorzelllinien ergaben mehr Unterschiede, als Vergleiche nur innerhalb der normalen Zelltypen. Die hier untersuchten Tumorzelllinien weisen eine objektreichere Chromatinstruktur auf, als die ihnen gegenübergestellten normalen Zelltypen.

6. Anhang

Der Inhalt der beiliegenden CD:

- Die Dissertation als pdf-Datei
- Zwei Arbeiten zur genaueren Erklärung des 3D-RRD-Programms
- Zusatzmaterial:



7. Literatur

- Abramowitz, M. (1993). Fluorescence Microscopy, The essentials, Olympus America Inc.
- Alcobia, I., R. Dilao, et al. (2000). "Spatial associations of centromeres in the nuclei of hematopoietic cells: evidence for cell-type-specific organizational patterns." Blood **95**(5): 1608-15.
- Alcobia, I., A. S. Quina, et al. (2003). "The spatial organization of centromeric heterochromatin during normal human lymphopoiesis: evidence for ontogenically determined spatial patterns." Exp Cell Res **290**(2): 358-69.
- Alexandrova, O., I. Solovei, et al. (2003). "Replication labeling patterns and chromosome territories typical of mammalian nuclei are conserved in the early metazoan Hydra." Chromosoma **112**(4): 190-200.
- Allison, D. C. and A. L. Nestor (1999). "Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring." J. Cell Biol. **145**(1): 1-14.
- Arnoldus, E. P., I. A. Noordermeer, et al. (1991). "Interphase cytogenetics reveals somatic pairing of chromosome 17 centromeres in normal human brain tissue, but no trisomy 7 or sex-chromosome loss." Cytogenet Cell Genet **56**(3-4): 214-6.
- Arnoldus, E. P. J., A. C. B. Peters, et al. (1989). "Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum." Hum-Genet **83**(3): 231-4.
- Biel, M., V. Wascholowski, et al. (2005). "Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes." Angew Chem Int Ed Engl **44**(21): 3186-216.
- Boggs, B. A., P. Cheung, et al. (2002). "Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes." Nat Genet **30**(1): 73-6.
- 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.
- Borden, J. and L. Manuelidis (1988). "Movement of the X chromosome in epilepsy." Science **242**(4886): 1687-91.
- Boveri, T. (1909). "Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität." Archiv für Zellforschung **3**: 181-286.
- Boyle, S., S. Gilchrist, et al. (2001). "The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerlin-mutant cells." Hum. Mol. Genet. **10**(3): 211-219.
- Brero, A. (2004). Nuclear topology during cellular differentiation in mouse. Fakultät für Biologie, Department II. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Bridger, J. M., S. Boyle, et al. (2000). "Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts." Curr. Biol. **10**(3): 149-152.
- Brown, K. E., J. Baxter, et al. (1999). "Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division." Mol. Cell **3**(2): 207-217.
- Brown, K. E., S. S. Guest, et al. (1997). "Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin." Cell **91**(6): 845-854.
- Burke, B. and J. Ellenberg (2002). "Remodelling the walls of the nucleus." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 487-97.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2002). Biology. San Francisco, Benjamin Cummings.

- Carmo-Fonseca, M. (2002). "New clues to the function of the Cajal body." EMBO Rep **3**(8): 726-7.
- Carmo-Fonseca, M., C. Cunha, et al. (1996). "The topography of chromosomes and genes in the nucleus." Exp Cell Res **229**(2): 247-52.
- Casolari, J. M., C. R. Brown, et al. (2004). "Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization." Cell **117**(4): 427-39.
- Chaly, N. and D. L. Brown (1988). "The prometaphase configuration and chromosome order in early mitosis." J Cell Sci **91** (Pt 3): 325-35.
- Chaly, N. and S. B. Munro (1996). "Centromeres reposition to the nuclear periphery during L6E9 myogenesis in vitro." Exp Cell Res **223**(2): 274-8.
- Chandley, A. C., R. M. Speed, et al. (1996). "Different distributions of homologous chromosomes in adult human Sertoli cells and in lymphocytes signify nuclear differentiation." J. Cell Sci. **109**(Pt 4): 773-6.
- Chen, D., M. Dunder, et al. (2005). "Condensed mitotic chromatin is accessible to transcription factors and chromatin structural proteins." J Cell Biol **168**(1): 41-54.
- Cheutin, T., A. J. McNairn, et al. (2003). "Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding." Science **299**(5607): 721-5.
- Comings, D. E. and T. A. Okada (1970). "Association of chromatin fibers with the annuli of the nuclear membrane." Exp Cell Res **62**(2): 293-302.
- Corbi, A. L., T. K. Kishimoto, et al. (1988). "The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B." J Biol Chem **263**(25): 12403-11.
- Cornforth, M. N., K. M. Greulich-Bode, et al. (2002). "Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells." J Cell Biol **159**(2): 237-44.
- Cremer, M., K. Küpper, et al. (2003). "Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei." J Cell Biol **162**(5): 809-20.
- 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): 541-67.
- Cremer, M., R. Zinner, et al. (2004). "Three dimensional analysis of histone methylation patterns in normal and tumor cell nuclei." Eur J Histochem **48**: 15 - 28.
- 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., C. Cremer, et al. (1982). "Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV- microbeam experiments." Hum Genet **60**(1): 46-56.
- Cremer, T., G. Kreth, et al. (2000). "Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **10**(2): 179-212.
- Cremer, T., K. Küpper, 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., P. Lichter, et al. (1988). "Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes." Hum Genet **80**(3): 235-46.

- Croft, J. A., J. M. Bridger, et al. (1999). "Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus." J Cell Biol **145**(6): 1119-31.
- Csink, A. K. and S. Henikoff (1998). "Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*." J Cell Biol **143**(1): 13-22.
- Dehghani, H., G. Dellaire, et al. (2005). "Organization of chromatin in the interphase mammalian cell." Micron **36**(2): 95-108.
- Deng, W. (2003). "A new method for improving metaphase chromosome spreading." Cytometry A **51**(1): 46-51.
- Dernburg, A. F., K. W. Broman, et al. (1996). "Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions." Cell **85**(5): 745-59.
- Dernburg, A. F. and J. W. Sedat (1998). "Mapping three-dimensional chromosome architecture in situ." Methods Cell Biol **53**: 187-233.
- Dev, V. G., R. Tantravahi, et al. (1977). "Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line." Genetics **86**(2 Pt. 1): 389-98.
- Dietzel, S. and A. S. Belmont (2001). "Reproducible but dynamic positioning of DNA within chromosomes during mitosis." Nat. Cell Biol. **3**(8): 767-70.
- Dietzel, S., A. Jauch, et al. (1998). "Separate and Variably Shaped Chromosome Arm Domains Are Disclosed By Chromosome Arm Painting In Human Cell Nuclei." Chromosome Research **6**(1): 25-33.
- Dietzel, S., K. Zolghadr, et al. (2004). "Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4603-14.
- Egger, G., G. Liang, et al. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." Nature **429**(6990): 457-63.
- Ehrlich, M. (2002). "DNA methylation in cancer: too much, but also too little." Oncogene **21**(35): 5400-13.
- Ehrlich, M. (2003). "The ICF syndrome, a DNA methyltransferase 3B deficiency and immunodeficiency disease." Clin Immunol **109**(1): 17-28.
- Eils, R., S. Dietzel, et al. (1996). "Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1427-40.
- Essers, J., A. F. Theil, et al. (2005). "Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair." Mol Cell Biol **25**(21): 9350-9.
- Faust, N., C. Bonifer, et al. (1994). "An in vitro differentiation system for the examination of transgene activation in mouse macrophages." DNA Cell Biol **13**(9): 901-7.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." Nat Rev Cancer **4**(2): 143-53.
- Ferguson, M. and D. C. Ward (1992). "Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei." Chromosoma **101**(9): 557-65.
- Ferreira, J., G. Paoletta, et al. (1997). "Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories." J Cell Biol **139**(7): 1597-1610.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond." Nature **425**(6957): 475-9.
- Foster, H. A. and J. M. Bridger (2005). "The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture." Chromosoma **114**(4): 212-29.

- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10604-9.
- Gasser, S. M. (2002). "Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei." Science **296**(5572): 1412-6.
- Gazave, E., P. Gautier, et al. (2005). "Does radial nuclear organisation influence DNA damage?" Chromosome Res **13**(4): 377-88.
- Gilbert, N. and J. Allan (2001). "Distinctive higher-order chromatin structure at mammalian centromeres." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 11949-54.
- Gilbert, N., S. Boyle, et al. (2004). "Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers." Cell **118**(5): 555-66.
- Goldstone, A. P. (2004). "Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment." Trends Endocrinol Metab **15**(1): 12-20.
- Gordon, M. Y. (1993). "Human haemopoietic stem cell assays." Blood Rev **7**(3): 190-7.
- Grundmann, E. (1958). "Die Bildung der Lymphocyten und Plasmazellen im lymphatischen Gewebe der Ratte." Beitr Pathol Anat **119**(2): 217-62.
- Grundmann, E. and P. Stein (1961). "Untersuchungen über die Kernstrukturen in normalen Geweben und im Carcinom." Beitr Pathol Anat **125**: 54-76.
- Haaf, T. and M. Schmid (1991). "Chromosome topology in mammalian interphase nuclei." Exp Cell Res **192**(2): 325-32.
- Habermann, F. A., M. Cremer, et al. (2001). "Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells." Chromosome Res **9**(7): 569-84.
- Henikoff, S. (1997). "Nuclear organization and gene expression: homologous pairing and long-range interactions." Curr Opin Cell Biol **9**(3): 388-95.
- Hepperger, C. (2002). Untersuchung der Interphase-Chromatinorganisation mittels lac Operator / lac Repressor-GFP Markierung. Fakultät für Biologie; Department II. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Hoffmann, K., C. K. Dreger, et al. (2002). "Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly)." Nat Genet **31**(4): 410-4.
- Holmquist, G. P. (1992). "Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features." Am J Hum Genet **51**(1): 17-37.
- Hsu, T. C., J. E. Cooper, et al. (1971). "Arrangement of centromeres in mouse cells." Chromosoma **34**(1): 73-87.
- Jastrow, H. (2006). Electron Microscopic Atlas. **2006**.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Kanda, T., K. F. Sullivan, et al. (1998). "Histone-Gfp Fusion Protein Enables Sensitive Analysis Of Chromosome Dynamics In Living Mammalian Cells." Current Biology **8**(7): 377-385.
- Karpf, A. R. and S. Matsui (2005). "Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells." Cancer Res **65**(19): 8635-9.
- Keenan, S. J., J. Diamond, et al. (2000). "An automated machine vision system for the histological grading of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)." J Pathol **192**(3): 351-62.
- Kernohan, N. M., H. F. Sewell, et al. (1990). "Natural killer cells in cutaneous malignant melanoma." J Pathol **161**(1): 35-40.

- Kierszenbaum, A. L. (2002). Histology and cell biology : an introduction to pathology. St. Louis, Mo., Mosby.
- Knippers, R. (2001). Molekulare Genetik. Stuttgart,, Georg Thieme Verlag.
- Kösem, S. (2005). Funktionelle Zellkernarchitektur in der mausretina. Department Biologie II, Institut für Humangenetik. München, LMU.
- Koss, L. G. (1998). "Characteristics of chromosomes in polarized normal human bronchial cells provide a blueprint for nuclear organization." Cytogenet Cell Genet **82**(3-4): 230-7.
- Küpper, K. (2006, in Vorbereitung). "?"
- Lengauer, C., H. C. Riethman, et al. (1992). "Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2." Cancer Res **52**(9): 2590-6.
- Leonhardt, H. and M. C. Cardoso (2000). "DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer." J Cell Biochem Suppl Suppl **35**: 78-83.
- Leonhardt, H., A. W. Page, et al. (1992). "A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei." Cell **71**(5): 865-73.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell **69**(6): 915-26.
- Lichter, P., A. L. Boyle, et al. (1991). "Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic in situ hybridization." Genet Anal Tech Appl **8**(1): 24-35.
- Lichter, P., T. Cremer, et al. (1988). "Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries." Hum. Genet. **80**(3): 224-234.
- Linder, S., K. Hufner, et al. (2000). "Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages." J Cell Sci **113**(23): 4165-4176.
- Longo, F., S. Garagna, et al. (2003). "Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis." Mol Reprod Dev **66**(3): 279-90.
- Lucas, J. N. and E. Cervantes (2002). "Significant large-scale chromosome territory movement occurs as a result of mitosis, but not during interphase." Int J Radiat Biol **78**(6): 449-55.
- Lukášová, E., S. Kozubek, et al. (2002). "The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei." Chromosome Res **10**(7): 535-48.
- 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): 753-63.
- Manuelidis, L. (1984). "Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(10): 3123-7.
- Manuelidis, L. (1985). "Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization." Hum. Genet. **71**(4): 288-93.
- Manuelidis, L. and J. Borden (1988). "Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction." Chromosoma **96**(6): 397-410.
- Marcand, S., S. M. Gasser, et al. (1996). "Chromatin: a sticky silence." Curr Biol **6**(10): 1222-5.
- Mazia, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.

- Migeon, B. R. (1990). "Insights into X chromosome inactivation from studies of species variation, DNA methylation and replication, and vice versa." Genet-Res **56**(2-3): 91-8.
- Misteli, T. (2000). "Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1841-9.
- Mitchell, A. R. (1996). "The mammalian centromere: its molecular architecture." Mutat Res **372**(2): 153-62.
- Murmann, A. E., J. Gao, et al. (2005). "Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus." Exp Cell Res **311**(1): 14-26.
- Nagai, T., K. Iyata, et al. (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." Nat Biotechnol **20**(1): 87-90.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1998). "Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation." Chromosoma **107**(5): 330-8.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1995). "Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order." Science **270**(5243): 1831-5.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1999). "Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells." J Cell Sci **112**(Pt 4): 525-35.
- Nakano, T., H. Kodama, et al. (1994). "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture." Science **265**(5175): 1098-101.
- Neves, H., C. Ramos, et al. (1999). "The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation." Blood **93**(4): 1197-1207.
- Nicholls, R. D., S. Saitoh, et al. (1998). "Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes." Trends Genet **14**(5): 194-200.
- Nikiforova, M. N., J. R. Stringer, et al. (2000). "Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells." Science **290**(5489): 138-141.
- Nishimoto, M., A. Fukushima, et al. (1999). "The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2." Mol Cell Biol **19**(8): 5453-65.
- O'Keefe, R. T., S. C. Henderson, et al. (1992). "Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences." J Cell Biol **116**(5): 1095-110.
- Ostermeier, G. C., Z. Liu, et al. (2003). "Nuclear matrix association of the human beta-globin locus utilizing a novel approach to quantitative real-time PCR." Nucleic Acids Res **31**(12): 3257-66.
- Parada, L., P. McQueen, et al. (2004). "Tissue-specific spatial organization of genomes." Genome Biology **5**(7): R44.
- Parada, L., P. McQueen, et al. (2002). "Conservation of relative chromosome positioning in normal and cancer cells." Curr Biol **12**(19): 1692.
- Pederson, T. (2000). "Half a century of "the nuclear matrix"." Mol Biol Cell **11**(3): 799-805.
- 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. USA **85**: 9138-9142.

- Polioudaki, H., N. Kourmouli, et al. (2001). "Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1." EMBO Rep **2**(10): 920-5.
- Postberg, J., O. Alexandrova, et al. (2005). "Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription." J Cell Sci **118**(Pt 17): 3973-83.
- Rabbitts, P., H. Impey, et al. (1995). "Chromosome specific paints from a high resolution flow karyotype of the mouse." Nat Genet **9**(4): 369-75.
- Rabl, C. (1885). "Über Zelltheilung." Morphologisches Jahrbuch **10**: 214-330.
- Robinett, C. C., A. Straight, et al. (1996). "In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition." J. Cell Biol. **135**(6): 1685-1700.
- Roix, J. J., P. G. McQueen, et al. (2003). "Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas." Nat Genet **34**(3): 287-91.
- Sadoni, N., S. Langer, et al. (1999). "Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments." J Cell Biol **146**(6): 1211-26.
- 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.
- Scheer, U. and R. Hock (1999). "Structure and function of the nucleolus." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 385-90.
- Schermelleh, L. (2003). Dynamic organization of chromosomes in the mammalian cell nucleus. Department Biologie II. München, LMU.
- Schmid, K., N. Angerstein, et al. (2006). "Quantitative nuclear texture features analysis confirms WHO classification 2004 for lung carcinomas." Mod Pathol **19**(3): 453-9.
- Schroeder, T., S. T. Fraser, et al. (2003). "Recombination signal sequence-binding protein Jkappa alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4018-23.
- Shultz, L. D., B. L. Lyons, et al. (2003). "Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly." Hum Mol Genet **12**(1): 61-9.
- Sims, R. J., 3rd, K. Nishioka, et al. (2003). "Histone lysine methylation: a signature for chromatin function." Trends Genet **19**(11): 629-39.
- Solovei, I., N. Grandi, et al. (2004). "Postnatal changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development." Cytogenetics and Genome Research **105**(2-4): 142-150.
- Solovei, I., N. Grandi, et al. (2004a). "Postnatal changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development." Cytogenetics and Genome Research **105**(2-4): 142-150.
- Solovei, I., J. Walter, M. Cremer, F. Habermann, L. Schermelleh T. Cremer (2001). FISH on three-dimensionally preserved nuclei. Oxford, Oxford University Press.
- Solovei, I., J. Walter, M. Cremer, F. Habermann, L. Schermelleh, and T. Cremer (2002a). FISH on three-dimensionally preserved nuclei. Oxford, Oxford University Press.
- Solovei, I., L. Schermelleh, et al. (2004b). "Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types." Chromosoma **112**(8): 410-23.

- Spilianakis, C. G., M. D. Lalioti, et al. (2005). "Interchromosomal associations between alternatively expressed loci." Nature **435**(7042): 637-45.
- Springer, M. S., W. J. Murphy, et al. (2003). "Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1056-61.
- Sproul, D., N. Gilbert, et al. (2005). "The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes." Nat Rev Genet **6**(10): 775-81.
- Stadler, S., V. Schnapp, et al. (2004). "The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation." BMC Cell Biol **5**(1): 44.
- Stahl, A., M. Hartung, et al. (1976). "Chromosomal constitution of nucleolus-associated chromatin in man." Hum Genet **35**(1): 27-34.
- Sun, H. B., J. Shen, et al. (2000). "Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei." Biophys J **79**(1): 184-90.
- Tanabe, H., F. A. Habermann, et al. (2002b). "Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications." Mutat Res **504**(1-2): 37-45.
- Tanabe, H., K. Küpper, et al. (2005). "Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys." Cytogenet Genome Res **108**(1-3): 255-61.
- Tanabe, H., S. Müller, et al. (2002a). "Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4424-9.
- Telenius, H., N. P. Carter, et al. (1992). "Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer." Genomics **13**: 718-725.
- Thomson, I., S. Gilchrist, et al. (2004). "The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1." Curr Biol **14**(2): 166-72.
- 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.
- Visser, A. E. and J. A. Aten (1999). "Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei." J Cell Sci **112**(Pt 19): 3353-60.
- 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): 1565-76.
- von Hase, J. (2002). Digitale Bildanalyse der radialen Verteilung von spezifischen Subregionen im Zellkern. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät Ruprecht-Karls-Universität. Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität.
- von Hase, J. (2006, in Vorbereitung). "???"
- Walter, J., L. Schermelleh, et al. (2003). "Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages." J Cell Biol **160**(5): 685-97.
- Weaving, L. S., C. J. Ellaway, et al. (2005). "Rett syndrome: clinical review and genetic update." J Med Genet **42**(1): 1-7.
- Weierich, C., A. Brero, et al. (2003). "Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes." Chromosome Res **11**(5): 485-502.

- Weimer, R., T. Haaf, et al. (1992). "Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0, G1, S, G2, G1, and early S' phase in human lymphocytes." Hum. Genet. **88**(6): 673-82.
- Wiblin, A. E., W. Cui, et al. (2005). "Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells." J Cell Sci **118**(Pt 17): 3861-8.
- Winking, H., K. Nielsen, et al. (1980). "Variable positions of NORs in *Mus musculus*." Cytogenet Cell Genet **26**(2-4): 158-64.
- Zink, D., H. Bornfleth, et al. (1999). "Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories." Exp. Cell Res. **247**(1): 176-188.
- 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.
- Zorn, C., C. Cremer, et al. (1979). "Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus." Exp. Cell Res. **124**: 111-119.

8. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Robert Mayer
Geburtsdatum, -ort: 10. Juli 1974, in Ingolstadt

Schulbildung

1985-1994 Abitur am Apian-Gymnasium in Ingolstadt

Wehrdienst

1994-1995 Drohnenbatterie 200 in München

Hochschulstudium

1995 Beginn des Lehramtsstudiums Biologie und Chemie (vertieft) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001 Diplomprüfung Biologie; Diplomarbeit am Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik der LMU München
2002-2006 Promotion am Department Biologie II, Lehrstuhl für Anthropologie und Humangenetik der LMU München

Publikationen

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Mayer, R., A. Brero, J. von Hase, T. Schroeder, T. Cremer, S. Dietzel (2005): Common Themes and Cell Type Specific Variations of Higher Order Chromatin Arrangements. BMC Cell Biology 2005, 6

Andere Publikationen:

Stadler, S., V. Schnapp, **R. Mayer**, S. Stein, C. Cremer, C. Bonifer, T. Cremer, S. Dietzel (2004): The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. BMC Cell Biology 2005, 5(1)

Mayer, R., A. Brero, T. Cremer, S. Dietzel (2003): Arrangements of small and large chromosome territories in different mouse cell types; (Poster) 5. DGZ-Nachwuchswissenschaftler-Tagung "Zellkernarchitektur" in Jena; 25. – 27. 09. 2003

Mayer, R., A. Brero, T. Cremer, S. Dietzel (2004): Arrangement of gene rich, gene poor, large and small chromosome territories in different mouse cell types; (Poster) Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Berlin, 24. – 27. 03. 2004

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

Robert Mayer

München, den 22.2. 2006