

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

Die Architektur des X-Chromosoms

- eine „Top down“-Analyse in humanen Fibroblasten

Kathrin Teller

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Eingereicht am 28. Februar 2008

Die Architektur des X-Chromosoms

- eine „top down“-Analyse in humanen Fibroblasten

Dissertation der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

vorgelegt von

Dipl. Biol. Kathrin Teller

aus Fürth

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Cremer

2. PD. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 12. September 2008

„Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im Allgemeinen ist es nicht der Fall.“

Bertrand Russel (1872-1970), britischer Philosoph und Mathematiker

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Zellkernarchitektur	9
1.1.1	Die Entdeckung der Zelle und des Zellkerns.....	9
1.1.2	Der Zellkern	10
1.1.2.1	Definition von Chromatin	10
1.1.2.2	Heterochromatin und Euchromatin.....	11
1.1.2.3	Definition von Chromosomen	11
1.1.2.3.1	Chromosomen in der Metaphase	11
1.1.2.3.2	Aufbau eines Metaphase-Chromosoms	12
1.1.2.4	Chromosomen in der Interphase.....	14
1.1.2.4.1	Räumliche Anordnung der CTs im Interphasekern	14
1.1.2.4.2	Räumliche Anordnung subchromosomaler Bereiche von CTs	16
1.1.2.5	Interchromatin-Modelle.....	20
1.1.2.5.1	Das „Interchromosome domain“-Modell (ICD-Modell)	20
1.1.2.5.2	Das „chromosome territory-interchromatin compartment“-Modell (CT-IC-Modell)	20
1.2	Epigenetik	22
1.2.1	DNA-Methylierung	23
1.2.2	Histon-Modifikationen	24
1.2.2.1	Acetylierung.....	24
1.2.2.2	Methylierung	24
1.2.2.3	Phosphorylierung.....	25
1.3	Das X-Chromosom	25
1.3.1	Eigenschaften des menschlichen X-Chromosoms.....	25
1.3.1.1	Allgemeines	25
1.3.1.2	Eigenschaften der humanen X-Chromosom-Sequenz.....	26
1.3.2	X-Inaktivierung.....	27
1.3.2.1	Einführung	27
1.3.2.2	counting und choice.....	28
1.3.2.3	Inaktivierung durch <i>Xist</i> -RNA	29
1.3.3	Organisation des inaktiven X-Chromosoms	31
1.3.4	Aufrechterhaltung des inaktiven Status des X-Chromosoms	32
1.3.5	Gene, die der X-Inaktivierung entkommen.....	33
1.3.6	Das X-Chromosom im Interphasezellkern.....	33
1.4	Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)	34
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	36
2	MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1	Chemikalien, Enzyme und Reagenzien	37
2.2	Medien, Puffer und Lösungen.....	40
2.3	Geräte, optische Ausrüstung und sonstige Hilfsmittel	42
2.4	Zellen	45
2.4.1	Zelltypen	45
2.4.1.1	Humane Lymphozyten (HLy).....	45
2.4.1.2	Humane Fibroblasten (HFb).....	46
2.4.2	Zellkultur	46
2.4.2.1	Ansetzen einer Zellkultur	46

2.4.2.2	Splitten einer Zellkultur.....	47
2.4.2.2.1	In Lösung wachsende Zellen.....	47
2.4.2.2.2	Adhärenent wachsende Zellen.....	48
2.5	Herstellung von Metaphasepräparaten.....	49
2.5.1	Fixierung der Zellen.....	49
2.5.2	Auftropfen der Zellen (Deng-Methode).....	50
2.5.3	Pepsinieren und Alterung von Metaphase-Präparaten.....	51
2.6	Fixierung der Zellen für die 3D-Fluoreszenz in Situ Hybridisierung.....	51
2.6.1	Ki67-Detektion.....	52
2.6.2	In Lösung wachsende Zellen.....	52
2.6.3	Adhärenent wachsende Zellen.....	54
2.7	Sonden.....	55
2.7.1	Bestimmung der Eigenschaften der BAC-Klone.....	55
2.7.1.1	Bestimmung der Lokalisation der BACs anhand UCSC.....	55
2.7.1.2	Bestimmung der Eigenschaften der BAC-Klone.....	56
2.7.1.2.1	Enthaltene Gene und deren Expressionsprofil.....	56
2.7.1.2.2	Gendichteumgebung der BAC-Klone.....	57
2.7.2	Amplifikation der Sonden-DNA.....	58
2.7.2.1	Amplifikation über DOP-PCR.....	58
2.7.2.2	Amplifikation über GenomiPhi (<i>Whole Genome Amplification</i>).....	60
2.7.3	Markierung der Sonden-DNA.....	61
2.7.3.1	Markierung durch DOP-PCR.....	61
2.7.3.2	Markierung durch Nicktranslation.....	62
2.7.3.3	Ethanol-fällung für FISH.....	64
2.8	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	65
2.8.1	Prinzip.....	65
2.8.2	Chromosomen in situ Suppression (CISS).....	65
2.8.3	2D-FISH.....	65
2.8.4	3D-FISH.....	67
2.9	Mikroskopie.....	70
2.9.1	Phasenkontrastmikroskopie.....	70
2.9.2	Epifluoreszenzmikroskopie.....	70
2.9.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	71
2.10	Bildverarbeitende Software.....	73
2.10.1	Image J.....	73
2.10.2	Erstellen von Stacks mit StackGroom.....	73
2.10.3	Weiterbearbeitung der 3D Stacks.....	73
2.10.3.1	Gaussian Blur.....	73
2.10.3.2	Erstellen von RGB – Projektionen.....	73
2.10.3.3	Trennen der beiden Signale innerhalb eines Farbkanals.....	73
2.10.3.4	Hintergrundreduzierung durch Definition eines Schwellwertes.....	74
2.10.4	Adobe Photoshop.....	74
2.10.5	Amira.....	74
2.11	Quantitative Auswertungsmethoden.....	74
2.11.1	Auswertungen mit eADS.....	74
2.11.2	Distangles.....	76
2.11.3	Manders-Kolokalisation.....	77
2.12	Statistik.....	77
2.12.1	Mann Whitney Rank Sum Test.....	77

3	ERGEBNISSE	78
3.1	Zusammenstellung der BAC-Pools	78
3.1.1	Auswahl der BACs	78
3.1.2	BAC-Pools	78
3.1.2.1	Radiale Verteilung der p- und q-Arme des X-Chromosoms	78
3.1.2.2	Unterteilung von Xp und Xq in je zwei gleich große Teile	78
3.1.2.3	Darstellung des gesamten X-Chromosoms anhand von 10Mb-Pools	79
3.1.2.4	Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms ermittelt anhand eines 2Mb-Gendichte-Fensters	79
3.1.2.5	Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms ermittelt anhand eines 10Mb-Gendichte-Fensters	80
3.1.2.6	Radiale Verteilung der RIDGEs und genarmen Bereiche des X-Chromosoms	80
3.1.2.6.1	RIDGEs:	80
3.1.2.6.2	genarme Bereiche „tail“ und „Mitte“	81
3.1.2.6.3	Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb des RIDGE auf Xp11	81
3.1.2.6.4	Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb der genarmen Region in Xq25	82
3.1.2.6.5	Radiale Verteilung des RIDGE (Xp11) vs. Genarme Region (Xq25)	82
3.1.2.6.6	Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter BACs des gesamten X-Chromosoms ...	83
3.1.2.6.7	Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter BACs auf Xp	83
3.2	Unterscheidung von aktivem und inaktivem X	85
3.3	Ki67-Markierung der Zellen	85
3.4	Durchführen der FISH-Experimente	86
3.4.1	Amplifizieren, Labeln und Testen der BAC-Pools in einer 2D-FISH	86
3.4.2	3D-FISH-Experimente	89
3.5	Radiale Verteilung des X-Chromosoms im Zellkern humaner diploider Fibroblasten	90
3.6	Radiale Verteilung und Strukturanalysen der Chromosomenarme des X-Chromosoms ...	92
3.6.1	Radiale Verteilung des p- und des q-Arms im Zellkern humaner diploider Fibroblasten	92
3.6.2	Ko-Lokalisation von Xp und Xq im inaktiven X-Chromosom	94
3.7	Radiale Verteilung und Strukturanalysen der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms	96
3.7.1	Radiale Verteilung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms	96
3.7.2	Strukturanalyse der unterteilten Arme des X-Chromosoms	99
3.7.2.1	Kompaktierung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms	99
3.7.2.2	Faltung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms	101
3.7.2.3	Zusammenfassende Darstellung der Distanzen und Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der halben Arme	102
3.8	Das X-Chromosom in 10Mb-Stücken	103
3.8.1	Radiale Verteilung der 10Mb-Stücke des gesamten X-Chromosoms	103
3.8.1.1	Radiale Verteilung von Mb 1 – Mb 40 des X-Chromosoms (Versuch 1)	105
3.8.1.2	Radiale Verteilung von Mb 31 – Mb 70 des X-Chromosoms (Versuch 2)	107
3.8.1.3	Radiale Verteilung von Mb 61 – Mb 100 des X-Chromosoms (Versuch 3)	109
3.8.1.4	Radiale Verteilung von Mb 91 – Mb 130 des X-Chromosoms (Versuch 4)	110
3.8.1.5	Radiale Verteilung von Mb 121– Mb 155 des X-Chromosoms (Versuch 5)	112
3.8.1.6	Schematische Zusammenfassung der radialen Verteilung der 10Mb-Pools des gesamten X-Chromosoms	114
3.8.2	Strukturanalysen der 10 Mb-Pools des gesamten X-Chromosoms	115
3.8.2.1	Kompaktierung des X-Chromosoms	115
3.8.2.2	Faltung des gesamten X-Chromosoms	117
3.8.2.3	Verschiedene Strukturen der 10Mb-Stücke	118

3.9 Radiale Verteilung von Bereichen mit unterschiedlicher Gendichte	119
3.9.1 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms innerhalb eines 2Mb-Fensters	119
3.9.1.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium	120
3.9.1.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern	122
3.9.1.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung genreicher und genarmer Bereiche innerhalb eines 2Mb-Fensters in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern	123
3.9.2 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms innerhalb eines 10Mb-Fensters	124
3.9.3 Radiale Verteilung der RIDGES und genarmen Regionen des X-Chromosoms	127
3.9.3.1 Radiale Verteilung von RIDGE Xp und RIDGE Xq	127
3.9.3.2 Radiale Verteilung der genarmen Bereiche in Xp22 und der genarmen Mitte im Vergleich zu beiden RIDGES.....	130
3.9.3.3 Schematische Zusammenfassung der radialen Verteilung von RIDGES und genarmen Bereichen des X-Chromosoms.....	133
3.9.4 Radiale Verteilung einer extrem genreichen Region vs. einer extrem genarmen Region	134
3.9.4.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium	134
3.9.4.2 In Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten	137
3.9.4.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse der radialen Verteilung der genreichen Region Xp11 und der genarmen Region Xq25	138
3.10 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des X-Chromosoms	139
3.10.1 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des gesamten X-Chromosoms	139
3.10.1.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium	139
3.10.1.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern	141
3.10.1.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des gesamten X-Chromosoms.....	143
3.10.2 Radiale Position hoch und niedrig exprimierter Bereiche auf Xp	143
3.10.2.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium	143
3.10.2.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern	146
3.10.2.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche auf Xp	147
3.11 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb des RIDGES auf Xp11	148
3.11.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium	149
3.11.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern	151
3.11.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb eines RIDGES.....	153
3.12 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq25	154
3.12.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium.....	154
3.12.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern	157
3.12.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq25.....	159
3.13 Zusammenfassende Tabelle der Ergebnisse	160
3.13.1 Radiale Verteilung in Bezug auf das Chromosomenterritorium	160
3.13.2 Radiale Verteilung in Bezug auf den Fibroblastenzellkern.....	160
3.13.3 Strukturanalysen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms	161
4 DISKUSSION	162
4.1 Anordnung von Chromosomenterritorien im Zellkern	162
4.2 Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern	163
4.2.1 Einfluß der Gendichte auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern.....	163
4.2.2 Einfluß der Genexpression auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern.....	167

4.3	Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium	169
4.3.1	Einfluß der Gendichte auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium	169
4.3.2	Einfluß der Genexpression auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium	170
4.4	Funktionelle Bedeutung einer höheren Ordnung im Zellkern	172
4.5	Strukturanalysen	174
4.6	Ausblick.....	177
5	ZUSAMMENFASSUNG	179
5.1	Radiale Anordnung des Chromatins des X-Chromosoms in Zellkernen humaner Fibroblasten	179
5.2	Strukturanalysen des humanen X-Chromosoms.....	180
6	LITERATURVERZEICHNIS	181
7	DANKSAGUNG	195
8	CURRICULUM VITAE.....	196
9	PUBLIKATIONEN	198
10	EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG	199
11	ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE.....	199
12	ANHANG	200
12.1	BAC-Liste	201
12.2	Liste der verwendeten BACs.....	221
12.3	Beispiel für eine eADS-Parameterdatei.....	228
12.4	Beispiel für eine Distangles-Parameterdatei	229

1 Einleitung

1.1 Zellkernarchitektur

1.1.1 Die Entdeckung der Zelle und des Zellkerns



Abbildung 1: Mikroskop von Robert Hooke (aus Cremer 1985)

1667 veröffentlichte Robert Hooke (1635-1703) das bis dahin erste Werk über Mikroskopie (erstes Mikroskop Abb. 1), welches den Grundstein für alle mikroskopischen Untersuchungen legte. Unter anderem beschrieb er Untersuchungen über Zellengewebe von Pflanzen und prägte dabei den Begriff der Zelle, *Cellula*, was soviel wie Kämmerchen bedeutet. Erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts, vorangebracht durch Fortschritte in der Mikroskopentwicklung, konnte Franz Julius Ferdinand Meyen (1804-1840) die Zelle in ihren verschiedenen Formen und Größen als eine elementare Einheit der Pflanzen, die durch Zellteilung entsteht in seinem

1830 erschienenem Lehrbuch über Phytotomie beschreiben und legte damit den Grundstein der heutigen gültigen Zelltheorie. 1831 kam der britische Botaniker Robert Brown (1773-1858) ins Spiel, der bei einem Vortrag eine „areola“ beschrieb, die in fast allen Zellen einmal, gelegentlich auch zweimal vorkommt und nannte diese „nucleus of the cell“. Somit wurde der Zellkern entdeckt. Diese Erkenntnis war die Grundlage für die Forschungen der deutschen Botaniker Matthias Jacob Schleiden (1804-1881) und Theodor Schwann (1810-1882), die als Begründer der Zelltheorie gelten. Sie stellten fest, dass Zellen die grundlegenden Einheiten von Pflanzen und Tieren sind, und dass es sowohl einzellige als auch mehrzellige Organismen gibt. Den Zellkern sahen sie als Cytoblast oder „Zellbildner“, da er ihrer Meinung nach entscheidend an der Bildung der Zelle selbst beteiligt sein musste. Die Zelle wurde also um den Cytoblasten herum gebildet. Schwann veröffentlichte diese Beobachtungen 1839 in seinem Werk *„Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen“*. Diese Meinung war sehr lange Zeit weitläufig verbreitet, was auch mit der Urzeugungstheorie der so genannten „generatio spontanea“ zusammenhing, die besagte, dass Lebewesen spontan und zu jeder Zeit aus unbelebter Masse entstehen konnten. Erst mit dem Mediziner Robert Remak (1815-1865) konnte diese Theorie der Zellbildung widerlegt werden. Remak postulierte 1851, dass jede Zelle aus der Teilung einer anderen Zelle hervorgeht. 1855 sprach Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902), ein deutscher Mediziner, den Satz „omnis cellula e cellula“ aus und bestätigte somit die Theorie Remaks und auch die ursprüngliche Theorie

Meyens, der somit der eigentliche Begründer der Zelltheorie ist (Die vorgenannten Zitate sind dem Buch „Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie“, T. Cremer, Springer Verlag 1985 entnommen (Cremer 1985)).

1.1.2 Der Zellkern

1.1.2.1 Definition von Chromatin

Der Begriff Chromatin kann von dem griechischen Wort „χρῶμα“ (Chroma = Farbe) abgeleitet werden und wurde 1882 von Walther Flemming (1843-1905) geprägt, nachdem dieser Chromatin mit Hilfe eines basischen Farbstoffes sichtbar machte (Flemming 1882). Chromatin bezeichnet einen Komplex aus DNA und Proteinen, also die Form, in der die DNA im Zellkern eukaryotischer Zellen vorliegt. Bei den Proteinen handelt es sich hier um Histone. Histone sind kleine, basische Proteine (102-135 Aminosäuren), mit deren Hilfe die DNA in Zellkernen von Eukaryoten verpackt werden kann. Durch viele meist positiv geladene Aminosäuren wird es den Histonen ermöglicht, mit der negativ geladenen DNA zu interagieren (Luger, Mader et al. 1997; Rhodes 1997; Alberts 2002). Diese Interaktion der Proteine mit der DNA führt zu dem sogenannten Nukleosom. Dabei werden 146 Basenpaare des DNA-Fadens in 1.67 Windungen um ein Oktamer, welches aus jeweils zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4 besteht, gewickelt (Luger, Mader et al. 1997; Kornberg and Lorch 1999). Dies bewirkt eine 5- bis 10-fache Kompaktierung des DNA-Strangs (Kornberg 1974). Die einzelnen Nukleosomen sind über „linker“-DNA, deren Länge von ein paar Nukleotiden bis hin zu 80 Basenpaaren variieren kann (Alberts 2002) miteinander verbunden. Die einzelnen Nukleosome sind somit aneinandergereiht und bilden die so genannte Perlschnur-Struktur („beads-on-a-string“), die erstmal in den 70er Jahren anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden konnte (Kornberg 1974; Olins and Olins 1974). An die „linker“-DNA bindet das Histon H1, meistens an ein Ende dieser DNA, welches häufig die Sequenz AGGA besitzt und stabilisiert dadurch das Nukleosom (Travers and Drew 1997). Die 30nm-Fiber, oder auch Solenoidstruktur genannt wird durch Schleifenbildung erreicht (Thomas 1999). Somit kommt es zu einer weiteren DNA-Kompaktierung um ungefähr das 50-fache. Eine weitere Kondensierung des Chromatins im Zellkern ist möglich, allerdings weiß man darüber noch wenig (Felsenfeld and Groudine 2003). Zwei verschiedene Modelle sind hier dennoch erwähnenswert: die Organisation der 30nm-Fiber in so genannten „Loops“, die radial entlang der Achse des Chromosoms angereiht sind (Paulson and Laemmli 1977; Gasser and Laemmli 1986), und die helikale Faltung der 30nm-Fiber (Sedat and Manuelidis 1978).

1.1.2.2 Heterochromatin und Euchromatin

Anhand des Kondensierungsgrades kann man zwei Arten von Chromatin unterscheiden: Heterochromatin, das stark kondensiert ist, und Euchromatin, das weniger stark kondensiert ist. Bereits im Jahre 1928 hat Emil Heitz diesen Unterschied festgestellt, indem er gefärbte DNA unter dem Lichtmikroskop betrachtete, und feststellte, dass es Bereiche im Chromatin gibt, die auch während des Zellzyklus sichtbar kondensiert bleiben, und die beiden Begriffe geprägt. Außerdem postulierte er, dass Heterochromatin aus Bereichen besteht, die wenige bis gar keine Gene enthalten, während Euchromatin im Gegensatz dazu Regionen mit vielen Genen umfasst (Heitz 1928). 1966 prägte Brown die Begriffe konstitutives Heterochromatin und fakultatives Heterochromatin (Brown 1966). Konstitutives Heterochromatin bleibt permanent kondensiert und wird aufgebaut, wenn Gene dauerhaft stillgelegt werden sollen (Craig 2005), beziehungsweise übt es einen repressiven Effekt auf transkriptionell aktive euchromatische Gene aus, die in der Nähe lokalisieren (Huisinga, Brower-Toland et al. 2006). Es besteht aus hoch repetitiven Sequenzen und ist in den großen Banden pericentrischer Satelliten in der Nähe von Centromeren menschlicher Chromosomen und den Chromosomen der Maus zu finden. Auch Telomere enthalten konstitutives Heterochromatin, allerdings in einer wesentlich geringeren Menge (Craig 2005). Fakultatives Heterochromatin hingegen ist nicht durch eine spezielle DNA-Sequenz charakterisiert sondern ist gewebespezifisch und entsteht wenn DNA-Sequenzen in einem bestimmten Gewebetyp stillgelegt werden. Es ist von der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus abhängig und kann auch in Euchromatin übergeführt werden (Craig 2005). Ein typisches Beispiel für fakultatives Heterochromatin ist das inaktive X-Chromosom in weiblichen Säugerzellen, in denen während einer frühen embryonalen Entwicklungsstufe ein X-Chromosom inaktiviert wird (siehe Abschnitt 1.4.2) (Boumil and Lee 2001).

Die ursprüngliche Einteilung in fakultatives und konstitutives Heterochromatin von 1966 (Brown 1966) hat bis heute Bestand, allerdings sind auf Grund neuer Erkenntnisse viele Aspekte hinzugekommen, die eine klare Unterscheidung zwischen diesen beiden Formen zunehmend schwieriger macht. Hierzu kommen vor allem Histonmodifikationen, die in Abschnitt 1.3.2 genauer beschrieben sind.

1.1.2.3 Definition von Chromosomen

1.1.2.3.1 Chromosomen in der Metaphase

Kommt eine Zelle in die Mitose, kompaktiert sich das Chromatin zu Chromosomen, die ohne spezielle Färbung im Lichtmikroskop beobachtet werden können und der Zellkern löst sich auf. Chromosomen stellen die Transportform des kondensierten Erbmaterials dar und weisen eine Länge von weniger als 1µm bis über 30µm auf (Storch and Welsch 1994). Der Begriff Chromosom leitet sich von den griechischen

Wörtern „χρώα“ (Chroma = Farbe) und „σώμα“ (Soma = Körper) ab und bedeutet demnach soviel wie „Farbkörper“.

Die Anzahl der Chromosomen, auf die das Erbgut in einem eukaryotischen Organismus verteilt ist, kann sich beträchtlich unterscheiden, wobei sie nichts über

den Entwicklungsgrad des Organismus und die

Genomgröße aussagt. So besitzt zum Beispiel das Neunauge

(*Petromyzontidae*) 174 Chromosomen,

der Pferdespulwurm (*Ascaris megaloccephala univalens*)

hingegen nur zwei (Flindt 1985). Auch zwischen eng verwandten

Spezies mit einer ähnlichen Genomgröße kann es zu großen

Unterschieden in der Anzahl und der Größe der Chromosomen

kommen, wie zum Beispiel zwischen dem indischen Muntjak

(*Muntiacus muntjak vaginalis*) und dem chinesischen Muntjak

(*Muntiacus reevesi*). Beide Muntjak-Arten besitzen ein ähnlich großes Genom, das aber auf eine sehr verschiedene Chromosomenanzahl verteilt

ist. Während der indische Muntjak mit $2n=6$ (♀) beziehungsweise $2n=7$ (♂) das bis dato kleinste Säugetiergenom besitzt (Abb.2B), ist das Genom des chinesischen

Muntjak auf $2n=46$ Chromosomen verteilt (Abb.2A) (Wurster and Benirschke 1967; Scheuermann, Murmann et al. 2005). Auch zwischen verschiedenen Pflanzenarten

einer Spezies kommen solche Unterschiede vor. Die Unterarten der Süßkirsche (*Prunus*) variieren erheblich in ihrer Chromosomenzahl zwischen 16 und 144 Chromosomen. Der menschliche Organismus besitzt 46 Chromosomen (22 Autosomenpaare + XX oder XY).

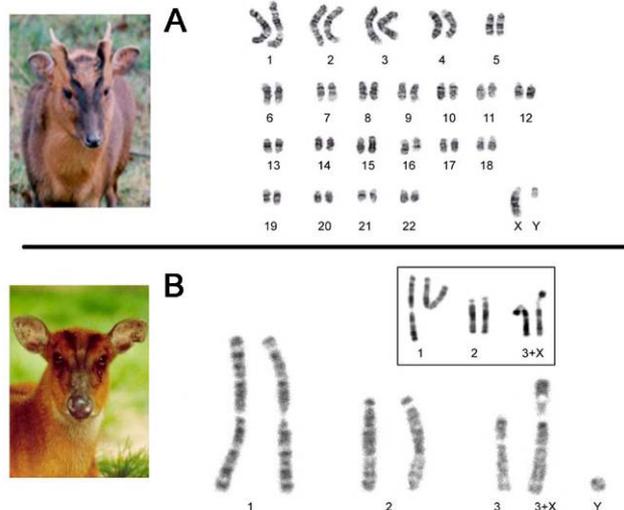


Abbildung 2: Muntjak-Karyogramme

A Karyogramm des chinesischen Muntjak

B Karyogramm des indischen Muntjak (aus Scheuermann et al 2005)

1.1.2.3.2 Aufbau eines Metaphase-Chromosoms

Im diploiden menschlichen Genom sind etwa 6.4 Milliarden Basenpaare vorhanden, die auf 23 homologe Chromosomenpaare aufgeteilt sind. Geht man nun davon aus, dass ein Basenpaar die Länge von 0.34nm einnimmt (Wakelin, McFadyen et al. 1984), würde sich eine Gesamt-DNA-Länge von 2m ergeben, die in jedem diploiden Zellkern einer menschlichen Körperzelle verpackt sein müsste. Für ein einzelnes Chromosom würde dies eine durchschnittliche Länge von 4.7cm ergeben. Wie in Abschnitt 1.2.3.1 schon beschrieben, sind Chromosomen in der Metaphase nur wenige μm lang. Die DNA in einem Chromosom muss also sehr stark kondensiert

vorliegen, um die Verkürzung etwa um den Faktor 10.000 zu erreichen.

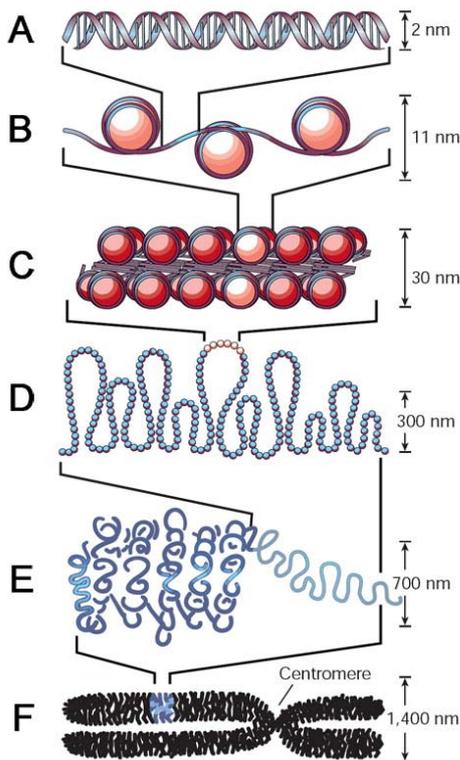


Abbildung 3: Kondensierungsschritte von Chromosomen
A DNA-Doppelhelix, **B** Nucleosomen, **C** 30nm-Fiber, **D** 30nm-Fiber in „loops“, **E-F** weitere Verpackungsschritte hin zum Chromatid (aus Felsenfeld&Groudine 2003)

Wie genau diese Kondensierung entsteht ist bisher noch weitgehend unklar, es werden jedoch verschiedene Modelle diskutiert. Hier soll ein kurzer Überblick über das am weitesten verbreitete Modell, das sogenannte „Loop-Modell“ (Abb. 3) gegeben werden (Adolphs, Cheng et al. 1977; Laemmli 1978; Gasser and Laemmli 1986). Die DNA-Doppelhelix (Abb.3A) ist in 1.6 Windungen um ein Oktamer aus Histonen, das sogenannte Nucleosom gewickelt (Abb.3B). Die einzelnen Nucleosomen sind durch „linker-DNA“ (siehe Abschnitt 1.2.1) miteinander verbunden und bilden die Perlschnurstruktur. Dieser DNA-Protein-Komplex hat einen Durchmesser von etwa 10nm, weswegen man hier von der 10nm-Fiber spricht, die eine Kompaktierung um den Faktor 10 erreicht. Diese 10nm-Fiber ist mit Hilfe des Histons H1 zu einer 30nm-Fiber gewunden (Abb.3C), deren genaue Struktur noch nicht eindeutig geklärt ist. Favorisiert werden hier das sogenannte „Solenoid-Modell“ (Finch, Lutter et al. 1977) und das „two start Helix-Modell“

(Williams, Athey et al. 1986). Das „Solenoid-Modell“ basiert auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Intermediate in der Umwandlung von

einem offenen Nucleosom zur 30nm-Fiber (Finch, Lutter et al. 1977; Thoma, Koller et al. 1979; McGhee, Nickol et al. 1983; Bartolome, Bermudez et al. 1994) und schlägt vor, dass sich sechs bis acht aufeinanderfolgende Nucleosomen parallel zur Achse der Fiber mit einem Abstand von 11nm in einer eingängigen Helix anordnen (Abb.4A). Das „two start Helix-Modell“ basiert auf der Beobachtung von ZigZag-Arrangements der Nucleosomen, die dann wiederum zu einer zweigängigen Helix aufgewickelt

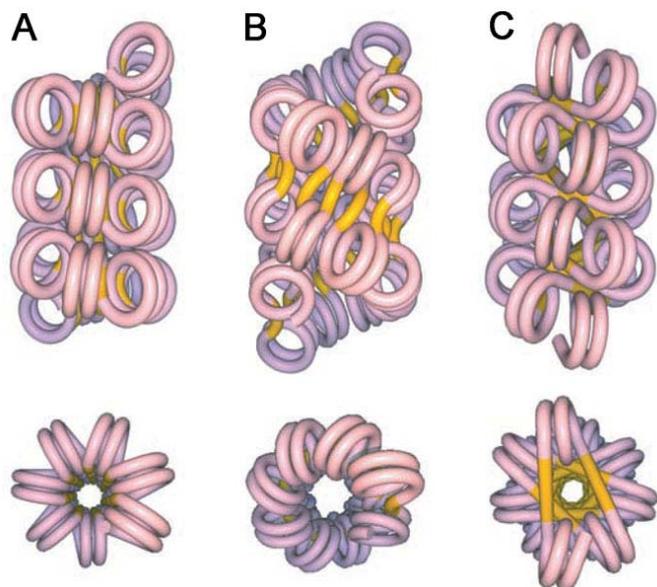


Abbildung 4: Higher order-Strukturmodelle der DNA
A one start-Solenoidmodell, **B** two start-Helixmodell, **C** crossed linker-Modell (aus Dorigo et al 2004)

werden. Hier unterscheidet man zwei verschiedene Modelle, das „helical ribbon-Modell“ (Abb.4B) und das „crossed linker-Modell“ (Abb.4C) (Dorigo, Schalch et al. 2004). Das „helical ribbon-Modell“ ist wie zwei übereinandergesetzte Wendeltreppen aufgebaut, indem zwei Nucleosomen aufeinandergestapelt entlang der Achse der 30nm-Fiber liegen (Worcel, Strogatz et al. 1981; Woodcock and Frank 1984). Bei dem von Williams et al vorgeschlagenem „crossed linker-Modell“ hingegen, sind die Nucleosomen über Kreuz entlang der Achse angeordnet (Williams, Athey et al. 1986). Dieses Modell stützt sich vor allem auf die Beobachtungen, dass der Durchmesser der 30nm-Fiber umso größer ist, je länger die „linker-DNA“ zwischen den einzelnen Nucleosomen ist (Athey, Smith et al. 1990; Williams and Langmore 1991). Die 30nm-Fiber komprimiert die DNA um das 30-40fache.

Die weitere Kompaktierung der DNA nach dem „Loop-Modell“ erfolgt über „scaffold attachment regions“ (SARs), ein Bindemotiv der DNA, mit deren Hilfe die 30nm-Fiber in „loops“ angeordnet ist (Abb.3D). Nachgewiesen wurden diese „loops“ erstmals 1977 von Paulson und Laemmli anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen, die Chromosomen zeigen, deren Histone vorher mit Heparin und Dextransulfat entfernt wurden (Paulson and Laemmli 1977). Die Zusammensetzung dieses Gerüsts ist allerdings noch nicht bekannt. Einzig zwei Bestandteile, die nachweislich an der Kompaktierung der DNA beteiligt sind (Adachi, Luke et al. 1991; Hirano, Kobayashi et al. 1997), konnten im Inneren von Metaphasechromosomen beobachtet werden, Topoisomerase II α und Condensin (Earnshaw and Heck 1985; Gasser and Laemmli 1986; Maeshima and Laemmli 2003; Maeshima, Eltsov et al. 2005). Diese scaffolds werden nun schlaufenförmig verpackt (Abb.3E), wodurch ein Chromatid eines Chromosoms entsteht (Abb.3F).

Die Komprimierungsschritte in Abb.3 D, E und F sind eher spekulativer Natur und konnten bisher nicht nachgewiesen werden, da geeignete Nachweisverfahren nicht zur Verfügung stehen.

1.1.2.4 Chromosomen in der Interphase

1.1.2.4.1 Räumliche Anordnung der CTs im Interphasekern

Chromosomen in der Metaphase sind, wie im Abschnitt 1.2.3.1 beschrieben, Strukturen, die deutlich voneinander abgrenzbar und somit gut zu unterscheiden sind. Wie sieht dies nun aber mit Chromosomen in der Interphase aus? Ende des 19. bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde von zwei Wissenschaftlern, Carl Rabl und Theodor Boveri, die These aufgestellt, dass Chromosomen auch während der Interphase als strukturelle Einheiten erhalten bleiben und distinkte Territorien einnehmen (Rabl 1885; Cremer and Cremer 2006 I). Dennoch wurde lange Zeit eine andere Vorstellung vertreten, nämlich dass Chromosomen sich zu Beginn der Interphase vollständig decondensieren (bis auf das konstitutive Heterochromatin) und sich anschließend vermischen (Comings 1968; Wischnitzer 1973). Diese

Annahme wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützt (DuPraw and Bahr 1969). Erst Anfang der 80er Jahre konnte indirekt die territoriale Struktur von Interphasechromosomen gezeigt werden: Gezielte UV-Bestrahlung kleiner Areale im Zellkern ließen sich in Metaphasechromosomen der darauffolgenden Mitose nur an einzelnen Chromosomen entdecken (Cremer, Cremer et al. 1982a; Cremer, Cremer et al. 1982b). Wären Chromosomen im Zellkern vollständig vermischt, würden sich die Strahlungsschäden über viele Chromosomen verteilen (Cremer and Cremer 2006 II).

Durch technischen Fortschritt Mitte der 80er Jahre wurde die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH, siehe Abschnitt 2.8) entwickelt, mit deren Hilfe nun Chromosomenterritorien angefärbt werden konnten und somit eindeutig gezeigt werden konnte, dass Chromosomen distinkte Bereiche im Interphasezellkern einnehmen (Manuelidis 1985; Schardin, Cremer et al. 1985; Lichter, Cremer et al. 1988; Dietzel, Schiebel et al. 1999; Cheung, Allis et al. 2000).

Im Widerspruch dazu steht eine aktuelle Studie in der Branco und Pombo anhand von FISH-Experimenten auf ultradünnen Gefrierschnitten zeigen, dass bis zu 30% des Volumens eines Chromosomenterritoriums mit dem Nachbarterritorium geteilt werden kann. Ihre Ergebnisse fassen sie in einem neuen Modell zusammen, dem Interchromosomal Network-Modell (ICN-Modell), das unter anderem auch die Existenz eines Interchromatin-Kompartments (siehe Abschnitt 1.2.5) ausschließt (Branco and Pombo 2006).

Angeordnet sind die CTs im Zellkern abhängig von ihrer Gendichte. Chromosomen mit einer hohen Gendichte liegen tendenziell weiter in der Mitte des Zellkerns als Chromosomen mit einer geringen Gendichte. Zuerst konnte dies anhand der Chromosomen 18 und 19, die sich in ihrer Größe nur geringfügig unterscheiden (CT #18: 76Mb, CT #19: 64Mb), jedoch eine sehr unterschiedliche Anzahl von Genen aufweisen gezeigt werden. Chromosom 18 ist das genärmste Chromosom im menschlichen Genom und besitzt lediglich 5.6 Gene pro Megabase (Mb), während Chromosom 19 mit 26.5 Genen pro Mb das genreichste menschliche Chromosom ist (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). In humanen Lymphozyten hat man festgestellt, dass Chromosom 18 an der Peripherie des Zellkernes lokalisiert, während das genreiche Chromosom 19 meist im Inneren zu finden ist (Croft, Bridger et al. 1999; Cremer, von Hase et al. 2001b). Cremer et al konnten diese radiale Verteilung der Chromosomen 18 und 19 in weiteren humanen Zelltypen, sowie in verschiedenen Krebszelllinien bestätigen (Cremer, Küpper et al. 2003). Auch für alle weiteren humanen Chromosomen gilt diese Regel (Boyle, Gilchrist et al. 2001; Cremer, von Hase et al. 2001b).

In humanen Fibroblasten ist der Zellkern, im Gegensatz zu Lymphozytenzellkernen, sehr flach und ellipsoid geformt. Hier konnte eine Verteilung der Chromosomen, die strikt von der Gendichte abhängig ist bisher nicht nachgewiesen werden. Vielmehr spielt hier die Größe der Chromosomen eine Rolle bei der Anordnung dieser im Zellkern (Croft, Bridger et al. 1999; Cremer, von Hase et al. 2001b; Bolzer, Kreth et

al. 2005). Während sich größere Chromosomen mehr an der Peripherie des Zellkernrandes anlagern, sind kleinere Chromosomen weiter im Inneren lokalisiert (Bolzer, Kreth et al. 2005). Aber auch eine Abhängigkeit der radialen Anordnung von der Gendichte konnte gezeigt werden. Durch den Nachweis von Alu-Sequenzen, die mit einem hohen GC-Gehalt und einer hohen Dichte von Housekeeping-Genen korrelieren und somit hauptsächlich in genreichen Bereichen zu finden sind, konnte beobachtet werden, dass sich diese mehr im Inneren des Fibroblastenzellkerns befinden (Bolzer, Kreth et al. 2005). Chromosom 18 und Chromosom 19 liegen in zyklierenden Zellen, aber nicht in ruhenden G₀-Phase-Kernen Gendichte-abhängig verteilt (Bridger, Boyle et al. 2000).

Diese Gendichte-abhängige Verteilung von CTs ist über eine Zeitspanne von über 30 Millionen Jahren konserviert, da es in Zellkernen von Säugetieren (Tanabe, Habermann et al. 2002a; Mayer, Brero et al. 2005; Tanabe, Küpper et al. 2005; Neusser, Schubel et al. 2007) und Hühnern (Habermann, Cremer et al. 2001) gefunden wurde und spricht daher für einen signifikanten Vorteil dieser probabilistischen Gendichte-abhängigen Anordnung (Parada, McQueen et al. 2002). Da also eine nicht-zufällige Anordnung von CTs im Zellkern existiert, kommt die Frage auf, ob es Chromosomenpaare gibt, die häufiger nebeneinander liegen als andere. Alleine schon die Gendichte-abhängige Verteilung lässt erwarten, dass ein genreiches Chromosom öfter neben einem genreichen Chromosom liegt, als ein genreiches Chromosom neben einem genarmen Chromosom. In verschiedenen Maus-Geweben konnte bereits bestätigt werden, dass bestimmte heterologe Chromosomenpaare häufiger eine Nachbarschaft eingehen als andere (Parada, McQueen et al. 2002; Parada, McQueen et al. 2004). Eine deterministische Sicht auf Nachbarschaften zwischen Chromosomenterritorien, wie sie früher behauptet wurde (Nagele, Freeman et al. 1995; Nagele, Freeman et al. 1998) kann anhand dieser Daten allerdings nicht unterstützt werden, denn dies würde eine ähnliche höhere Ordnung der Chromosomenterritorien in verschiedenen Zelltypen voraussetzen. Dies wurde nicht bestätigt (Gerlich, Beaudouin et al. 2003; Walter, Schermelleh et al. 2003; Williams and Fisher 2003). Bolzer et al. untersuchten Nachbarschaften zwischen homologen und heterologen Chromosomenpaaren in humanen Fibroblasten, indem sie Winkel und Distanzen zwischen ihnen maßen und diese mit einer zufälligen Verteilung verglichen. Allerdings konnte kein signifikanter Beweis für eine deterministische Nachbarschaft gefunden werden (Bolzer, Kreth et al. 2005).

1.1.2.4.2 Räumliche Anordnung subchromosomaler Bereiche von CTs

Chromosomenarme, Centromere und Telomere

Es konnte ebenso für subchromosomale Bereiche wie Chromosomenarme (Dietzel, Jauch et al. 1998), Centromere oder Telomere (Molenaar, Wiesmeijer et al. 2003; Weierich, Brero et al. 2003; Solovei, Grandi et al. 2004a) nachgewiesen werden,

dass sie distinkte Bereiche im Zellkern einnehmen. Centromere, mit Ausnahme des Centromeres des inaktiven X-Chromosoms, das im Inneren des Territoriums lokalisiert, wurden in menschlichen ruhenden Lymphozyten preferentiell an der Oberfläche ihrer korrespondierenden CTs beobachtet (Weierich, Brero et al. 2003; Clemson, Hall et al. 2006). In Bezug zum Zellkern liegen Centromere meist an der Peripherie, wo sie bevorzugt in Clustern zu finden sind. In cyclierenden Zellen können Centromere auch eine internere Position im Zellkern einnehmen (Solovei, Schermelleh et al. 2004b). Telomere, die auch die Tendenz haben, sich zu Clustern zusammenzulagern lokalisieren weiter im Inneren des Zellkerns als Centromere (Weierich, Brero et al. 2003).

Früh-, Mittel- und Spät replizierendes Chromatin

Früh-, Mittel- und spät replizierendes Chromatin ist nicht gleichmäßig im Zellkern verteilt, sondern nimmt, je nach Replikationszeitpunkt, distinkte Bereiche ein (O'Keefe, Henderson et al. 1992; Ferreira, Paoella et al. 1997; Sadoni, Langer et al. 1999; Sadoni, Cardoso et al. 2004). Replizierendes Chromatin kann durch Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU), welches anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, sichtbar gemacht werden. Im Laufe der S-Phase können so verschiedene BrdU-Muster und somit die jeweiligen Bereiche des früh- mittel- und spät replizierenden Chromatins, sichtbar gemacht werden (O'Keefe, Henderson et al. 1992). Früh replizierendes Chromatin zu Beginn der S-Phase kann im ganzen Zellkern in Form von mehreren Hundert kleinen Replication Foci beobachtet werden, wobei Nukleoli und DNA am Zellkernrand nicht angefärbt sind. Im Laufe der S-Phase wird die Anzahl dieser Replication Foci geringer und verdichten sich am Zellkernrand und um die Nukleoli herum (mittel replizierendes Chromatin). Spät replizierendes Chromatin wird wieder im gesamten Nukleus gefunden, allerdings verdichten sich die kleinen Replication Foci zu wenigen großen Chromatinblöcken (Ferreira, Paoella et al. 1997; Sadoni, Langer et al. 1999). Diese Replikationsmuster sind seit Millionen von Jahren hochkonserviert. Man findet sie nicht nur bei Säugern (Mayer 2005, Tanabe 2002b), sondern auch bei Vögeln (Habermann, Cremer et al. 2001), Nesseltieren (Cnidaria) (Alexandrova, Solovei et al. 2003) und Wimperntierchen (Ciliaten) (Postberg, Alexandrova et al. 2005).

Region of increased gene expression (RIDGE)

Eine "region of increased gene expression" (RIDGE) ist eine Region im Genom, in der überdurchschnittlich viele hochexprimierte Gene clustern. Definiert ist ein RIDGE durch zehn aufeinanderfolgende Fenster von 39 Genen, deren Expression mindestens 4mal höher ist als der Median der Expression des gesamten Genoms (Caron, Schaik et al. 2001). Im humanen Genom wurden bisher 30 RIDGEs charakterisiert (Versteeg, van Schaik et al. 2003). Meistens kann man beobachten, dass Gene innerhalb eines RIDGE eine bis zu 7fach höhere Expression aufweisen als der genomische Durchschnitt. Außerdem wird in RIDGEs meist eine überdurchschnittlich

hohe Gendichte beobachtet. In typischen RIDGES findet man zwischen 6 und 30 Gene pro CentiRay (CentiRay ist das Maß der Häufigkeit von Chromosomenbrüchen zwischen DNA-Markern in bestrahlten somatischen Zellhybriden. 1 CentiRay ist äquivalent zu einer 1%igen Wahrscheinlichkeit, dass ein Chromosomenbruch zwischen zwei Markern stattgefunden hat. CentiRay-Distanzen sind normalerweise proportional zu physikalischen Distanzen), während man in gering exprimierten Bereichen nur 1-2 Gene pro CentiRay findet (Caron, Schaik et al. 2001). RIDGES in denen die Gendichte nicht über dem Durchschnitt liegt findet man meist in Bereichen der Telomere (Caron, Schaik et al. 2001). Weitere Merkmale von RIDGES sind ein hoher GC-Gehalt, kurze Introns und viele SINE repeats (Versteeg, van Schaik et al. 2003). Im Gegensatz zu RIDGES gibt es auch sogenannte Anti-RIDGES im menschlichen Genom. Anti-RIDGES zeichnen sich durch eine Ansammlung niedrig exprimierter Gene aus, deren Expression 16fach niedriger ist als die der Gene innerhalb eines RIDGE. Außerdem beobachtet man lange Introns, einen niedrigen

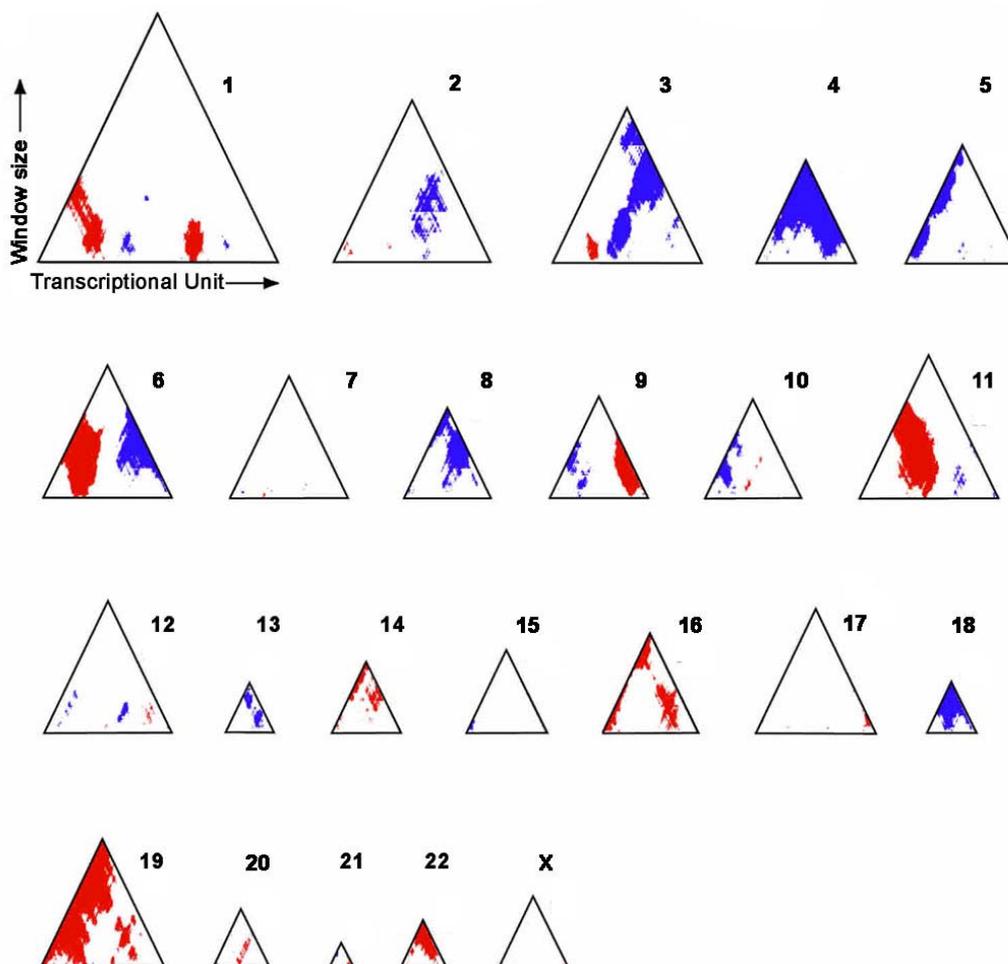


Abbildung 5: RIDGES und Anti-RIDGES

Ridgeogramme der Genexpression aller humanen Chromosomen zeigen RIDGES (rot) und Anti-RIDGES (blau) als eine Funktion der Fenstergröße. Die horizontale Achse jedes Dreiecks zeigt die Position jeder Transkriptionseinheit entlang des Chromosoms, die vertikale Achse spiegelt die Fenstergröße wieder (von 19 bis zum Chromosomenmaximum) (aus Versteeg et al 2003)

GC-Gehalt, viele LINE repeats und eine geringe Gendichte. In der Abbildung 5 (entnommen aus (Versteeg, van Schaik et al. 2003)) sind die RIDGEs (rot) und Anti-RIDGEs (blau) der einzelnen Chromosomen dargestellt. RIDGEs liegen im Zellkern meist weiter nach Innen hin orientiert als Anti-RIDGEs (Lukášová, Kozubek et al. 2002; Goetze, Mateos-Langerak et al. 2007) und zeigen eine offenere Chromatinstruktur sowie eine unregelmäßigere Form (Goetze, Mateos-Langerak et al. 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass RIDGEs sogenannte Chromatinloops bilden, und somit mehr als einen 1µm aus dem CT herausragen können (Mahy, Perry et al. 2002a; Albiez, Cremer et al. 2006; Küpper, Kölbl et al. 2007). Der MHC-Locus, der mit 224 identifizierten Genen (128 Gene sind davon exprimiert) als einer der genreichsten Bereiche im humanen Genom zählt (Volpi, Chevret et al. 2000) und als RIDGE definiert ist (Caron, Schaik et al. 2001) lokalisiert in Zellen, in denen diese Region exprimiert wird, meist außerhalb des CT #6 (Volpi, Chevret et al. 2000). Auch die sehr genreiche Region 11p15.5, die ebenfalls als RIDGE definiert ist (Caron, Schaik et al. 2001) findet man preferentiell außerhalb des korrespondierenden CT #11 (Mahy, Perry et al. 2002a; Küpper, Kölbl et al. 2007).

Räumliche Anordnung aktiver Gene im Chromosomenterritorium

Während für RIDGEs meist eine Anordnung außerhalb des Chromosomenterritoriums gefunden wird (siehe Abschnitt 1.2.4.2) ist die Positionierung einzelner Gene oder Gengruppen, die nicht innerhalb eines RIDGEs liegen kontrovers diskutiert. Kurz et al untersuchten 1996 codierende und nicht-codierende Gene und fanden heraus, dass codierende Gene, unabhängig davon ob sie aktiv oder inaktiv sind, meist an der Oberfläche des CTs liegen, während Gene, die nicht-codierend sind zufällig verteilt und meist im Inneren des CTs zu finden sind (Kurz 1996). Dies konnte auch für das *SNRPN*-Gen, welches in der geprägten Prader-Willi-/Angelmansyndrom-Region auf Chromosom 15q11-13 liegt und ein aktives (paternal) und ein inaktives (maternal) Allel besitzt bestätigt werden. Beide *SNRPN*-Allele sind bevorzugt an der Peripherie des CT #15 lokalisiert (Nogami, Kohda et al. 2000). Aktive Gene auf dem humanen X-Chromosom zeigen eine ähnliche Verteilung, während inaktive Gene dort eher im Inneren des Territoriums gefunden werden (siehe Abschnitt 1.4.6, (Dietzel, Schiebel et al. 1999)). Dies konnte auch für den „epidermal differentiation complex“ (EDC) auf Chromosom 1q21 gezeigt werden. Während dieser in Keratinocyten, in denen er exprimiert wird, außerhalb des CTs #1 gefunden wird, liegt er in humanen Lymphoblasten, in denen er inaktiv ist, eher innerhalb des CTs #1 (Williams, Broad et al. 2002). Aktive und inaktive Gene innerhalb der Wilms-Tumor-Region auf Chromosom 11p13 wurden sowohl an der Peripherie, als auch im Inneren des CTs #11 gefunden (Mahy, Perry et al. 2002b).

1.1.2.5 Interchromatin-Modelle

1.1.2.5.1 Das „Interchromosome domain“-Modell (ICD-Modell)

1993 beobachteten Zirbel et al Transkripte und splicing snRNPs an der Peripherie, aber nicht im Inneren von Chromosomenterritorien und postulierten somit das „Interchromosome domain“-Modell (ICD-Modell) (Zirbel, Mathieu et al. 1993). In diesem Modell sind Chromosomenterritorien durch eine relativ glatte Oberfläche von dem sogenannten Interchromatinbereich abgegrenzt. Dieser besteht aus einem verzweigten Netzwerk von Kanälen, die sich, ausgehend von den Kernporen über den gesamten Zellkern erstrecken. In diesen Interchromatinkanälen befinden sich Faktoren für die Transkription, die DNA-Reparatur, das Splicing der RNA und für die Replikation (Cremer, Kurz et al. 1993; Zirbel, Mathieu et al. 1993). Aktive Gene wurden an der Oberfläche der Chromosomenterritorien gesehen (Kurz, Lampel et al. 1996; Dietzel, Schiebel et al. 1999) und haben somit einen direkten Zugang zu diesen Proteinen, wohingegen Gene im Inneren eines Chromosomenterritoriums keinen Zugang haben, da das Interchromatinkompartiment nicht in das Innere eines CTs vordringt (Cremer, Kurz et al. 1993; Zirbel, Mathieu et al. 1993).

Einen weiteren Hinweis auf die Existenz des ICD-Modells und das Vorhandensein eines Kanalsystems brachte das Einbringen von Vimentin in humane Zellkerne. Die Autoren beobachteten, dass sich die Vimentin-Fasern entlang der Zellkerne ausbreiteten, aber nie in ein Chromosomenterritorium eindringen (Bridger, Herrmann et al. 1998).

Beobachtungen, dass Transkription im gesamten Chromosomenterritorium und nicht nur an der Peripherie stattfindet (Verschure, van der Kraan et al. 1999; Mahy, Perry et al. 2002b) ließ die Frage aufkommen, ob das ICD-Modell vielleicht doch eine zu vereinfachte Darstellung bietet.

1.1.2.5.2 Das „chromosome territory-interchromatin compartment“-Modell (CT-IC-Modell)

Aufgrund verschiedener Beobachtungen, dass Transkription nicht auf die Peripherie eines Chromosomenterritoriums beschränkt ist (Verschure, van der Kraan et al. 1999; Mahy, Perry et al. 2002b), führten Thomas und Christoph Cremer das „chromosome territory – interchromatin compartment“-Modell (CT-IC-Modell) ein, welches eine Weiterentwicklung des ICD-Modells (siehe Abschnitt 1.2.5.1) ist (Cremer and Cremer 2001a; Cremer, Küpper et al. 2004). Neu in diesem Modell ist unter anderem, dass die Kanäle des Interchromatin-Kompartiments die Chromosomenterritorien durchziehen und somit eine Schwamm-ähnliche Struktur resultiert (Abb.6A). Die Chromosomenterritorien sind hier aus mehreren ~1Mb großen DNA-Domänen, die den Replikationsfoci entsprechen, aufgebaut, was es dem Interchromatin-Kompartiment erlaubt, das Territorium zu durchziehen und somit auch inneren Bereichen die Proteine des ICs zugänglich zu machen (Jackson and

Pombo 1998). Es wird davon ausgegangen, dass diese sogenannten 1Mb-Domänen wiederum aus vielen kleinen 30-200kb enthaltenden DNA-Loops bestehen (Münkel, Eils et al. 1999; Sadoni, Cardoso et al. 2004). Zwischen diesen 1Mb-Domänen und dem Interchromatin-Kompartiment befindet sich die Perichromatin-Region. Diese besteht aus dekondensierten Chromatin-Loops, die anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden konnten (Fakan 2004a; Fakan 2004b), an der Oberfläche der Chromosomenterritorien und wird als der Ort der Transkription, des Splicings, der DNA-Reparatur und allen weiteren wichtigen Vorgängen gesehen (Cremer, Küpper et al. 2004). Die Interchromatin-Kanäle können anhand von Hyperkondensierung des Chromatins mit hyperosmolarem Medium deutlich gezeigt werden. Durch die Behandlung mit diesem Medium zieht sich das Chromatin stark zusammen und die Interchromatinkanäle werden sogar im Lichtmikroskop sichtbar. Dieser Vorgang ist reversibel und lässt sich einige Male wiederholen, ohne dass sich das dabei entstehende Netzwerk verändert. Dies lässt auf eine hohe Ordnung des Interchromatin-Kompartiments schließen (Albiez, Cremer et al. 2006).

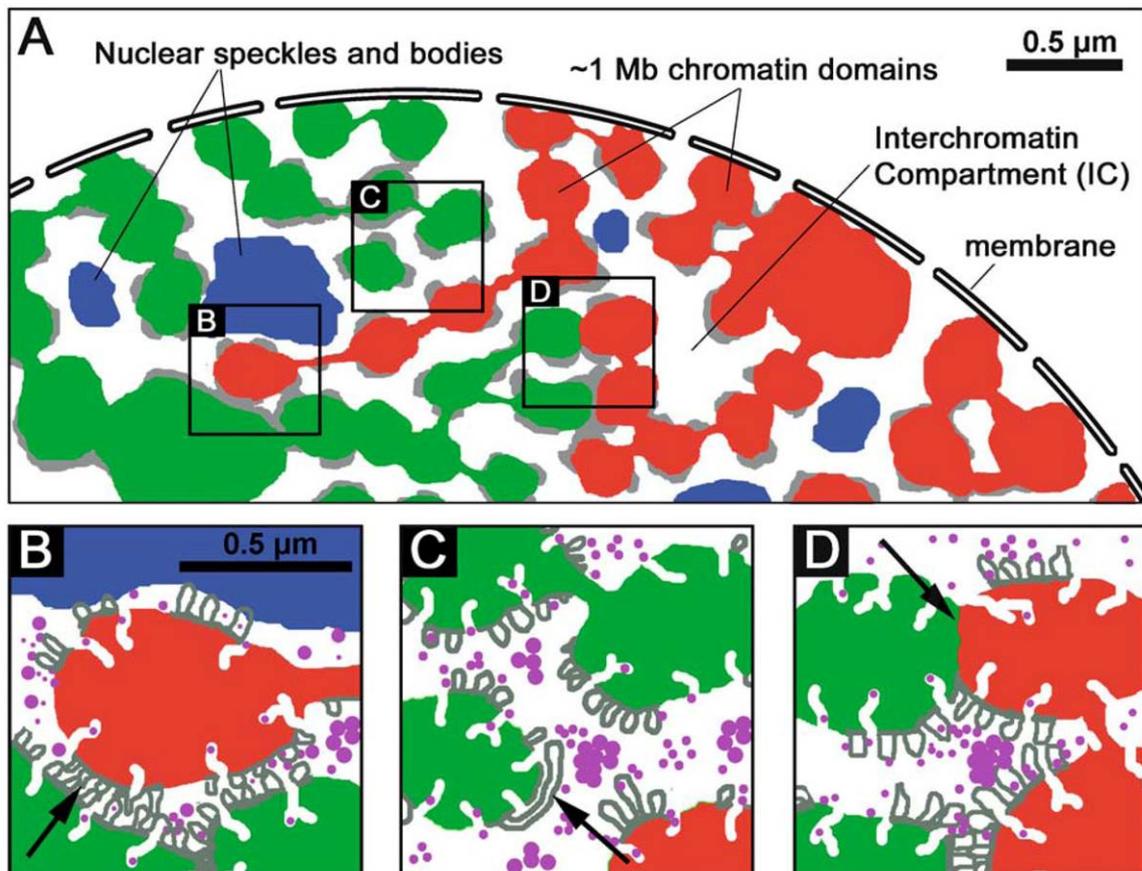


Abbildung 6: Das CT-IC-Modell

A Schema eines Ausschnitts aus einem Interphasezellkern. Dargestellt sind die Chromatin-Domänen (1Mb-Domänen und höher kondensierte Strukturen) zweier benachbarter CTs (in grün und rot dargestellt), umgeben von Interchromatin-Compartment (IC) (weiß). Im IC sind Cluster von Kernproteinen enthalten, die so genannten „nuclear bodies“ (blau), die im direkten Kontakt mit den Chromatin-Domänen stehen können (siehe B). Die Perichromatin-Region (PR) ist in grau dargestellt. (B) „Loop“ aus dem roten CT, welche, den Kanälen des IC folgend, auch in ein benachbartes CT (grün) hineinragen kann. Lokal dekontensierte Chromatinloops mit für die Transkription bereiten Genen bilden die PR (grau). Diese kann im Kanal des ICs in direktem Kontakt mit „nuclear bodies“ (blau) oder auch mit der PR eines benachbarten CTs stehen (siehe Pfeil), um sich die Faktoren der Transkriptions- und Splicingmaschinerie (lila) zu teilen. (C) Ausschnitt aus einem Bereich mit breiten Kanälen des ICs, in dem die dekontensierten Chromatinschleifen der PR (grau) frei diffundieren können (siehe Pfeil). Gene desselben oder auch verschiedener Chromosomen können sich so im IC für eine gemeinsam regulierte Transkription zusammenlagern (Phänomen des "Chromosome Kissing", siehe Kioussis 2005). (D) Direkter Kontakt (siehe Pfeil) zwischen zwei 1Mb-Domänen zweier benachbarter CTs (grün und rot) (entnommen aus Albiez et al 2006).

1.2 Epigenetik

Historisch gesehen beschreibt der Begriff „Epigenetik“ Begebenheiten, die durch genetische Prinzipien nicht zu erklären waren (Goldberg, Allis et al. 2007). Conrad Waddington (1905-1975) prägte erstmal diesen Begriff indem er die Epigenetik als den Zweig der Biologie beschrieb, der sich mit den kausalen Interaktionen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp schaffen, beschäftigt (Waddington 1942). Im weiten Sinne kann man die Epigenetik als eine Brücke zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp bezeichnen, etwas, dass das Resultat ändert, ohne die zugrundeliegende DNA zu verändern (Goldberg, Allis et al. 2007). Diese

Modifikationen der DNA stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel Krebs (Okada, Feng et al. 2005; Seligson, Horvath et al. 2005), beeinflussen Vorgänge wie Replikation und Transkription im Zellkern und verändern die Chromatinarchitektur (Craig 2005; Fuchs, Demidov et al. 2006). DNA ist im Zellkern um Nucleosome gewickelt, die aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 bestehen (siehe Abschnitt 1.2.3.2) Histone besitzen einen N-terminalen Aminosäure-„Tail“, der aus dem jeweiligen Nucleosom herausreicht und verschiedene biochemische Modifikationen, wie Methylierung, Acetylierung Phosphorylierung oder Ubiquitinierung tragen kann (Ito 2007)(Abb.7). Durch dieses kombinatorische Muster von Histon-Modifikationen bekommt jedes Nucleosom eine heterogene Identität, die die Zelle wie einen Code, den sogenannten Histon-Code ablesen kann und somit weiß, welche Prozesse ablaufen sollen (Ito 2007). Die grundlegenden Mechanismen der Epigenetik sollen nachfolgend erläutert werden.

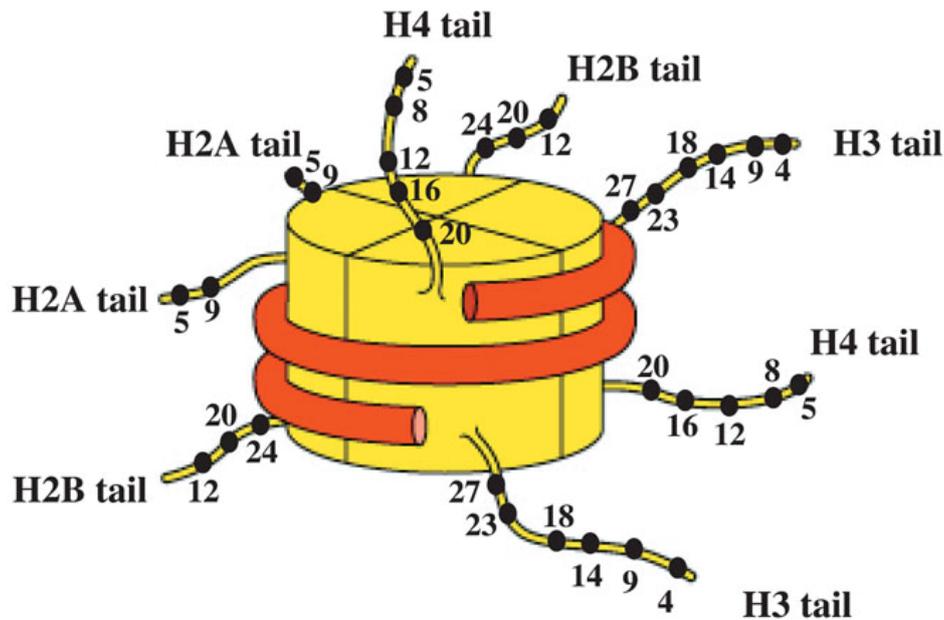


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Histon-Tails (aus Verdone et al 2005)

1.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist wohl die am besten charakterisierte chemische Modifikation von Chromatin. In Säugern wird dabei hauptsächlich das Cytosin in CpG-Dinukleotiden methyliert, wobei 70-80% der CpG-Dinukleotide betroffen sind (Ehrlich, Gama-Sosa et al. 1982).

Die DNA-Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen katalysiert. Bisher wurden vier dieser Methyltransferasen in Säugern identifiziert. DNMT1 hält die DNA-Methylierung während der Replikation aufrecht, indem sie die DNA-Methylierung des ursprünglichen DNA-Strangs auf den Tochterstrang kopiert (Leonhardt, Page et al. 1992). DNMT3a und DNMT3b sind für *de novo*-Methylierungen verantwortlich, da sie

an unmethylierte CpG-Dinukleotide binden können (Okano, Bell et al. 1999). Außerdem verbreiten sie zusammen mit DNMT1 Methylierungsmuster während der Zellteilung (Liang, Chan et al. 2002). DNMT2 hat nur eine geringe Aktivität als Methyltransferase *in vitro*, sie ist aber in der Lage, effizient tRNA zu methylieren (Goll, Kirpekar et al. 2006).

DNA-Methylierung ist generell mit einem inaktiven Chromatinstatus und Inhibition von Promotoren verbunden (Review: (Weber and Schubeler 2007)). Man unterscheidet zwei Modelle der DNA-Methylierung: erstens, Cytosin-Methylierung verhindert das Binden von Transkriptionsfaktoren an die DNA, und zweitens, DNA-Methylierung kann den Chromatinstatus dahingehend indirekt beeinflussen, dass sie methyl-CpG-bindende Proteine, wie Histondeacetylasen rekrutiert (Klose and Bird 2006).

1.2.2 Histon-Modifikationen

1.2.2.1 Acetylierung

Die Acetylierung von Lysinresten am N-Terminus der Histone ist ein reversibler Vorgang, der durch Acetyltransferasen (HAT: Histone Acetyl Transferase) katalysiert wird (Yang 2004). Es besteht eine Korrelation zwischen acetylierten Histonen und transkriptioneller Aktivität von Genen. Je mehr Histone acetyliert sind, desto höher ist die transkriptionelle Aktivität eines Gens, je weniger Histone acetyliert sind, desto weniger transkriptionell aktiv ist das Gen (Struhl 1998; Verdone, Caserta et al. 2005). Am inaktiven X-Chromosom zum Beispiel werden nur wenige Histon-Acetylierungen beobachtet (Kourmouli, Jeppesen et al. 2004). Durch die Acetylierung eines Histons wird die Ladung des N-terminale Schwanzes neutralisiert und somit die Bindung an die DNA gemindert (Hong, Schroth et al. 1993). So wird die Konformation des Nucleosoms verändert (Norton, Imai et al. 1989) und die Affinität für Transkriptionsfaktoren erhöht (Lee, Hayes et al. 1993; Vettese-Dadey, Grant et al. 1996; Gilbert and Ramsahoye 2005). Außerdem wird der Histon-Acetylierung eine Rolle in der DNA-Reparatur und dem Fortschreiten des Zellzyklus zugesprochen (Carrozza, Utley et al. 2003).

1.2.2.2 Methylierung

Methylierung von Histonen findet an Lysin- und Argininresten statt und wird durch Methyltransferasen (HMT: Histone Methyl Transferase) katalysiert (Zhang and Reinberg 2001; Lachner, O'Sullivan et al. 2003; Bannister and Kouzarides 2005). Es ist möglich, dass die Methylierung von Histonen eine Veränderung der Chromatinstruktur hervorruft. Jedoch ist eine Methylierung zu klein, um die Neutralisation der Ladung von Histonen zu bewerkstelligen und somit ihre Bindung an die DNA zu verändern. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass eine Methylierung an einem Histon eine Bindungsstelle schafft, an die regulatorische Proteine binden können (Bannister and Kouzarides 2005). Lysin-Seitenketten können mono-, di- oder trimethyliert werden, Arginin-Seitenketten können hingegen

nur mono-, oder dimethyliert werden (Bannister, Schneider et al. 2002; Margueron, Trojer et al. 2005). Die am meisten untersuchten Methylierungen sind die der Lysin-Seitenketten der Histone H3 und H4, die eine Rolle in der Unterscheidung zwischen Hetero- und Euchromatin spielen. So ist die Tri-Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 in heterochromatischen Domänen zu finden, wobei hier tri-methyliertes H3K9 und tri-methyliertes H4K20 vor allem in perizentrischem Heterochromatin, also konstitutivem Heterochromatin, beobachtet wird (Peters, Kubicek et al. 2003; Schotta, Lachner et al. 2004; Martens, O'Sullivan et al. 2005), während tri-methyliertes H3K27 in großen Mengen am inaktiven X-Chromosom lokalisiert, also in fakultativem Heterochromatin vorhanden ist (Plath, Fang et al. 2003; Kohlmaier, Savarese et al. 2004; Rougeulle, Chaumeil et al. 2004). Auch Euchromatin wird durch verschiedene Arten der Histon-Methylierung gekennzeichnet. Transkriptionell aktive Gene sind hier mit methyliertem H3K4 und H3K36 assoziiert (Margueron, Trojer et al. 2005).

Bei den Effekten der Histon-Methylierungen handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Modifikationen. Auch die Position und die nachbarschaftlichen Beziehungen der methylierten Histone spielt eine große Rolle (Review: (Kouzarides 2007)).

1.2.2.3 Phosphorylierung

Histone können durch Serin-/Threonin-Kinasen phosphoryliert werden. Allerdings ist über diese Art der Histon-Modifizierung und ihre Funktion noch nicht viel bekannt. Sie scheint jedoch an vielen wichtigen zellulären Prozessen, wie Transkription, Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden beteiligt zu sein (Cheung, Allis et al. 2000; Gilbert and Ramsahoye 2005).

1.3 Das X-Chromosom

1.3.1 Eigenschaften des menschlichen X-Chromosoms

1.3.1.1 Allgemeines

Das humane X-Chromosom besitzt viele Eigenschaften, die im menschlichen Genom einzigartig sind. Frauen erben ein X-Chromosom von jedem Elternteil, Männer hingegen erben nur das der Mutter. Die Genexpression eines der beiden weiblichen X-Chromosomen wird während der Embryonalentwicklung durch die so genannte X-Inaktivierung inaktiviert (siehe Abschnitt 1.4.2). Dieses inaktive X-Chromosom bleibt in den somatischen Körperzellen inaktiv. In der weiblichen Keimbahn wird es schließlich reaktiviert und es kommt zur meiotischen Rekombination mit dem zweiten X-Chromosom. Beim männlichen X-Chromosom kommt es nur in den pseudoautosomalen Regionen (PARs), die sich an den Enden von Xp und Xq befinden zur Rekombination mit dem Y-Chromosom. Gene, die innerhalb dieser PARs liegen, kommen sowohl auf dem X-Chromosom, als auch auf dem Y-

Chromosom vor. Gene außerhalb der PARs sind X-gekoppelt, das heißt, Männer besitzen nur eine einzelne Kopie davon. Deshalb sind viele X-gekoppelten Mendelschen Erbkrankheiten nur bei Männern zu finden. Die bekanntesten sind die Haemophilie A und B, die Rot-Grün-Blindheit, die Duchenn'sche Muskeldystrophie, die septische Granulomatose sowie eine Form der Retinopathia pigmentosa. Das charakteristische Muster der X-gekoppelten Vererbung, bei dem es hauptsächlich betroffene Männer gibt, aber keine Vererbung von Mann zu Mann, wurde im 18. Jahrhundert anhand der Haemophilie entdeckt und gab den Anstoß in den 80er Jahren für die ersten Erfolge im positionellen Klonen. Gefunden hat man hierbei die Gene für die septische Granulomatose (Royer-Pokora, Kunkel et al. 1986) und die Duchenne'sche Muskeldystrophie (Monaco, Neve et al. 1986).

Die einzigartigen Eigenschaften des X-Chromosoms sind eine Folge der Evolution der Geschlechtschromosomen in Säugern, die aus einem Autosomenpaar innerhalb der letzten 300 Millionen Jahre entstanden sind (Ohno 1967). Gestützt wird dies von der Tatsache, dass noch eine gewisse Homologie zwischen dem X- und dem Y-Chromosom innerhalb der PARs vorhanden ist (Graves, Gecz et al. 2002).

1.3.1.2 Eigenschaften der humanen X-Chromosom-Sequenz

Das humane X-Chromosom besitzt bis dato 1336 Gene (NCBI Build 36.2), was 8.6 Genen/Mb entspricht. Die Gendichte entlang des gesamten Chromosoms ist somit eine der niedrigsten im gesamten Genom (Nature). Nur 1.7% der X-Chromosomsequenz besteht aus Exons und 33% des Chromosoms wird transkribiert. Dies lässt auf eine geringe Länge der Gene schließen. Nichts desto trotz besitzt das X-Chromosom das längste bekannte Gen im menschlichen Genom, das Dystrophin-Gen *DMD* (Xp21.1), welches 2.220.223 Basenpaare umspannt. Die niedrige Gendichte spiegelt sich auch in der Anzahl der CpG-Islands wieder, welche bei 5.25/Mb liegt. Dies entspricht der Hälfte des genomweiten Durchschnitts (Intern.Human Sequ.Consortium (2001)). Trotz der allgemeinen Genarmut des X-Chromosoms besitzt dieses zwei RIDGEs (siehe Abschnitt 1.1.2.4.2). Eines davon liegt in der Region Xp11 und das andere auf dem langen Arm im subtelomerischen Bereich Xq28 (Versteeg, van Schaik et al. 2003). Auch nicht-codierende RNA-Gene sind auf dem X-Chromosom vorhanden. Das bekannteste ist *XIST* (X (inactive)-specific transcript) (Brown, Ballabio et al. 1991), welches eine entscheidende Rolle bei der X-Inaktivierung innehat. Der *Xist*-Locus (Xq13) umspannt 32.103 Basenpaare und sein untranslatiertes Transkript bedeckt und inaktiviert ein X-Chromosom (Nature).

Weiterhin auffallend ist die Anzahl der *MAGE*-Gene, deren Genprodukte zur Familie der Cancer-Testis-Antigene gehören, die in einer Reihe von Krebsarten vor allem im Hoden exprimiert werden (Scanlan, Simpson et al. 2004). Es wurden *MAGE*-Domänen in 32 Genen auf dem X-Chromosom gefunden, während im übrigen

Genom bisher nur 4 andere *MAGE*-Gene beschrieben sind (Ross, Bentley et al. 2006).

Interspersed Repeats machen in etwa 56% der euchromatischen X-Chromosom-Sequenz aus (genomweiter Durchschnitt: 45%), wobei Alu-Sequenzen der short interspersed nuclear elements (SINEs) unterhalb des Durchschnitts liegen, was wohl an der genarmen Natur des X-Chromosoms liegt. Die Anzahl der long terminal repeat (LTR) Transposons dagegen liegt über dem Durchschnitt. Am meisten vorhanden sind allerdings die long interspersed nuclear elements (LINEs) der L1-Familie, welche etwa 29% der X-Chromosom-Sequenz ausmachen (genomweiter Durchschnitt: 17%) (Ross, Bentley et al. 2006).

1.3.2 **X-Inaktivierung**

1.3.2.1 Einführung

Säuger haben sehr komplexe Funktionen entwickelt, um Gene zu regulieren und deren Expression während der Entwicklung zu kontrollieren. Eine der faszinierendsten Arten der Genregulation ist die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen im weiblichen Organismus, die zur Expression von Genen von einem der beiden Chromosomen führt. In Säugern scheint es zwei verschiedene Formen der X-Inaktivierung zu geben: geprägte („imprinted“) X-Inaktivierung und zufällige X-Inaktivierung. Die geprägte X-Inaktivierung findet man in frühen Säugern, wie zum Beispiel bei Beuteltieren, die sich vor ungefähr 180 Millionen Jahren von den Plazenta-Säugern abgespalten haben. Hier wird immer das paternale X-Chromosom inaktiviert (Ng, Pullirsch et al. 2007). Bei der zufälligen X-Inaktivierung wird in einer frühen embryonalen Entwicklungsstufe jeweils eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert, unabhängig davon, ob es das väterliche oder das mütterliche Chromosom ist. Dieser Mechanismus basiert auf einer non-coding RNA, XIST, welche nur in Zellen von Plazenta-Säugern, nicht aber in frühen Säugern oder anderen Wirbeltieren vorkommt (Duret, Chureau et al. 2006). Weshalb sich die zufällige X-Inaktivierung entwickelt hat ist unklar, es gibt jedoch Theorien, dass die Ausbreitung der Plazenta-Säuger aufgrund Veränderungen der Sauerstoffkonzentrationen in den letzten 200 Millionen Jahren dafür verantwortlich ist (Falkowski, Katz et al. 2005). Das Plazentasystem benötigt, aufgrund des ineffizienten Transports vom mütterlichen Kreislauf zum Embryo, eine hohe Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft. Nachdem im Laufe der Zeit die Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre anstieg, wurde dieses System effizienter und es kam dazu, dass sich das Verlangen nach Reproduktion der Plazenta-Säugerweibchen steigerte und der Selektionsdruck für Vorteile der Säugerlinien sich auf Männchen beschränkte (Ng, Pullirsch et al. 2007). Das allmähliche Verschwinden des Y-Chromosoms und das daraus resultierende Entstehen eines einzelnen X-Chromosoms bei Männchen bietet

nun eine haploide Region im Säuger genom, die einer effizienten und stringenten Selektion unterliegt (Ng, Pullirsch et al. 2007).

Diese Hemizygotie macht männliche Säuger allerdings anfälliger für nachteilige Effekte X-gekoppelter Mutationen. Bei weiblichen Säugern hingegen kommt es durch die zufällige X-Inaktivierung zu einem Mosaik von Zellen, in denen entweder das mütterliche oder das väterliche X-Chromosom inaktiviert ist. Somit können schädliche Mutationen maskiert und die Reproduktionsrate gesteigert werden (Franco and



Abbildung 8: Calico-Katze (Foto privat)

Ballabio 2006). Es wird deshalb davon ausgegangen, dass dies der zufälligen X-Inaktivierung einen entscheidenden Selektionsvorteil gab (Ng, Pullirsch et al. 2007). Besonders deutlich wird dieses Mosaik bei der Calico-Katze. Sie besitzt auf einem X-Chromosom ein Gen für orange Fellfarbe und auf dem anderen ein Gen für schwarze Fellfarbe. Je nachdem, welches X-Chromosom in der jeweiligen Zelle inaktiviert wird, prägt sich die orange oder schwarze Fellfarbe aus. Zusätzlich dazu besitzt sie noch ein Gen für weiße Fellfarbe (Abb.8) (Migeon 1994). Erstmals beschrieben wurde die X-Inaktivierung 1961 von der Genetikerin Mary Francis Lyon, die damals postulierte, dass eines der beiden X-Chromosomen in einer weiblichen Zelle inaktiv sei, dass diese Inaktivierung früh in der Embryonalentwicklung stattfindet, und dass es zufällig sei, welches der beiden X-Chromosomen inaktiviert werde (Lyon 1961).

1.3.2.2 counting und choice

Zufällige X-Inaktivierung besteht aus einer Serie von komplexen geordneten Vorgängen. Zu Beginn der Inaktivierung stellt jede Zelle sicher, dass, in einer zufälligen Art und Weise, nur ein X-Chromosom pro diploidem Chromosomensatz aktiv bleibt und das (oder die) andere(n) inaktiviert werden (counting and choice) (Heard and Distèche 2006). Dieser Vorgang wird durch eine kleine ~1Mb große Region, dem X-Inaktivierungszentrum (Xic), kontrolliert, die das non-coding *Xist*-Transkript produziert, das für das Inaktivieren notwendig ist (Brown, Ballabio et al. 1991; Heard and Distèche 2006). Zellen, die aufgrund einer Deletion, Translokation oder Mutation in diesem Bereich keines oder ein fehlerhaftes Xic besitzen sind nicht in der Lage, die X-Inaktivierung zu initiieren (Avner and Heard 2001; Okamoto, Otte et al. 2004). Ein weiterer wichtiger Bestandteil des counting und choice ist die *Tsix*-RNA, die mit dem *Xist*-Gen überlappt und in der Gegenstrang-Richtung transkribiert wird (Lee, Davidow et al. 1999). Anfänglich wird *Tsix* von beiden X-Chromosomen

exprimiert, wird aber vor der Inaktivierung am inaktiven X-Chromosom herunterreguliert. Umgekehrt bleibt die *Tsix*-Expression am aktiven X-Chromosom länger bestehen. Heterozygote Deletion von *Tsix* in weiblichen Zellen führt zur Inaktivierung des Chromosoms, das die Deletion trägt, was zu der Annahme führt, dass *Tsix* eine Rolle bei der Auswahl des zu inaktivierenden X-Chromosoms spielt (Lee and Lu 1999). *Tsix* ist während der Entwicklung eines Organismus durch Enhancer reguliert, die in den *Xite*- und *DXPas34*-Elementen enthalten sind. Das *CTCF*-Protein des *DXPas34*-Elements wird als potentieller Kandidat für das „Choice“ gesehen, obwohl noch jegliche Kenntnisse über die Funktion des Proteins fehlen (Chao, Huynh et al. 2002). Allerdings konnte man beobachten, dass eine Deletion des *DXPas34*-Elements zu einer ektopischen X-Inaktivierung führt (Vigneau, Augui et al. 2006).

Da in männlichen Zellen *Tsix* nicht notwendig ist, um den *Xist*-Promoter zu inaktivieren, geht man davon aus, dass es einen sogenannten „Kompetenzfaktor“ in Zellen geben muss, die mehr als ein X-Chromosom besitzen und somit weibliche Zellen prädisponieren, ein X-Chromosom zu inaktivieren, indem sie die *Xist*-Expression begünstigen (Lee and Lu 1999). Dies wird dadurch bestätigt, dass ein ektopischer Promotor gefunden wurde, der strangaufwärts von *Xist* lokalisiert und das Chromosom anfälliger für die Inaktivierung macht (Nesterova, Johnston et al. 2003). Allerdings hat man auch herausgefunden, dass Deletionen in *Xist* auch den „count and choice“-Mechanismus beeinflusst und das andere X-Chromosom inaktiviert wird (Marahrens, Loring et al. 1998). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass *Xist* durch positive Signale und negative Elemente reguliert wird, die möglicherweise einen epigenetischen „Schalter“ in *Xic* bilden (Lee 2005; Vigneau, Augui et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Schritt in der X-Inaktivierung wurde kürzlich entdeckt. Durch die Analyse der Position von *Xic*-Loci während der X-Inaktivierung hat man festgestellt, dass diese physikalisch paaren, um eine interchromosomale Kommunikation möglich zu machen. Diese enge Anlagerung der beiden Loci tritt genau zu Beginn der X-Inaktivierung auf (Marahrens 1999; Bacher, Guggiari et al. 2006; Xu, Tsai et al. 2006).

1.3.2.3 Inaktivierung durch *Xist*-RNA

Nachdem das zu inaktivierende X-Chromosom durch den „choice“-Vorgang ausgewählt wurde, wird die Expression der *Xist*-RNA an diesem Chromosom verstärkt und *Xist*-RNA-Moleküle lagern sich an (Chow, Yen et al. 2005). Dieser Vorgang ist auf eine sehr frühe Entwicklungsphase beschränkt und ist reversibel. Findet er später in der Entwicklung statt, ist er von *Xist* unabhängig und irreversibel (Csankovszki, Panning et al. 1999). Dies lässt auf eine entscheidende Rolle von *Xist* bei der Initiierung der X-Inaktivierung schließen, jedoch nicht bei der

Aufrechterhaltung des inaktiven Status (Ng, Pullirsch et al. 2007). Die Lokalisierung von *Xist* benötigt keine X-Chromosom-spezifischen Sequenzen. Ektopisches *Xist* kann ebenso von Autosomen exprimiert werden und diese auch inaktivieren (Lee, Strauss et al. 1996; Herzing, Romer et al. 1997; Wutz and Jaenisch 2000). Allerdings hat man festgestellt, dass die Expression und Initiierung der Inaktivierung außerhalb des X-Chromosoms weniger effektiv ist. Eine mögliche Erklärung hierfür sind „Wegstationen“ oder „Verstärker“ entlang des X-Chromosoms (Abb.9A). Da das X-Chromosom überdurchschnittlich viele long interspersed elements (LINEs) enthält, werden diese als mögliche Kandidaten gesehen (Lyon 2003). Wutz und seine Mitarbeiter haben funktionelle Motive innerhalb der *Xist*-RNA bei der Maus gefunden und dabei festgestellt, dass die Assoziation von *Xist* mit dem Chromosom und seine Fähigkeit, die Inaktivierung zu initiieren nicht zusammenhängen (Wutz, Rasmussen et al. 2002). Die Inaktivierung ist hier abhängig von einer Sequenz, die sich am 5'-Ende von *Xist* befindet und aus 7.5 Wiederholungen eines Motivs besteht, welches sich zu zwei sogenannten „Stem loops“ faltet, an die sich wiederum Faktoren binden könnten, die die Genexpression unterdrücken können. *Xist*-RNA, der dieses Motiv fehlt kann sich zwar am Chromosom anlagern, jedoch ist sie nicht in der Lage, die Inaktivierung zu initiieren. Demnach ist die Fähigkeit, zu inaktivieren nicht die Voraussetzung für die Lokalisation von *Xist* (Wutz, Rasmussen et al. 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen haben Ng et al ein Modell vorgeschlagen, bei dem diese Wiederholungsmotive aus schwachen Bindungsstellen bestehen, die es *Xist* und weiteren Faktoren ermöglichen, leichter an das Chromosom zu binden. Das Anheften eines Faktors erleichtert wiederum das Anheften des nächsten Faktors und

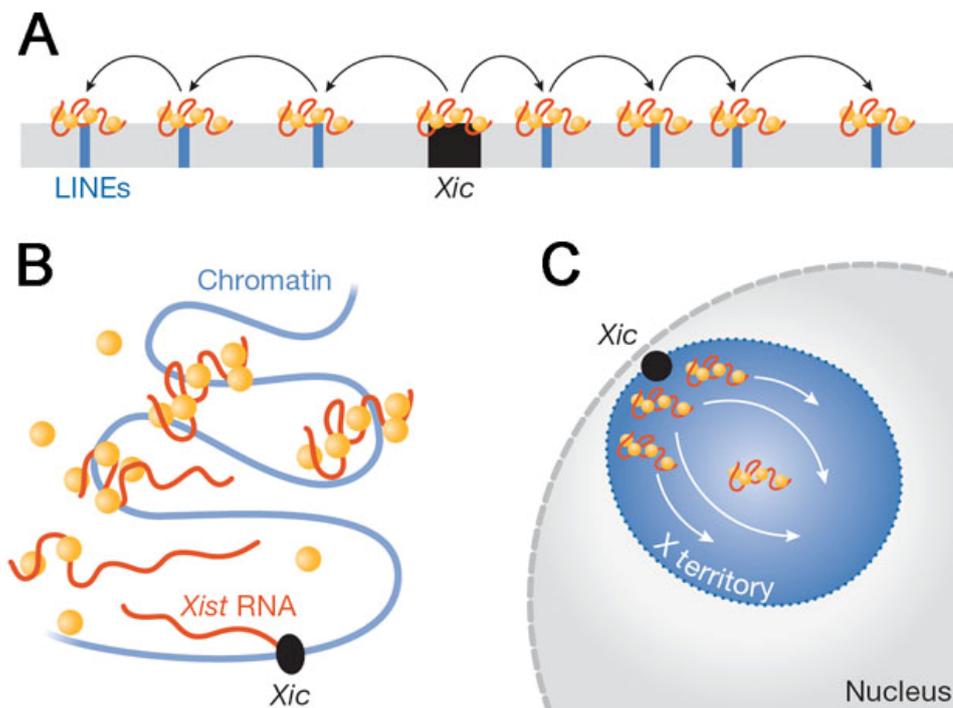


Abbildung 9: Verbreitung von *Xist*-RNA am inaktiven X-Chromosom

A LINEs als Wegstationen oder Verstärker für *Xist*, **B** schwache Bindungsstellen für *Xist* ermöglichen das leichtere Anheften, **C** Transport von *Xist* in das Innere des Chromosoms (aus Ng et al 2007)

resultiert so in einem stabilen Komplex. *Xist* wird dadurch von seinem Transkriptionsort über das gesamte Chromosom verteilt (Ng, Pullirsch et al. 2007) (Abb.9B). Einen Beweis hierfür gibt es allerdings noch nicht. Jedoch geht dieses Modell einher mit der Beobachtung, dass *Xic* im Interphasekern peripher lokalisiert ist, und *Xist* somit in das Innere des Chromosoms gebracht werden muss (Chaumeil, Le Baccon et al. 2006) (Abb.9C).

1.3.3 Organisation des inaktiven X-Chromosoms

Um sicherzugehen, dass das ausgewählte inaktivierte X-Chromosom auch über Zellteilungen hinweg wiedererkannt wird, muss es in einer speziellen Art und Weise markiert werden. Hierfür wird es physikalisch reorganisiert und mit, von anderen Chromosomen unterscheidbaren Markern versehen. Während der Differenzierung wird das inaktive X-Chromosom sehr stark kondensiert und bildet somit eine kompakte heterochromatische Struktur, die durch die Abwesenheit von intronischer RNA und RNA-Polymerase II gekennzeichnet ist (Okamoto, Otte et al. 2004). Desweiteren wurden centromerische und Cot-1-DNA innerhalb des inaktiven X-Chromosoms gefunden, während Gene, unabhängig von ihrer transkriptionellen Aktivität an der Oberfläche des Chromosoms lokalisieren (Clemson, Hall et al. 2006). Außerdem findet man eine Reihe von Faktoren und Histon-Modifikationen im inaktiven X-Chromosom (Ng, Pullirsch et al. 2007). Tabelle 1 (angelehnt an (Ng, Pullirsch et al. 2007)) zeigt diese. Hier ist interessant, dass der Scaffold attachment factor-A (SAF-A), der an Satelliten-DNA, Scaffold attachment regions (SARs) und Matrix attachment regions (MARs) bindet, und dem eine Rolle in der Regulation der Genexpression und DNA-Replikation zugesprochen wird (Jenke, Fetzer et al. 2002; Jenke, Stehle et al. 2004) in großer Menge am inaktiven X-Chromosom gefunden wird (Fackelmayer 2005). SARs und MARs werden mit der übergeordneten Chromatinorganisation in Verbindung gebracht. SAF-A interagiert mit Nukleinsäure und bildet Multimere. Tatsächlich bindet *Xist* an SAF-A und es wird eine stabile Struktur im inaktiven X-Chromosom ausgebildet, die eine essentielle Plattform für die Aufrechterhaltung des inaktiven Status des X-Chromosoms darstellt (Fackelmayer 2005). Auch eine Anreicherung von H3K9 di-methyliert (H3K9me₂), das eines der Kennzeichen für Heterochromatin ist (Jenuwein and Allis 2001; Bannister, Schneider et al. 2002) kann am inaktiven X-Chromosom, speziell an den Promotoren inaktivierter Gene beobachtet werden (Heard, Rougeulle et al. 2001; Boggs, Cheung et al. 2002). H3K9me₂ rekrutiert weitere Faktoren, die die Chromatinstruktur beeinflussen. Dazu gehört das H3K9me₂-binding Protein HP1, welches in vitro an H3K9me₂ bindet und für die Bildung von perizentrischem Heterochromatin notwendig ist (Bannister, Zegerman et al. 2001; Lachner, O'Carroll et al. 2001; Fischle, Wang et al. 2003).

Auch H3K27 tri-methyliert (H3K27me₃) wird in großen Mengen am inaktiven X-Chromosom in einigen Zelltypen beobachtet (Gilbert, Boyle et al. 2003; Zinner, Teller

et al. 2007). Basierend auf Ergebnissen in *Drosophila* (Czermin, Melfi et al. 2002) geht man davon aus, dass H3K27me3 eine Bindungsstelle für das Chromodomänen-Protein Polycomb (PC), ein Bestandteil des Polycomb-Repressor-Komplexes (PCR), bereit stellt, welches für die Aufrechterhaltung der Inaktivierung homeotischer Gene nötig ist (Simon and Tamkun 2002). Tatsächlich findet man eine Anhäufung von PCR1 am inaktiven X-Chromosom (Plath, Talbot et al. 2004). Chadwick und Willard haben 2004 herausgefunden, dass H3K27 tri-methyliert und H3K9 tri-methyliert an verschiedenen Positionen des inaktiven X-Chromosoms gefunden werden. Während H3K27 tri-methyliert zusammen mit der *Xist*-RNA auf einer Seite des Chromosoms lokalisiert, ist H3K9 tri-methyliert auf der anderen Seite zusammen mit HP1 zu finden (Chadwick and Willard 2004).

Ein weiteres Merkmal des inaktiven X-Chromosoms ist seine Replikationszeit. Man beobachtet eine asynchrone Replikation im Vergleich zu anderen Chromosomen. Das inaktive X-Chromosom repliziert früh in der S-Phase im Präimplantationsstadium des Embryos und spät in den Zellen des Embryos nach der Implantation (Chow, Yen et al. 2005).

Merkmal	Beschreibung
Xist RNA	Lange funktionelle RNA, initiiert Inaktivierung
PcG-Proteine	PRC2 PRC1
Modifikationen	Histon H3K27 tri-methyliert (durch PRC2) Histon H2AK119 ubiquitiniert (durch PRC1) Histon H4K20 methyliert Histon H3K9 di-methyliert Histon H4 hypoacetyliert
Histonvarianten	MacroH2A Histon H1
Andere Proteine	SAF-A (assoziiert mit der nucleären Matrix) BRCA1
Merkmale	Ausschalten von RNA-Polymerase II späte Replikation

Tabelle 1: Faktoren und Histonmodifikationen des inaktiven X-Chromosoms

1.3.4 Aufrechterhaltung des inaktiven Status des X-Chromosoms

Ist ein X-Chromosom einmal inaktiviert, so wird dieser Status über alle folgenden Zellteilungen aufrechterhalten. *Xist* spielt hierbei nur eine kleine Rolle, während epigenetische Markierungen, wie DNA-Methylierung, späte Replikation und Hypo-Acetylierung des Histons H4 synergistisch agieren und eine bedeutend größere Rolle spielen (Lucchesi et al 2005). Der Mechanismus, der zu einer stabilen X-Inaktivierung führt ist bis dato allerdings noch nicht ausreichend erforscht, aber es sollen PcG-Proteine daran beteiligt sein. PcG-Proteine sind von den Fliegen zu den Säugern konserviert und sorgen dafür, dass die Transkription von Kontrollgenen der Entwicklung unterdrückt wird (Bantignies and Cavalli 2006). Zwei dieser PcG-Proteinkomplexe, Polycomb repressive complex 1 (PCR1) und Polycomb repressive

complex 2 (PCR2) besitzen katalytische Aktivität. Sie sind in der Lage, die Ubiquitinierung von Histon H2AK119 (H2AK119ub1) und die Methylierung von Histon H3K27 (H3K27me3) zu vermitteln. PRC1 und PRC2 lagern sich am inaktiven X-Chromosom an und erstellen H2AK119ub1- und H3K27me3-Markierungen entlang des Chromosoms (Plath, Fang et al. 2003; de Napoles, Mermoud et al. 2004; Fang, Chen et al. 2004). Die Lokalisation von PCR-Proteinen und auch das Bestehen der epigenetischen Markierungen ist abhängig von *Xist* und einem zusätzlichen Faktor, der als „chromosomales Gedächtnis“ bezeichnet wird (Kohlmaier, Savarese et al. 2004). Wie dieses „chromosomale Gedächtnis“ aussieht ist bisher unbekannt. Die Expression von *Xist* in einer frühen Stufe der Entwicklung führt zu diesem „Gedächtnis“ und beide Faktoren sind notwendig, um die epigenetischen Markierungen H2AK119ub1 und H3K27me3 am inaktiven X-Chromosom zu etablieren (Kohlmaier, Savarese et al. 2004; Schoeftner, Sengupta et al. 2006).

1.3.5 Gene, die der X-Inaktivierung entkommen

Obwohl die meisten Gene auf dem inaktiven X-Chromosom inaktiviert werden, gibt es doch welche, die diesem Mechanismus entkommen. Etwa 15-20% der Gene auf dem inaktiven X-Chromosom sind aktiv (Carrel, Cottle et al. 1999), wobei die Mehrheit dieser Gene auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms liegt, was eventuell durch zentromerisches Heterochromatin, das das X-Inaktivierungscenter wie eine Barriere abtrennt, hervorgerufen wird (Disteche 1999). Desweiteren liegen diese Gene in den beiden pseudoautosomalen Regionen (Heard and Disteche 2006). Normalerweise ist das Expressionslevel dieser Gene auf dem inaktiven X-Chromosom niedriger als auf dem aktiven X-Chromosom (Carrel and Willard 2005; Nguyen and Disteche 2006). Deshalb geht man von einer teilweisen Inaktivierung dieser Gene aus, hervorgerufen durch die Nähe zu inaktivem Chromatin oder durch das Heraufregulieren der Gene auf dem aktiven X-Chromosom (Review: (Disteche, Filippova et al. 2002)). Die Chromatinstruktur der Gene, die der X-Inaktivierung entkommen, entspricht hinsichtlich Histonmodifikationen und Fehlen von DNA-Methylierungen der „normaler“ aktiver Gene (Goodfellow, Mondello et al. 1988; Gilbert and Sharp 1999; Boggs, Cheung et al. 2002; Filippova, Cheng et al. 2005).

1.3.6 Das X-Chromosom im Interphasezellkern

Das inaktive X-Chromosom ist in vielen Zellkernen als sogenannter Barr-Body bereits im Lichtmikroskop zu erkennen. Dieser Barr-Body besteht aus fakultativem Heterochromatin und wurde 1949 von Murray Llewellyn Barr entdeckt (Barr and Bertram 1949). Der Begriff *Barr-Body* wurde Anfang der 60er durch Mary Frances Lyon geprägt (Lyon 1962). Bereits 1985 wurde von Bourgeois et al gezeigt, dass das inaktive X-Chromosom meist am Rand humaner Fibroblasten liegt (Bourgeois, Laquerriere et al. 1985).

Unterschiede zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosomterritorium in der Struktur sind ebenfalls beobachtet worden. Untersuchungen in weiblichen humanen, diploiden amniotischen Zellen zum Volumen, zur Form und zur Oberflächenflächenstruktur ergaben, dass sich die beiden X-Territorien in ihrem Volumen zwar kaum unterscheiden, jedoch in ihrer Form und ihrer Oberflächenstruktur. Während das aktive X-Chromosom flacher erscheint und eine größere, unregelmäßige Oberfläche besitzt, ist das inaktive X-Chromosom runder und hat eine glattere Oberfläche (Eils, Dietzel et al. 1996). Diese runde Form könnte eine Folge davon sein, dass das inaktive X-Chromosom eine Art „Loop“ bildet, indem sich die beiden Telomere aneinanderlagern, während dies im aktiven X-Chromosom nicht der Fall ist (Walker, Cargile et al. 1991). Diese Telomerassoziation konnte von Dietzel et al allerdings nicht bestätigt werden (Dietzel, Eils et al. 1998).

Die Anordnung der Gene innerhalb des X-Territoriums im Interphasezellkern wurde von Clemson et al untersucht. Sie fanden heraus, dass Gene, unabhängig von ihrer Expression am Rand des Barr-Bodies liegen, während innerhalb des Barr-Bodies sogenannte „Junk-DNA“, wie Cot-1-DNA und repetitive Sequenzen zu finden sind. Somit entsteht ein genreicher Rand um das inaktive X-Chromosom herum (Abb.9). Die Gene des aktiven X-Chromosoms sind auch eher randständig verteilt, jedoch ist dies nicht so ausgeprägt wie auf dem inaktiven X-Chromosom, was die Autoren damit begründen, dass die Oberfläche des aktiven X-Chromosoms mehr Invaginationen enthält und es somit scheint, dass die Gene in Löchern innerhalb des Territoriums liegen (Clemson, Hall et al. 2006). Die Untersuchung einzelner Gene unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität zeigte, dass Gene, die transkriptionell aktiv sind (ANT2 auf Xa, ANT3 auf Xa und Xi), weiter außerhalb ihres Chromosomenterritoriums liegen, als Gene, die transkriptionell inaktiv sind (ANT2 auf Xi). Diese liegen deutlich mehr im Inneren des Chromosoms (Dietzel, Schiebel et al. 1999).

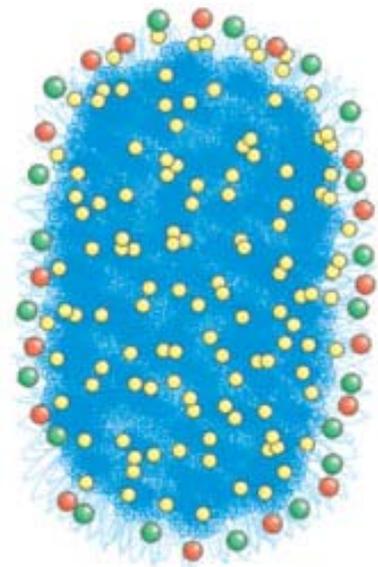


Abbildung 10: Organisation des inaktiven X-Chromosoms

In Blau ist der Barr-Body dargestellt. Rot und Grün demonstrieren Gene (aktiv und inaktiv), in Gelb ist die Xist RNA dargestellt (aus Clemson et al 2006)

1.4 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)

Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) sind Plasmide aus dem Bakterium *Escherichia coli* (E.coli), genauer, aus dem F-Faktor (Shizuya, Birren et al. 1992). Dieser F-Faktor kodiert nicht nur für Gene, die das Bakterium für seine eigene Replikation benötigt, sondern besitzt auch die Fähigkeit, die Anzahl seiner Kopien zu

kontrollieren (1-2 Kopien pro Zelle) (Willetts and Skurray 1987). Dadurch wird die Rekombinationsrate der Plasmid-DNA gering gehalten. Ein weiterer Vorteil des F-Faktors als Vektor besteht in der Größe der DNA-Stücke, die in diesen kloniert werden können. F-Faktoren können DNA-Stücke von bis zu 300kb aufnehmen (Strachan 1996). Desweiteren besitzen F-Plasmide ein Selektionsgen für die Transformation in die Bakterienzelle, welches in den meisten Fällen ein Antibiotikaresistenzgen ist, sowie ein „cloning segment“ mit variablen Schnittstellen für Restriktionsenzyme, welches in einem Reportergen integriert ist, um die Integration der genomischer DNA in das Plasmid kontrollieren zu können (Shizuya, Birren et al. 1992).

Alle in dieser Arbeit verwendeten BAC-Klone stammen aus der Bibliothek RPCI-11, welche am Roswell Parc Cancer Institute aus der DNA eines anonymen männlichen Spenders erstellt wurde. Die genomische DNA des Spenders wurde in zwei verschiedenen Ansätzen verdaut, einmal mit dem Enzym EcoRI und einmal mit dem Enzym MboI. Anschließend wurden die dadurch entstandenen Fragmente in die Vektoren pBACe3.6 und pTARBAC1 integriert und in E.coli DH10B-Zellen transformiert. Dadurch erhielt man eine 30fach redundante, aus 543797 Klonen bestehende Bibliothek mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 178kb, die man nun über über Endsequenzierungen, Chromosome walking und/oder Hybridisierungen mit speziellen Markern bestimmten Abschnitten des menschlichen Genoms zugeordnet konnte (Osoegawa, Mammoser et al. 2001).

Da die Eigenschaften der BAC-Klone, wie die genaue Lokalisation, enthaltene Gene, und die Gendichteumgebung, anhand von Datenbanken genau definiert werden können, eignen sie sich sehr gut zur Untersuchung der Lokalisation von Chromatin mit verschiedenen Eigenschaften im Zellkern.

Eine ausführliche Liste der in dieser Arbeit verwendeten BAC Klone befindet sich im Anhang.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Während Chromosomen in der Metaphase einen distinkten Aufbau zeigen und ihre äußere Form, sowie die lineare Anordnung der DNA-Sequenzen, die durch Bereiche mit hoher und niedriger Gendichte bzw. transkriptioneller Aktivität und unterschiedlicher Replikationszeit durch verschiedene Bandenmuster klar definiert ist, zeigen Chromosomen in der Interphase variable, unregelmäßige Strukturen, die in den letzten Jahren eingehend untersucht wurden, um ein Prinzip der höheren Anordnung von Chromatin im Zellkern zu beschreiben. Dabei wurde gezeigt, dass sich in vielen verschiedenen Zelltypen genreiches, früh replizierendes und auch transkriptionell aktives Chromatin präferentiell in der Zellkernmitte lokalisiert, während genarmes, spät replizierendes und transkriptionell inaktives Chromatin den Platz am Zellkernrand einnimmt. Welche dieser Chromatineigenschaften jedoch die treibende Kraft für die Anordnung im Zellkern ist, wird derzeit diskutiert.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, sollten aus 333 BACs, die über das gesamte X-Chromosom gleichmäßig verteilt sind, Pools mit verschiedenen Eigenschaften erstellt werden, um die Faktoren Gendichte und transkriptionelle Aktivität zu untersuchen. So sollten BAC-Pools resultieren, die innerhalb eines 2Mb- und eines 10Mb-Fensters genreich und genarm sind, Pools, die hoch und niedrig exprimiert sind, Pools mit wenigen BACs, die genreich und hoch exprimiert oder genreich und niedrig exprimiert sind, sowie Pools, die genarm und hoch exprimiert oder genarm und niedrig exprimiert sind, um die einzelnen Faktoren gezielt untersuchen zu können. Anhand von 3D-FISH-Experimenten, Laserscanning-Mikroskopie und computergestützten quantitativen Auswertungen sollte die radiale Anordnung dieser verschiedenen BAC-Pools im Zellkern humaner Fibroblasten und im Chromosomenterritorium untersucht werden.

Das X-Chromosom in weiblichen Zellkernen stellt ein gutes Beispiel zur Untersuchung solcher Fragestellungen dar, da beide Chromosomen die gleiche Anordnung von Genen besitzen, sich jedoch in ihrer transkriptionellen Aktivität erheblich unterscheiden.

Zusätzlich dazu sollten Strukturanalysen des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms durchgeführt werden. Hierfür wurden anhand eines Computerprogramms Intensitätsschwerpunkte der BAC-Pools errechnet und ausgehend von diesen Distanzen und Winkel gemessen. Dadurch sollte eine erste Einschätzung von Kompaktierungs- und Faltungsunterschieden zwischen den beiden Chromosomen gemacht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Chemikalien	Firma
Agar	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose SeaKem ME	FMC Rockland, Maine, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Colcemid (10µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextranblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Diethyl-Ether	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTP-Mix (2,5 mM each)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Dulbecco`s MEM Medium	Seromed Biochrom, Berlin
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidium-Bromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS	Seromed Biochrom, Berlin
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gel-loading-Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Heparin	Braun, Melsungen
Immersionsöl	Leica, Wetzlar
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat Dihydrat	Merck, Darmstadt

Chemikalien	Firma
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin
Pepton	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Phytohämagglutinin	Seromed Biochrom, Berlin
Polylysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640 Medium	Calbiochem, Darmstadt
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
TOPRO	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Tris-HCl (pH 8,0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung 10x	Seromed Biochrom, Berlin
Tween 20	Calbiochem, Darmstadt
Yeast extract	GERBU Biotechnik, Gaiberg

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

Nukleotide/Primer/DNA	Firma
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM)	Roche, Mannheim
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNP-16-dUTP	NEN Life Science Produkts, Inc., Boston, USA
Digoxigenin-16-dUTP	Roche, Mannheim
6MW-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
human Cot-1 DNA	Gibco-BRL, Karlsruhe
Salmon Sperm DNA	Gibco-BRL. Karlsruhe
Lamda/Hind III Marker	Roche, Mannheim
BrdU	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Antikörper und Fluorochrome	Firma
Antifade Medium Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA
Avidin-Alexa-488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Avidin-Cy3	Dianova, Hamburg
Avidin-Cy5	Dianova, Hamburg
Avidin-FITC	Vector, Burlingame CA, USA
Goat α Avidin-Bio	Vector, Burlingame CA, USA
Goat α Avidin-FITC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Goat α Mouse-Alexa488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat α Rabbit-Cy5	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Goat α Rabbit-Cy3	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Goat α Rat-Cy3	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Mouse α BrdU	Becton Dickinson, San Jose
Mouse α Dig-Cy3	Dianova, Hamburg
Mouse α Ki67	DAKO
Rabbit α Dig	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rat α BrdU	Diagnostic International, Karlsdorf
Sheep α Dig-FITC	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy5	FMC Rockland, Maine, USA

Reagenzien für PCR / Nicktranslation	2.1.1.1.1 Firma
Cetus-Puffer II	Roche, Mannheim
Detergenz W1	Gibco BRL, Karlsruhe
M β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Roche, Mannheim
Puffer D 5x	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.2 Medien, Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
Agarose Gel	1% Agarose in TAE Puffer	5g in 500ml TAE Puffer, in der Mikrowelle aufkochen bis die Lösung klar ist, heiß gießen
Blockierungslösung (in SSC/T)	4% BSA in 4xSSC/T	<u>50ml Ansatz:</u> 10ml 20%BSA 40ml 4xSSC/T
Blockierungslösung (inPBS/T)	5% BSA in 1xPBS/T	<u>50ml Ansatz:</u> 12,5ml 20%BSA 37,5ml 1xPBS/T
BSA-Lösung (20%)	BSA 4xSSC/T bzw 1xPBS/T	<u>100ml Ansatz:</u> 20g BSA 100ml 4xSSC/T bzw 1xPBS/T
DAPI-Färbelösung (0,05µg/ml)	DAPI-Stammlösung (500µg/ml)	5µl DAPI-Stammlösung in 50ml 4xSSC/T
Dulbecco`s Kompletmedium	MEM Dulbecco`s MEM Medium FCS Penicillin/Streptomycin	500ml RPMI 50ml FCS 5ml Penicillin/Streptomycin Vorwärmen auf 37°C
Fixativ	Methanol/Eisessig 3:1 (v:v)	immer frisch ansetzen, vor Gebrauch auf -20°C abkühlen
Formamid-Lösung (50%) in 2xSSC	Formamid 4x SSC	<u>1l Ansatz:</u> 500ml Formamid 500ml 4x SSC
Glycerin-Lösung (20%)	Glycerin 1xPBS	<u>200ml Ansatz:</u> 160ml 1xPBS 40ml Glycerin
HCl-Lösung (0,1N)	1N HCl H ₂ O _{dest}	<u>200ml Ansatz:</u> 20ml 1N HCl 180ml H ₂ O _{dest}
Hybridisierungs-Mastermix	20% Dextransulfat in 2xSSC	8g Dextransulfat in 40ml 2xSSC lösen, vortexen, mit 0,45µm Filter filtrieren
Label-ACG-Mix (2mM each)	je 100mM dATP, dCTP, dGTP	<u>500µl-Ansatz:</u> je 10µl ATP, CTP, GTP 470µl PCR-H ₂ O
LB-Medium	Pepton, Yeast extract, NaCl, H ₂ O _{dest}	<u>2l-Ansatz:</u> 2l H ₂ O _{dest} 20g Pepton 10g Yeast extract 20g NaCl auf pH-Wert 7 einstellen
NaCl-Lösung (5M)	5M NaCl	146g NaCl ad 500ml H ₂ O _{bidest}
NT-dNTP-Mix	je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	<u>1ml Ansatz:</u> je 250µl dATP, dCTP, dGTP 50µl TTP 200µl PCR-H ₂ O
NT-Puffer	1M Tris-HCl (pH 7,5) 1M MgCl ₂ BSA	<u>100ml Ansatz:</u> 50ml 1M Tris-HCl 50mg BSA 45ml H ₂ O
Paraformaldehyd-Lösung (4%)	Paraformaldehyd 1x PBS	8g des PFA-Pulvers in 200ml PBS lösen, Gefäß dabei auf 60°C (in der Hood) unter ständigem Rühren erwärmen, bis Lösung klar wird. Anschließend abkühlen

Puffer/Lösungen	Bestandteile	Anmerkungen
P1-Lösung	15mM Tris, pH=8 10mM EDTA H ₂ O _{dest}	<u>50 ml-Ansatz:</u> 0,75ml 1M Tris 1ml 0,5M EDTA 47,75ml H ₂ O _{dest} filtrieren, bei 4°C aufbewahren
P2-Lösung	0,2 N NaOH 1% SDS	<u>10ml Ansatz:</u> 2ml 1N NaOH 1ml 10% SDS 7ml H ₂ O _{dest}
P3-Lösung	3M KAc, pH=5,5 HAc bis pH erreicht ist	<u>50ml-Ansatz:</u> 14,7g KAcetate ~5,75g HAc mit H ₂ O _{dest} auffüllen
PBS-Puffer (pH 7,4)	140mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄	<u>20xPBS:</u> 320g NaCl 8g KCl 57,6g Na ₂ HPO ₄ 9,6g KH ₂ PO ₄ ad 2l H ₂ O _{bidest} mit HCl auf pH 7,4 einstellen 1x PBS Aliquots autoklavieren
RPMI Kompletmedium 1640	RPMI 1640 Medium FCS Penicillin/Streptomycin	500ml RPMI 100ml FCS 5ml Penicillin/Streptomycin
SSC-Puffer (pH 7,0)	150mM NaCl 15mM Na-Citrat	<u>20x SSC:</u> 350,6g NaCl 176,4g NaCitrat ad 2l H ₂ O _{bidest} mit NaOH pH 7,0 einstellen 4x, 2x, 0,1x SSC-Aliquots ver- dünnen und autoklavieren
SSC/T-Puffer (0,2% Tween)	4x SSC Tween 20	<u>1l Ansatz:</u> 1000ml 4x SSC 2ml Tween 20
Stop-Mix	EDTA Bromphenolblau Dextranblau	40mg Bromphenolblau 200mg Dextranblau 800µl 5M NaCl 1,6ml 0,5M EDTA 800µl 1M Tris-HCl pH 7,5
TAE-Puffer (pH 8,0)	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA	<u>50x TAE:</u> 242g Tris 18,6g EDTA 57,1ml Eisessig ad 1l H ₂ O _{bidest}
TOPRO-Färbelösung	TOPRO 1xPBS	TOPRO Stocksolution 1:1000 in 1x PBS verdünnen (Endkonzentration: 5µM), pro Slide 150µl verwenden
TritonX-Lösung (0,05%)	1x PBS TritonX100	<u>1l Ansatz:</u> 1000ml 1xPBS 500µl TritonX100
TritonX-Lösung (0,5%)	1x PBS TritonX100	<u>200ml Ansatz:</u> 199ml 1xPBS 1ml TritonX100

2.3 Geräte, optische Ausrüstung und sonstige Hilfsmittel

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

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

Hilfsmittel	Anmerkung	Hersteller
Deckgläser	12x12mm, 15x15mm, 18x18mm	Superior
Deckgläser	76x26mm	Schubert & Weiss, München
Einmal-Injektionskanülen, Dünnwand	100 Sterican® 0,90x40mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Pipetten	1ml und 3,5ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5ml, 0,5ml	Schubert & Weiss, München
Falcon Gewebekulturflaschen	50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falconröhrchen	15ml und 50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fixogum Montagekleber		Marabuwerke, Tamm
Glasflaschen	100ml, 250ml, 500ml und 1000ml	Schott

Hilfsmittel	Anmerkung	Hersteller
Küvetten	für 10 Objektträger	Schubert & Weiss, München
Objektträger	76x26mm	R. Langenbrink
Pipettenspitzen	Weiß	Molecular Bio Products
Pipettenspitzen	gelb und blau	Greiner Labortechnik
Pipettierhilfe	accu-jet® BRAND	Schubert & Weiss, München
Quadri PERM® plus	für 4 Deckgläser 76x26mm	Heraeus, Hanau
Sterilfilter	20µm / 40µm Porengröße	Satorius, Göttingen

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

Mikroskope/Zubehör	Typ	Hersteller
<u>Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop</u>	Axiovert 25 C	Zeiss, Jena
Objektive	CP Achromat x5 / 0,12 CP Achromat x10 / 0,25 Ph1 LD Achrostigmat x20 / 0,3 Ph1 Achrostigmat x40 / 0,55 Ph2	
<u>Fluoreszenzmikroskop</u>	Axiophot 2	Zeiss, Jena
Objektive	Plan-NEOFLUAR 16x / 0,5 Plan-NEOFLUAR 40x oil / 1,3 Plan-NEOFLUAR 63x oil / 1,4 Plan-NEOFLUAR 100x oil / 1,3	

Fluoreszenzfilter	DAPI (BP 365, FT 395, LP 450-490nm) FITC (BP 450-490, FT 510, LP 515-565nm) Cy3 (BP 546, FT 580, LP 590nm) Cy5 (BP 575-625, FT 645, BP 660-710nm) Triple-Filter (TBP 400/495/570, FT 410/505/585, TBP460/530/610)	
CCD-Kamera		Coolview CCD Camera System
<u>Confocales Laser- Scanning-Mikroskop</u>	Leica TCS SP2 Leica TCS SP5	Leica, Heidelberg
Objektiv	Plan-ACHROMAT 63x oil / 1,4 Cy3 (Ar-Laser 568;RSP 525; 570-650nm) Cy5 (HeNe-Laser 633; TD488/568/647; 650-750nm) FITC (Ar-Laser 488; TD488/568/647; 490-540nm) TOPRO (HeNe-Laser 633; TD488/568/647; 650-750nm) DAPI (UV 405nm)	
Floureszenzfilter		

Bildverarbeitende Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems, Inc.
Cytovision	Applied Imaging International Ltd.
Leica TCS NT	Leica
ImageJ	Public Domain by Wayne Rasband

2.4 Zellen

2.4.1 Zelltypen

2.4.1.1 Humane Lymphozyten (HLy)

Humane Lymphozyten wurden aus Vollblut verschiedener, gesunder Personen isoliert. Lymphozyten sind relativ kleine Zellen mit einem Kerndurchmesser von 6-10µm, sie sind sphärisch und besitzen sehr wenig Cytoplasma. Durch die Zugabe von einigen Tropfen Heparin-Na wurde eine Hämagglutination verhindert.

Um die Lymphozyten von den anderen Blutzellen (weitere Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten) zu trennen, kann man die Methode des Ficoll-Dichtegradienten anwenden. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte den Ficoll-Gradienten bei der Zentrifugation durchdringen, bleiben im sogenannten „buffy coat“ über der Ficollschicht die Lymphozyten und einige Monozyten übrig (Janeway 2002). Dieser kann nun abgesaugt und gereinigt werden. Lymphozyten des peripheren Bluts sind in der G₀-Phase arretiert und mussten deshalb für alle Versuche, die eine Spezifikation der Zellen in der S-Phase benötigten und für Metaphasepräparate durch Zugabe von 1% Phytohämagglutinin 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert werden. Phytohämagglutinin regt besonders die T-Zellen zur Proliferation an, welche nach 72h ca drei Zellzyklen durchlaufen haben und sich am Anfang der Mitose befinden. Dies ist wichtig für die Herstellung von Metaphasepräparate und 3D-FISH-Präparate.

Material:

- Akku Jet
- Brutschrank 37°C und 5% CO₂
- Falcontube 15ml
- Falcontube 50ml
- Falcontube mit Filter (LeucoSEP) 50ml
- FCS
- Ficoll®-Plaque
- Heparin-Na
- Kulturflasche 250ml
- Pasteurpipetten
- Phytogemagglutinin
- Pipetten 10ml
- Pipette zum Absaugen
- RPMI
- Zentrifuge

Methode:

1. pro slide 0,5-1ml frisches, heparinisiertes Blut verwenden
2. Ficoll-Plaque auf Raumtemperatur erwärmen
3. 15 ml Ficoll in LeucoSEP-Tube füllen und 30s bei 3000rpm zentrifugieren (Ficoll muß vollständig mit Filter abschließen)
4. maximal 25ml Blut in das Tube füllen und 15min bei 2000rpm zentrifugieren
5. 250ml-Kulturflasche mit 45ml RPMI + 20%FCS + 5ml Penicillin, Streptomycin vorbereiten
6. 0,4ml PHA hinzugeben (1% Endkonzentration)
7. buffy coat mit einer Pasteurpipette vorsichtig absaugen und in die Kulturflasche überführen
8. 72h bei 37°C und 5% CO₂ kultivieren
9. Zellen vorsichtig resuspendieren und in ein 50ml Falcontube überführen
10. 10 min bei 1000rpm zentrifugieren
11. Überstand abnehmen und Zellen in 50%FCS/RPMI resuspendieren (je nach Größe des Zellpellets wurden 3 bis 6ml Medium verwendet => ca 3x10⁶ Zellen/ml)

2.4.1.2 Humane Fibroblasten (HFb)

Hierbei handelt es sich um primäre humane Fibroblasten, die einer Hautstanzung entstammen (Klinikum Amsterdam, Niederlande). Die Spenderin ist eine gesunde weibliche Person. Fibroblasten wachsen im Gegensatz zu Lymphoblasten adhärent und nicht in Lösung.

2.4.2 Zellkultur

2.4.2.1 Ansetzen einer Zellkultur

Nach dem Auftauen der Zellen werden sie in Kulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt und im Inkubationsschrank kultiviert.

Material:

- AkkuJet
- Falconröhrchen, 15ml
- FCS, 100ml
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- Kulturflaschen, 50ml (25cm³)
- Medium, je nach Zelltyp:
 - Fibroblasten: DMEM
 - Lymphoblastoide Zellen: RPMI 1640 Medium
- Pipetten, 10ml
- Sterilbank
- Streptomycin/Penicillin, 5ml
- Wasserbad 37°C
- Zentrifuge

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank.

1. Medium herstellen: 500ml Medium
100ml FCS
5ml Streptomycin/Penicillin
2. Medium auf 37°C vorwärmen
3. 8ml Medium in ein 15ml Falconröhrchen geben
4. Zellen aus Kryoröhrchen direkt nach dem Auftauen dazu geben und kurz mischen
5. 10 Minuten bei 1000rpm abzentrifugieren
6. Überstand abnehmen und Zellen in 10ml neuem Medium resuspendieren
7. Zellsuspension in 50ml-Kulturflasche übertragen und für einige Tage im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ wachsen lassen.

Adhärente Zellen bilden einen konfluenten Monolayer aus, bei in Lösung wachsenden Zellen trübt sich das Medium.

2.4.2.2 Splitten einer Zellkultur

2.4.2.2.1 In Lösung wachsende Zellen

Ist das Medium der Zellen verbraucht, muß man diese splitten, das heißt, man verteilt sie auf mehrere Kulturflaschen.

Material:

- AkkuJet
- Bunsenbrenner
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- Kulturflaschen 50ml
- Pipetten 10ml
- RPMI-Komplettmedium
- Wasserbad 37°C

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank.

1. Medium auf 37°C vorwärmen
2. 15ml neues Medium in frische Kulturflasche geben
3. Zellen resuspendieren und 10ml der Zellsuspension in frische Kulturflasche geben
4. ca. 10 ml frisches Medium in „alte“ Kulturflasche geben
5. Zellen im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ wachsen lassen

2.4.2.2 Adhärent wachsende Zellen

Adhärent wachsende Zellen muß man vor dem Splitten mit dem proteolytischen Enzym Trypsin von der Oberfläche der Kulturflasche ablösen. Am Phasenkontrastmikroskop wird das Wachstum der Zellen verfolgt und sobald sich abgestorbene Zellen in Lösung befinden, wird das Medium gewechselt.

Material:

- Absaugvorrichtung mit Glaspipette
- AkkuJet
- DMEM
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- Kulturflaschen
- 1xPBS steril
- Phasenkontrastmikroskop
- Pipetten 2ml / 10ml / 25ml
- Sterilbank
- Trypsin
- Wasserbad 37°C

Methode:

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank.

1. DMEM auf 37°C vorwärmen
2. verbrauchtes Medium aus Kulturflasche entfernen
3. Fibroblasten mit 1xPBS spülen (Medium komplexiert Trypsin)
4. 2ml Trypsin zugeben und Kulturflasche für einige Minuten in den Inkubationsschrank geben
5. Am Phasenkontrastmikroskop überprüfen, ob sich die Zellen abgelöst haben, wenn nötig, Ablösen durch Klopfen an die Flasche beschleunigen
6. Zellen in 4ml neuem Medium aufnehmen um die Aktivität von Trypsin zu stoppen und resuspendieren
7. 9ml frisches Medium in neue Kulturflasche geben
8. 1ml der Zellsuspension dazu geben und im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultivieren

2.5 Herstellung von Metaphasepräparaten

2.5.1 Fixierung der Zellen

Bei der 2D-Fluoreszenz-InSitu-Hybridisierung benötigt man gespreitete Metaphasen-Chromosomen, die auf Objektträgern fixiert sind. Um diese herzustellen braucht man proliferierende Zellen, die sich in der Mitose befinden.

Dazu wurden in dieser Arbeit humane Lymphozyten stimuliert (siehe 2.4.1.1).

Um die Zellen in der Mitose zu arretieren, werden sie für 40 Minuten mit Colcemid behandelt, ein Spindelgift, welches die Ausbildung des Spindelapparates hemmt. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung von mitotischen Zellen mit kondensiertem Chromatin und aufgelöster Zellmembran.

Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und einer hypotonen Behandlung mit 0,6 M KCl unterzogen. Sie werden langsam resuspendiert und schwellen durch Osmose leicht an. Dadurch soll sichergestellt werden, daß sie beim späteren Auftropfen auf die Objektträger platzen und die Metaphasechromosomen gespreitet werden. Nun müssen die Zellen mit Fixativ (3:1 Methanol/Eisessig) fixiert werden. Durch die extreme pH-Wert-Senkung werden chromosomale Proteine zum Teil extrahiert, wodurch die DNA für FISH-Sonden zugänglicher wird. Methanol schützt die DNA vor einer Hydrierungsreaktion mit dem Acetat. Nach mehrmaliger Fixativzugabe mit anschließendem Abzentrifugieren werden die Zellen in Fixativ aufgenommen und können nun auf die Objektträger aufgetropft werden und die Qualität unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft werden.

Material:

- 0,45%ige KCl-Lösung, vorgewärmt auf 37°C
- AkkuJet
- Abzug
- Colcemid (10µg/ml)
- Falconröhrchen 15ml/50ml
- Fixativ (3:1 Methanol/Eisessig)
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- Pipetten
- Plastikeinmalpipetten
- Vortexer
- Zentrifuge

Methode:

1. Colcemidbehandlung

- 0,5 ml Colcemid zugeben, gut mischen und für 40min im Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren

2. Hypotone Behandlung

- Medium mit Zellen in ein 50ml-Falconröhrchen überführen
- 10 min bei 1000 rpm abzentrifugieren und Überstand bis auf 5 ml abnehmen
- Zellen resuspendieren und leicht mischen
- Tropfenweise 10 ml der 0,45%igen KCl-Lösung zugeben, währenddessen auf dem Vortexer mischen
- Auffüllen mit 0,45%iger KCl-Lösung auf 45 ml
- Inkubation bei 37°C für 15 – 20 min

3. Fixierung (unter dem Abzug)

- Abzentrifugieren der Zellen im hypotonen Medium für 10 min bei 1000 rpm, Überstand bis auf 5ml abnehmen
- Zellen resuspendieren und kurz vortexen
- Tropfenweise 10 ml Fixativ zugeben, währenddessen auf dem Vortexer mischen
- Auffüllen mit Fixativ auf 30 ml
- 10 min zentrifugieren bei 1000 rpm, Überstand bis auf 5ml abnehmen
- Zellen resuspendieren und leicht mischen
- Wiederholen der Fixierungsschritte: 2 mal
- Überführen der Zellsuspension in ein 15 ml Falconröhrchen
- Wiederholen der Fixierungsschritte: bis zu 8 mal

2.5.2 Auftropfen der Zellen (Deng-Methode)

Die Zellen werden nun auf trockene Objektträger aufgetropft und in eine Metallbox gegeben. Um eine möglichst gute Spreitung der Metaphasen zu erreichen gibt man die Metallbox ohne Deckel in ein Wasserbad mit 50°C. Durch diesen Temperaturunterschied und die hohe Luftfeuchtigkeit werden die Metaphasen gespreitet (Deng, Tsao et al. 2003).

Material:

- 11x13 cm Metalbox
- Phasenkontrastmikroskop
- Plastikpipette
- Saubere Objektträger
- Wasserbad 50°C mit 3cm Abstand zwischen Wasseroberfläche und Deckel

Methode:

1. Objektträger in Metalbox geben
2. Zellsuspension aus ca 1 cm Höhe auf den Objektträger auftropfen
3. Metallbox ins Wasserbad geben
4. Wasserbad schnell schließen

5. nach ca 1 min Objektträger herausnehmen und unter dem Phasenkontrastmikroskop die Spreitung und Dichte der Metaphasen überprüfen

2.5.3 Pepsinieren und Alterung von Metaphase-Präparaten

Um bei der 2D-FISH gute Ergebnisse zu erzielen, müssen die Metaphase-Präparate von Cytoplasmaresten befreit werden. Hierzu inkubiert man die Präparate mit Pepsin. Anschließend werden sie durch eine steigende Ethanolreihe von Fixativ- und Pepsinresten befreit. Um eine schnellere Alterung der Metaphasen zu erreichen, werden sie für 2-3 Stunden bei 60°C gebacken.

Material:

- 0,01M HCl, vorgewärmt auf 37°C
- Ethanol 70%/90%/100%ig
- Ofen 60°C
- 1xPBS
- Pepsinstocklösung 10%ig
- Wasserbad 37°C

Methode:

1. in 100ml der 0.01M HCl 50µl Pepsin geben
2. Objektträger 10 min bei 37°C in Pepsin-Lösung inkubieren
3. Objektträger 10 min in 70%igen Ethanol stellen, dann in 90%igen und anschließend durch 100%igen Ethanol ziehen und bei Raumtemperatur trocknen lassen
4. Backen der Präparate bei 60°C für 2-3 Stunden

Nun können die Präparate für mehrere Monate bei -20°C in einer trockenen Box aufbewahrt werden.

2.6 Fixierung der Zellen für die 3D-Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Für die 3D-FISH müssen die Zellen möglichst schonend auf Objektträger fixiert werden, um die natürliche Anordnung im Zellkern nicht zu beeinflussen.

Je nach Zelltyp werden unterschiedliche Methoden angewandt.

2.6.1 Ki67-Detektion

Um Zellen in der G₀-Phase eindeutig zu bestimmen, wurde das Kernprotein pKi67, das nur in zyklierenden Zellen vorhanden ist, immunocytochemisch nachgewiesen. Zellen in der G₀-Phase sind Ki67-negativ (siehe Abschnitt 3.3).

2.6.2 In Lösung wachsende Zellen

In Lösung wachsende Zellen müssen auf mit Polylysin beschichtete Deckgläser aufgetragen werden, damit sie haften bleiben. Anschließend werden die Zellen einer hypotonen Behandlung mit 0,3x PBS unterzogen, um eine Schrumpfung der Zellkerne während der 3D-FISH zu kompensieren. Die eigentliche Fixierung erfolgt mit 4% Paraformaldehyd. Durch die nachfolgenden Schritte werden die Kerne für Sonden-DNA und Antikörper zugänglicher gemacht. Das TritonX-100 permeabilisiert die Kernmembran, indem es Transmembranproteine und Phospholipide herauslöst. Es bindet an membrandurchdringende Segmente des Proteins und bringt es in Lösung (Alberts 2002). Durch Inkubation in Glycerin werden die Lipide der Membran angegriffen. Danach werden die Präparate mehrfach in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Zum Schluß denaturiert man die Präparate mit 0,1N HCl, wobei weitere störende Proteine entfernt werden. Aufbewahrt und gealtert werden die Präparate in 50% Formamid / 2x SSC (Solovei, Cavallo et al. 2002).

Material:

- AkkuJet
- BrdU 50mM
- Deckgläser 26 x 76mm (ein Ende mit Flußsäure geätzt)
- Ethanol/Ether
- Falconröhrchen 50ml
- 50% Formamid in 2x SSC
- Glasküvetten
- 20% Glycerin in 1x PBS
- 0,1N HCl
- H₂O bidest
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- 4% Paraformaldehyd in 0,3x PBS
- 0,3x PBS
- 1x PBS
- Phasenkontrastmikroskop
- Pipetten
- Polylysin-Hydrobromid (1mg/ml)
- Quadriperm
- RPMI + 50%FCS (37°C)
- 2x SSC

- Stickstoff, flüssig
- 0,05 TritonX-100 in 1x PBS
- 0,5 TritonX-100 in 1x PBS

Methode:

1. geätzte Deckgläser aus Ethanol/Ether nehmen und trocknen
2. 1,5 cm vom unteren Rand entfernt 300µl Polylysin auftragen und 1 Stunde bei RT inkubieren
3. kurz in H₂O bidest spülen, aufrecht hinstellen und lufttrocknen lassen
4. 20µl BrdU-Lösung pro 10ml Zellsuspension dazugeben und 20min bei 37°C inkubieren
5. Zellen aus Kulturflasche in ein 50ml Falconröhrchen geben und 10min bei 1000rpm zentrifugieren
6. Überstand abnehmen und Pellet in 2ml (je nach Pelletgröße auch mehr oder weniger) RPMI + 50% FCS resuspendieren
7. 300µl der Zellsuspension auf die mit Polylysin behandelte Fläche geben
8. 40min in den Inkubationsschrank bei 37°C und 5% CO₂ geben und anschließend unter dem Phasenkontrastmikroskop prüfen, ob die Zellen sich abgesetzt haben
9. Zellsuspension abtropfen lassen
10. Deckgläser 3x kurz in 1x PBS schwenken und in letzter Küvette sortieren
11. exakt eine Minute in 0,3x PBS geben
12. 10min in 4% Paraformaldehyd in 0,3x PBS fixieren und während der letzten 2min 0,5% TritonX-100 in 1x PBS auftropfen (verhindert das Austrocknen der Zellen)
13. 3 x 5min in 0,05% TritonX-100-Lösung waschen
14. 20 min in 0,5% TritonX-100-Lösung bei RT inkubieren
15. Deckgläser direkt in 20% Glycerin in 1x PBS überführen und mindestens 30 min bei RT stehen lassen (am besten über Nacht)
16. Gefrieren in flüssigem Stickstoff ⇒ auftauen lassen ⇒ in 20% Glycerin tauchen ⇒ 4x wiederholen
17. 3 x 5 min in 0,05% TritonX-100-Lösung waschen
18. Küvette kurz mit 0,1N HCl ausspülen und anschließend exakt 5 min bei RT in 0,1 N HCl stehen lassen
19. zweimal kurz mit 2x SSC waschen
20. in 50% Formamid in 2x SSC für mindestens 30 min stehen lassen (besser mehre Tage)

2.6.3 Adhärenz wachsende Zellen

Adhärenz wachsende Zellen müssen nicht über Polylysin auf die Deckgläser aufgebracht werden. Man kann sie direkt darauf kultivieren, bis sie konfluent gewachsen sind. Eine hypotone Behandlung ist aufgrund ihrer ellipsoiden, flachen Form unnötig. Man kann sie deshalb direkt mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS fixieren. Die restlichen Schritte erfolgen analog der Fixierung von in Lösung wachsenden Zellen.

Material:

- AkkuJet
- 76 x 26 Deckgläser
- BrdU 50mM
- DMEM
- Inkubationsschrank 37°C / 5% CO₂
- Phasenkontrastmikroskop
- Pipetten
- Quadriperms
- Sterilbank
- Wasserbad 37°C

Methode:

Die Kultivierung der Zellen erfolgt wie in 2.4.2 beschrieben wurde. Nach dem Ablösen mit Trypsin werden die Zellen mit frischem DMEM aufgenommen, auf Deckgläser gegeben und wachsen gelassen.

1. Abgelöste Zellen mit DMEM aufnehmen (⇒ 3ml pro Deckglas)
2. gut mischen
3. Deckgläser in Quadriperms geben und mit 3ml DMEM beschichten
4. 3ml der Zellsuspension dazugeben
5. Inkubation bei 37°C und 5% CO₂
6. Medium wechseln:
 - Medium absaugen
 - 2x mit 1x PBS waschen
 - 4ml neues Medium auftragen
7. 40 min vor dem Fixieren BrdU hinzugeben: 20 µl / 10ml Medium
8. Zellen fixieren wie in 2.4.2 ab Schritt 9 beschrieben

2.7 Sonden

Die paint-Sonden für das humane X-Chromosom waren bereits im Labor etabliert und mussten nicht extra amplifiziert werden. Die verwendeten BAC-Sonden, die das gesamte humane X-Chromosom umfassen wurden von Rogier Versteeg (AMC Amsterdam) ausgewählt, die DNA mittels BAC-MiniPrep gewonnen, und im Rahmen des EU-Projekts *3DGenome* freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.7.1 Bestimmung der Eigenschaften der BAC-Klone

Um die BACs hinsichtlich ihrer enthaltenen Gene und somit ihrem Expressionslevel sowie der Gendichte und der Bandenzugehörigkeit zuordnen zu können, muss zunächst eine Datenbankrecherche durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurden die Datenbanken UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verwendet um die BACs zu lokalisieren, die enthaltenen Gene zu bestimmen und die Gendichteumgebung zu definieren. Das Expressionslevel der Gene auf den BACs wurde anhand eines Affymetrixchips, der freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Speicher zur Verfügung gestellt wurde ermittelt (<http://www.affymetrix.com/index.affx>).

Alle in dieser Arbeit verwendeten BAC-Klone und ihre Eigenschaften sind in einer Tabelle im Anhang aufgelistet.

2.7.1.1 Bestimmung der Lokalisation der BACs anhand UCSC

Auf der Startseite von UCSC wird zunächst die Option „Genome Browser“ ausgewählt. In dem sich öffnendem Fenster (siehe Abb.11) gibt man nun die gewünschte Spezies und die Bezeichnung des gesuchten BAC-Klons ein.

clade	genome	assembly	position or search term	image width	
Vertebrate	Human	Mar. 2006	RP11-268019	620	submit

[Click here to reset](#) the browser user interface settings to their defaults.

add custom tracks configure tracks and display clear position

Abbildung 11: Startseite UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>)

Nach Drücken des „Submit“-Buttons erscheint ein neues Fenster (siehe Abb.12) mit Information zu dem gesuchten BAC-Klon.

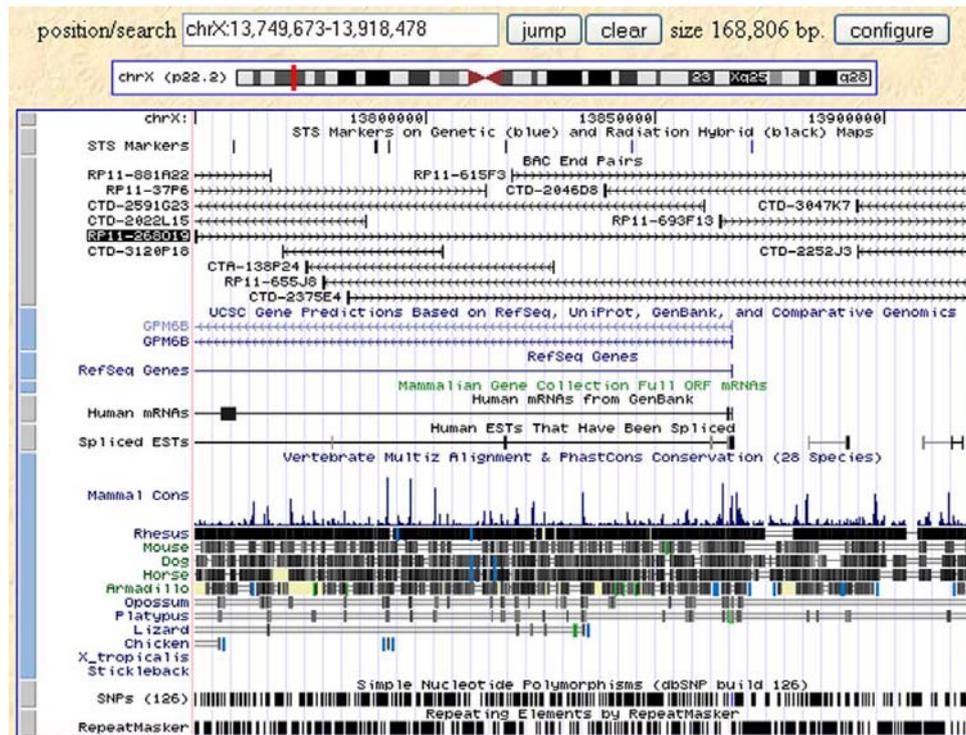


Abbildung 12: UCSC-Suchergebnis-Darstellung

Man notiert sich nun die genauen Basenpaar-Start- und Endpunkte des BAC-Klons.

2.7.1.2 Bestimmung der Eigenschaften der BAC-Klone

2.7.1.2.1 Enthaltene Gene und deren Expressionsprofil

Auf der Startseite von NCBI wählt man zunächst die Funktion „Map Viewer“ und anschließend die gewünschte Spezies, in diesem Fall *Homo sapiens*, und das gewünschte Chromosom, hier das X aus. Nun erhält man eine Übersicht über das gesamte Chromosom. Anhand der Funktion „Maps & Options“ kann man nun wählen, was angezeigt werden soll. In diesem Fall wurde die Option „Gene“ gewählt. Anschließend gibt man bei „Region shown“ die zuvor bei UCSC erhaltenen Basenpaar-Start- und Endpunkte ein, und bekommt nun genau diesen Bereich mit allen enthaltenen Genen angezeigt (siehe Abb.13). Diese werden ebenfalls in einer Liste notiert.

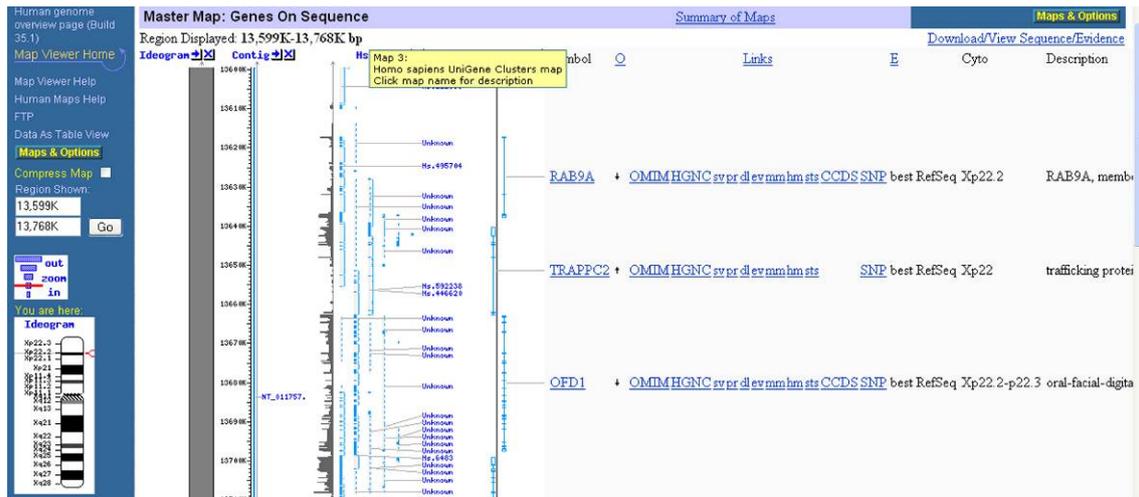


Abbildung 13: NCBI-Suchergebnis-Darstellung

Um nun das Expressionsprofil eines Gens in einer bestimmten Zelllinie zu bestimmen, braucht man die Daten eines Expressionsprofils, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Speicher zur Verfügung gestellt wurden. Erstellt wurde dieses Expressionsprofils anhand des GeneChips U133A der Firma Affymetrix. Auf der Homepage <http://www.affymetrix.com/index.affx> wählt man zunächst „Netaffx“ und anschließend „Netaffx Analysis Center“, wofür eine Registrierung auf der Homepage notwendig ist. Nun kann man wählen, welche Informationen man erhalten möchte. Man wählt unter dem Punkt „Expression“ „Search all available information in the database for a particular term or identifier“ aus und klickt auf „Begin“. In der nun erscheinenden Suchmaske wird zunächst der gewünschte Chip ausgewählt und das gesuchte Gen eingegeben. Nach erfolgreicher Suche bekommt man nun eine Probe Set ID-Nummer, die man nun in den Datentabellen des Expressionsprofils sucht und somit Intensitätswerte für die jeweilige Expression in der bestimmten Zelllinie bekommt.

2.7.1.2.2 Gendichteumgebung der BAC-Klone

Um die Gendichte in der Umgebung der BACs zu ermitteln wurde die Datenbank NCBI verwendet. Auf der Startseite der Homepage wählt man zunächst den „Map Viewer“ aus und anschließend den gewünschten Organismus, in diesem Fall *Homo sapiens*. Nun erreicht man eine Seite, auf der alle menschlichen Chromosomen aufgelistet sind. Hier wählt man das gewünschte Chromosom durch Mausklick aus und erhält dadurch eine Übersicht über das gesamte Chromosom. Jetzt berechnet man anhand der vorher gesuchten Position des jeweiligen BAC-Klons den Mittelpunkt und addiert bzw. subtrahiert 1 Mb (für das 2 Mb-Gendichtefenster) oder 5 Mb (für das 10 Mb-Gendichtefenster) und gibt die jeweiligen Werte in das

Suchfenster ein. Nun erhält man eine Liste unter dem Punkt „Genes on Sequence“, die alle in diesem Bereich enthaltenen Gene aufzeigt.

2.7.2 Amplifikation der Sonden-DNA

Die Sonden-DNA liegt meist nur in einer geringen Menge vor und muß deshalb vervielfältigt werden. Dies lässt sich mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erreichen. Sie eignet sich besonders um kurze Genomabschnitte zu amplifizieren.

Das grundlegende Prinzip der PCR-Methode ist die vielfache Wiederholung eines Teilschritts, bei der eine Kopie der beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge synthetisiert wird. Da jeder Reaktionsschritt neue identische Matrizen-DNA erzeugt, steigt die Kopienzahl entsprechend einer Kettenreaktion exponentiell an.

Die Reaktion beginnt mit einem DNA-Strang, der bei 94°C denaturiert wird. Schon vor der Denaturierung gibt man zwei Oligonukleotide (Primer) hinzu, deren Sequenz so gewählt wird, daß der eine Primer an den einen DNA-Strang hybridisiert und der andere antiparallel an den anderen. Sie müssen das zu amplifizierende DNA-Stück eingrenzen. Nach der Denaturierung wird der Reaktionsansatz abgekühlt und die Primer können binden (Annealing). Durch die Zugabe von Taq-Polymerase (Temperaturoptimum zwischen 72°C und 80°C) und allen vier dNTPs findet eine Primerverlängerung statt. Nun liegen insgesamt zwei partiell doppelsträngige DNA-Stränge vor. Dieser Vorgang wird mehrere Male wiederholt und somit steigt die Anzahl der neusynthetisierten DNA-Stränge exponentiell an. Nach 25 Zyklen wären das zum Beispiel 4×10^6 Kopien.

Die Länge und Konzentration der Amplifikate kann in einem 1%igen Agarose-Gel bestimmt werden, auf das man neben der Sonden-DNA auch einen Längenmarker in einer bestimmten DNA-Konzentration aufträgt. Hier wurde jeweils 1µg Lambda/HindIII-Marker verwendet. Das Restriktionsenzym HindIII erzeugt Lambda-Fragmente definierter Länge, die im Gel bestimmte Banden ergeben.

2.7.2.1 Amplifikation über DOP-PCR

Bei der DOP-PCR braucht man keine spezifischen Primer, da von der zu amplifizierenden DNA nur das gewünschte Stück vorliegt. Die DOP-PCR-Primer sind partiell degenerierte Oligonukleotid-Primer, deren Sequenzen nur am 3'- und 5'-Ende übereinstimmen. Dazwischen sind zufällige Nukleotidabfolgen eingebaut, die bei niedriger Stringenz an möglichst viele Sequenzkombinationen binden können. Dabei kommt es anfangs allerdings zu einem mismatch von Basenpaaren, was aber toleriert wird. Später wird mit hoher Stringenz fortgefahren. Für dieses Primerannealing sind nun die spezifischen Enden der Primer wichtig. Die Temperatur wird während dieser Phase so stark erhöht, dass nur eine exakte Bindung des Primers an den Primer des vorherigen Zyklus erhalten bleibt.

Diese Methode der DNA-Amplifikation wurde für alle paint-Sonden verwendet. In dieser Arbeit wurde der 6MW-DOP-Primer der Firma Biotech GmbH verwendet. Er beinhaltet folgende Sequenz:

5` CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3` (N= zufällige Nukleotidabfolge)

Material:

- DNA
- dNTP-Mix (je 5mM dATP / dCTP / dGTP und 2mM dTTP)
- Eppendorf-Tube 0,5ml
- H₂O bidest
- 6MW-Primer (17µM)
- Puffer 10x
- Taq-Polymerase (2,5U/µl)
- Thermocycler

Methode:

1. Reaktionsgemisch in Eppendorf-Tube ansetzen:
 - 10 µl Puffer
 - 10 µl 6MW-Primer
 - 4 µl dNTP-Mix
 - 74 µl H₂O bidest
 - 1 µl DNA
 - 1 µl Taq-Polymerase
2. Eppendorf-Tube in Thermocycler geben
3. PCR nach folgendem Programm laufen lassen:

Programm	Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
#1	1	Start-Denaturierung	96°C	3min
#10	8	Denaturierung	94°C	1min
		Primer-Annealing	30°C	90s
		Extension	72°C	2min
#11	35	Denaturierung	94°C	1min
		Primer-Annealing	56°C	1min
		Extension	72°C	2min
#4	1	Schluß-Extension	72°C	5min

4. Fragmentlänge auf 1%igem Agarose-Gel überprüfen

Die erhaltenen Amplifikate können ihrerseits in weiteren PCR-Durchgängen vervielfältigt werden. Die niederstringenten Zyklen können hierfür weggelassen werden, da die Oligonukleotid-Primer schon an den Enden gebunden haben.

2.7.2.2 Amplifikation über GenomiPhi (*Whole Genome Amplification*)

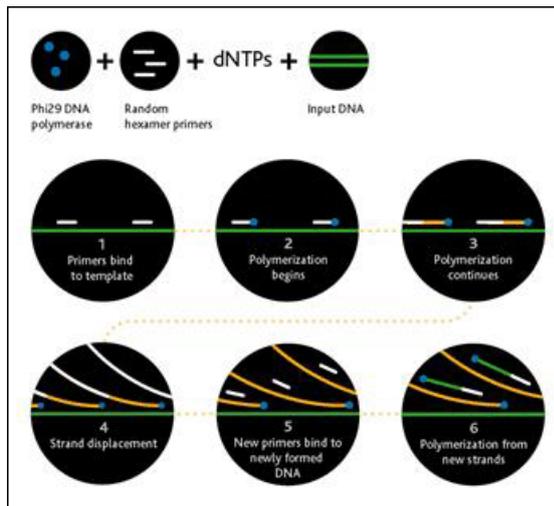


Abbildung 14: Funktionsweise von GenomiPhi (aus www1.gelifesciences.com)

GenomiPhi ist eine neuartige Methode, um DNA zu amplifizieren. Sie basiert auf einer bestimmten DNA-Polymerase, die aus dem *Bacillus subtilis* Phagen Phi29 gewonnen wird. Sie amplifiziert DNA exponentiell durch eine isotherme *strand displacement*-Reaktion und ist zudem noch sehr akkurat, da sie über eine proofreading-Aktivität verfügt (Dean, Nelson et al. 2001). Nachdem *Random hexamer*-Primer an verschiedene Stellen der Ausgangs-DNA

binden, kann die Phi29 DNA-Polymerase die Replikation an diesen verschiedenen Stellen der Ausgangs-DNA gleichzeitig initiieren,

wodurch strangabwärts neue einzelsträngige DNA synthetisiert wird, an diese wieder random hexamer-Primer binden können (siehe Abb.14). So wird aus einer geringen Menge Ausgangs-DNA (< 1µg) eine große Menge DNA synthetisiert (4-7 µg).

Diese Methode der DNA-Amplifikation wurde bei allen BACs und BAC-Pools verwendet.

Hierfür wurden pro BAC 3µl der Original-DNA (DNA-Konzentration ca 80ng/µl) in den Pool gegeben (maximale BAC-Anzahl:15) und die resultierende Menge von 45µl DNA anschließend auf ca 5µl eingedampft. Davon wurde nun 1µl in die GenomiPhi-Reaktion eingesetzt.

Material:

- DNA (<1 µg)
- GenomiPhi Amplification Kit (enthält GenomiPhi Sample Buffer, GenomiPhi Reaction Buffer, GenomiPhi Enzyme Mix)
- Eis
- PCR-Maschine
- PCR-Tubes (0.5 ml)
- 1%iges Agarosegel

Methode:

1. 1 µl DNA zusammen mit 9 µl GenomiPhi Sample Buffer in ein PCR-Tube pipettieren (steril arbeiten!)
2. 3 min bei 95°C in der PCR-Maschine denaturieren und anschließend auf Eis abkühlen lassen
3. zügig 9 µl GenomiPhi Reaction Buffer und 1 µl GenomiPhi Enzyme Mix dazupipettieren
4. 16 – 18 h bei 30°C in der PCR-Maschine inkubieren

5. 10 min bei 65°C inkubieren, um die Phi29 Polymerase zu inaktivieren
6. Fragmentlänge auf einem 1%igen Agarosegel überprüfen (siehe Abb.15)

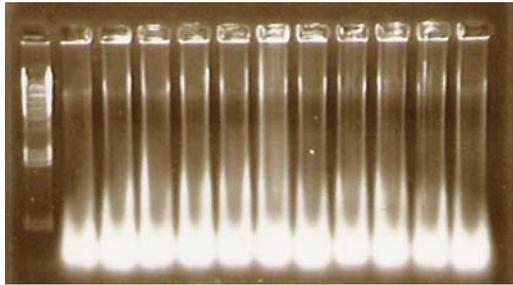


Abbildung 15: Gelbild nach einer GenomiPhi-Reaktion

Spur 1: λ -Marker, Spur 2-12: BAC-Pools nach GenomiPhi-Amplifikation

2.7.3 Markierung der Sonden-DNA

Damit man die Sonden-DNA nach ihrer Hybridisierung an die Ziel-DNA von dieser unterscheiden kann, muß man sie vorher markieren. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder man markiert die Sonden durch direkten Einbau von fluorochromgekoppelten dUTPs oder durch den Einbau von Haptenen, die an das Thymidinanalogon binden und dann mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Um in Interphasekerne eindringen zu können, sollte die Sonde eine Länge zwischen 300 bp und 700 bp haben. Dies kann man nach der Markierung auf einem 1%igen Agarosegel nachprüfen. Ist die Sonde zu lang, wird sie mit DNaseI nachverdaut.

2.7.3.1 Markierung durch DOP-PCR

Mit Hilfe dieser Label-DOP-PCR kann man Amplifikate, die zuvor durch DOP-PCR amplifiziert wurden mit Haptenen wie Biotin, Digoxigenin und DNP oder Fluorochromen wie FITC, TAMRA, TexasRed, Cy5 oder Cy3 markieren. Diese liegen im Reaktionsgemisch in Form von veränderten dUTPs vor und werden statt Thymidin in die DNA eingebaut. Das PCR-Programm ist im Wesentlichen das Gleiche wie bei der DOP-PCR, allerdings mit kürzerer Primerextension, damit kleinere Amplifikate von weniger als 1000 bp Länge entstehen. Außerdem werden die Sonden hierbei nicht nur markiert sondern auch verlängert. Man kann also auch eine sehr geringe Menge an Sonden-DNA markieren.

Diese Methode der DNA-Markierung wurde bei den paint-Sonden für das humane X-Chromosom angewendet, die vorher durch DOP-PCR amplifiziert wurden.

Material:

- DNA
- dNTP-Mix (je 5 mM)
- dUTP, modifiziert
- Eppendorf-Tube 0,5ml
- H₂O bidest
- 6MW-Primer (17 μ M)
- Puffer 10x

- Taq-Polymerase (2,5U/µl)
- Thermocycler

Methode:

1. Reaktionsgemisch in Eppendorf-Tube ansetzen:
 - 10 µl Puffer
 - 10 µl 6MW-Primer
 - 4 µl dNTP-Mix
 - 4 µl des modifizierten dUTPs
 - 70 µl H₂O bidest
 - 1 µl DNA
 - 1 µl Taq-Polymerase
2. Eppendorf-Tube in Thermocycler geben
3. PCR nach folgendem Programm laufen lassen:

Programm	Zyklen	Schritt	Temperatur	Dauer
#1	1	Start-Denaturierung	96°C	3min
#14	35	Denaturierung	94°C	1min
		Primer-Annealing	56°C	1min
		Extension	72°C	30sec
#4	1	Schluß-Extension	72°C	5min

4. Fragmentlänge auf 1%igem Agarose-Gel überprüfen

2.7.3.2 Markierung durch Nicktranslation

Die zweite Möglichkeit, DNA zu markieren, ist die Nicktranslation. Diese Methode ist besonders dazu geeignet, kleine DNA-Sonden, wie Plasmide und Cosmide zu markieren. Hierbei wird die DNA mit einer begrenzten Menge der Endonuclease DNaseI inkubiert. Diese bewirkt Einzelstrangbrüche, sogenannte „nicks“ in der DNA. Auch kommt es zu Doppelstrangbrüchen, wodurch sich die Länge der DNA-Fragmente verkürzt. Das Enzym DNA-Polymerase I erkennt nun freie 5'-Enden an den nicks und hydrolysiert von diesen ausgehend, aufgrund seiner Exonuclease-Aktivität den Einzelstrang in 3'-Richtung. Die Polymeraseaktivität dieses Enzyms verlängert den Einzelstrang mit den zugegebenen dNTPs und den modifizierten dUTPs an der 3'-Seite komplementär zum verbliebenen Strang. Die Reaktion muß nach 90 Minuten rechtzeitig gestoppt werden, da sonst zu viele Doppelstrangbrüche entstehen und die Fragmente zu klein werden würden.

Hierbei wird die DNA, im Gegensatz zur Label-DOP-PCR nicht gleichzeitig amplifiziert.

Diese Methode der DNA-Markierung wurde bei allen BACs und BAC-Pools, die zuvor mit GenomiPhi amplifiziert wurden, angewendet.

Material:

- DNaseI (1:250 verdünnt mit H₂O bidest)
- dNTP-Mix
- Eppendorf-Tubes 1,5ml
- Hapten- bzw. Fluorochrom-modifiziertes dUTP
- H₂O bidest
- β-Mercaptoethanol (0,1M)
- 10x NT-Puffer
- PolymeraseI
- Stopmischung
- Wasserbad 15°C

Methode:

1. Reaktionsgemisch auf Eis ansetzen:
 - x µl DNA (2 µg auf 100µl Ansatz)
 - 10 µl NT-Puffer
 - 10 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
 - 10 µl dNTP-Mix
 - 2 µl des modifizierten dUTPs
 - 2 µl DNaseI
 - 2 µl PolymeraseI⇒ ad 100 µl H₂O bidest
2. 90 min bei 15°C im Wasserbad verdauen lassen
3. Reaktionen auf Eis stellen, um den Verdau zu stoppen
4. Länge der Fragmente auf 1%igem Agarose-Gel testen (siehe Abb.16)
5. falls Fragmente zu lang ⇒ Nachverdau 20 min bei RT mit 1 µl DNaseI (1:250) verdünnt mit H₂O bidest
6. Länge der Fragmente auf 1%igem Agarose-Gel testen (siehe Abb.17)
7. Reaktion stoppen durch Zugabe des gleichen Volumens an Stopmischung

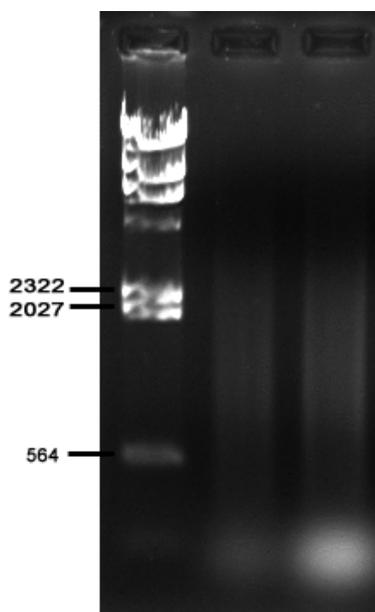


Abbildung 16: Gelfoto nach Nicktranslation

Prinzip: 5g Agarose in 500ml TAE-Puffer in Mikrowelle kochen, bis Lösung klar ist, etwas abkühlen lassen, in Gelkammer mit Kämmen gießen, aushärten lassen, Kämmen entfernen, Gelkammer mit TAE-Puffer auffüllen, Marker und Proben in Taschen auftragen. Elektrische Auftrennung der Fragmente bei 120V bis Farbbande ca 2/3 der Strecke gelaufen ist. Färbung mit Ethidiumbromid 15min, Waschen in H₂O 10min. Anschließend in Transilluminator ein Foto aufnehmen
Spur1: Längenmarker
Spur2/3: Produkte der Nicktranslation

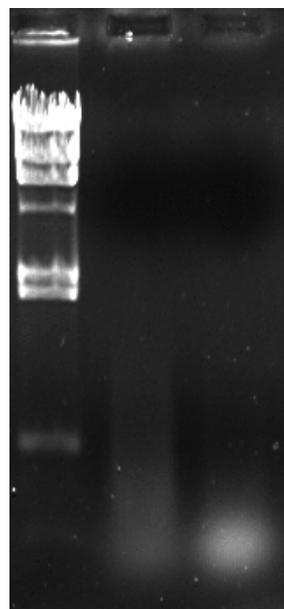


Abbildung 17: Gelfoto nach Verdau

Spur 1: Längenmarker
Spur 2/3: Verdau der durch Nicktranslation markierten DNAs aus Abb.2.1

2.7.3.3 Ethanolfällung für FISH

Bevor die markierte Sonden-DNA hybridisiert werden kann, reinigt man sie durch eine Ethanolfällung auf. Salmon Sperm DNA dient für eine bessere Ausfällung, da sie eine reine Träger-DNA ist. Nach dem Ausfällen wird die DNA abzentrifugiert, im Vakuum getrocknet und das Pellet in Formamid resuspendiert. Dadurch sinkt die Denaturierungstemperatur. Um das Volumen zu vergrößern ohne die DNA-Konzentration zu verändern, gibt man Dextransulfat hinzu.

Material:

- Bluestain
- Cot-1-DNA
- Ethanol (100%)
- Formamid (100%)
- Gefrierschrank -20°C
- Mastermix (20% Dextransulfat in 2x SSC)
- Salmon Sperm DNA
- markierte Sonden DNA (in 10 μl Hybridisierungsmix ~ 250 ng DNA)
- Thermoschüttler 42°C
- Vakuumzentrifuge
- Zentrifuge

Methode:

1. markierte Sonden-DNA je nach Konzentration zugeben
2. Cot1-DNA zur Absättigung repetitiver Sequenzen in 20 – 50fachem Überschuß zugeben
3. 2 μl Salmon Sperm DNA zugeben
4. eventuell 1 μl Bluestain hinzugeben, um Pellet leichter sichtbar zu machen
5. 2,5fache Menge an 100% Ethanol hinzugeben ($[\text{Sonden}+\text{SS}+\text{Cot1}]\times 2,5$)
6. für mindestens 30min bei -20°C in den Gefrierschrank geben (Fällung)
7. 20min bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand vorsichtig abnehmen
8. Pellet in Vakuumzentrifuge trocknen lassen
9. 5 μl Formamid hinzugeben und auf dem Thermoschüttler bei 42°C resuspendieren (große BAC-Pools über Nacht resuspendieren)
10. 5 μl Mastermix hinzugeben und vortexen

Fertige Hybridisierungsmixe können bei -20°C im Gefrierschrank mehrere Monate gelagert werden.

2.8 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

2.8.1 Prinzip

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung macht man sich die Eigenschaft einzelsträngiger DNA, sich mit ihrem komplementären Gegenstrang zu binden, zu nutze. Der komplementäre Gegenstrang (Sonde) ist mit Fluorochromen oder Haptenen markiert. Somit kann man eine spezielle Ziel-DNA nachweisen. Damit gelingt es, „...auch kleinste Chromosomenabschnitte bis hin zu einzelnen Genen in der Metaphase und im Interphasekern spezifisch zu markieren“ (Murken 1996).

Die Sonden-DNA kann aus gesamtgenomischer DNA gewonnen werden oder aus Bakterien, die einen Vektor mit einem speziellen DNA-Teilstück enthalten, isoliert werden. Anschließend muss sie mittels Label-DOP-PCR oder Nicktranslation markiert werden (Prinzip siehe 2.7.3.1 /2.7.3.2), durch Ethanol-fällung aufgereinigt und in einem Hybridisierungsmix gelöst werden (siehe 2.7.3.3).

Bevor die Sonde an die Ziel-DNA binden kann, müssen beide durch Erhitzen denaturiert werden. Anschließend wird das Präparat bei 37°C einige Zeit inkubiert, damit die beiden DNA-Stränge aneinander binden können.

Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wäscht man das Präparat unter stringenten Bedingungen mit 0,1x SSC bei 62°C. Somit erreicht man, dass nur die gewünschten Bereiche der DNA angefärbt werden. Direkt markierte Sonden kann man gleich unter dem Epifluoreszenzmikroskop überprüfen, indirekt durch Haptene markierte Sonden müssen erst durch Antikörper, die mit Fluorochromen gekoppelt sind, sichtbar gemacht werden.

2.8.2 Chromosomen in situ Suppression (CISS)

Da im menschlichen Genom neben den für das jeweilige Chromosom spezifischen DNA-Sequenzen viele repetitive Sequenzen, sogenannte LINEs, SINEs oder Satelliten-DNA vorliegen, die nach der Hybridisierung mit markierter Sonden-DNA überall unspezifische Signale geben würden, hybridisiert man mit unmarkierter C₀t1-DNA vor. C₀t1-DNA ist eine Fraktion all dieser repetitiven Sequenzen und sättigt diese unter Renaturierungsbedingungen ab, während die meisten spezifischen Sonden-Sequenzen einzelsträngig bleiben (Murken 1996).

2.8.3 2D-FISH

Hier hybridisiert man die Sonden-DNA auf Metaphase-Chromosomen. Zur Herstellung dieser Präparate siehe Abschnitt 2.5.

Material:

Denaturierung und Hybridisierung:

- Deckgläser (12x12mm / 15x15mm)
- Fixogum
- Hotblock 75°C
- Hybridisierungsmix
- Metallbox
- Metaphasepräparate
- Phasenkontrastmikroskop
- Pinzette
- Wasserbad 37°C

Waschen und Detektion:

- Lichtschutz für Küvette
- Antikörper (je nach Detektionsschema)
- BSA-Blocklösung (4% BSA in 4x SSC/T)
- DAPI-Lösung (5 µg/ml)
- Deckglas 24x50mm
- Feuchte Kammer
- Glasküvette
- Nagellack
- Pinzette
- Schüttler in 37°C Wärmekammer
- Vectashield
- Waschlösungen (2x SSC 37°C, 0,1x SSC 62°C, 4x SSC/T 37°C)
- Wasserbäder 37°C, 62°C
- Wasser destilliert

Methode:

1. Metaphasepräparate auftauen lassen und unter dem Phasenkontrastmikroskop geeignete Areale mit vielen guten Metaphasen suchen
2. je nach Größe des Areals zwischen 2 µl und 5 µl Hybridisierungsmix auftragen
3. mit einem passenden Deckglas vorsichtig (mit der Pinzette) verschließen und mit Fixogum versiegeln
4. Fixogum an einem dunklen Ort vollständig trocknen lassen (wirft sonst auf dem Hotblock Blasen und ist nicht mehr dicht)
5. Präparate für 2min bei 75°C auf dem Hotblock denaturieren
6. Inkubation über Nacht in Metallbox bei 37°C im Wasserbad
7. Fixogum und Deckglas vorsichtig mit einer Pinzette entfernen
8. Waschschritte:

- 3x 5 min in 2x SSC bei 37°C auf dem Schüttler waschen (direkt markierte Sonden unter eine Abdeckung stellen und anschließend mit Schritt 14 weitermachen)
 - 2x 5 min in 0,1x SSC bei 62°C waschen
 - kurz in 4x SSC/T geben
9. 10 min mit BSA-Blocklösung blocken
10. Detektion erster Layer:
- Antikörperversdünung herstellen mit BSA-Blocklösung
 - 200 µl der Antikörperversdünung auf den Objektträger geben (in feuchter dunkler Kammer)
 - 30 – 40 min inkubieren
11. Antikörper durch 3x 5 min Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen (Abdunkeln)
12. Detektion zweiter Layer
- Antikörperversdünung herstellen mit BSA-Blocklösung
 - 200 µl der Antikörperversdünung auf den Objektträger geben (in feuchter dunkler Kammer)
 - 30 – 40 min inkubieren
13. Antikörper durch 3x 5 min Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen (Abdunkeln)
14. DAPI-Gegenfärbung:
- DAPI-Lösung herstellen: 1:100-Verdünung in 4x SSC/T
 - 200 µl der DAPI-Lösung auf den Objektträger geben (in feuchter dunkler Kammer)
 - 2 min inkubieren lassen
 - unter destilliertem Wasser gut abspülen
 - vollständig trocknen lassen (im Dunklen)
 - mit ein paar Tropfen Vectashield beschichten
 - Deckglas mit Pinzette vorsichtig auflegen (möglichst ohne Luftblasen)
 - mit Nagellack versiegeln

2.8.4 3D-FISH

Hier hybridisiert man die Sonden-DNA an Ziel-DNA in Interphasekernen. Die Zellen müssen hierfür speziell fixiert werden, damit die dreidimensionale Struktur im Zellkern erhalten bleibt (siehe 2.6).

Im Großen und Ganzen ist das Protokoll für 3D-FISH das Gleiche wie für 2D-FISH, man muss nur darauf achten, dass die Präparate auf keinen Fall austrocknen.

Material:

Denaturierung und Hybridisierung:

- Deckgläser mit den fixierten Zellen in 50%Formamid in 2x SSC
- Deckgläser 18x18mm
- Fixogum
- Hotblock 75°C
- Hybridisierungsmix
- Kleenex
- Metallbox
- Phasenkontrastmikroskop
- Pinzette
- Quadriperm
- Wasserbad 37°C

Waschen und Detektion:

- Lichtschutz für Küvette
- Antikörper (je nach Detektionsschema)
- BSA-Blocklösung (4% BSA in 4x SSC/T und 4%BSA in 1xPBS/0,01% Tween)
- DAPI-Lösung (5 µg/ml)
- Deckglas 24x60mm
- Feuchte Kammer
- Glasküvette
- Nagellack
- Objektträger
- Pinzette
- Schüttler in 37°C Wärmekammer
- TOPRO-Lösung
- Vectashield
- Waschlösungen (2x SSC 37°C, 0,1x SSC 62°C, 4x SSC/T 37°C)
- Wasserbäder 37°C, 62°C

Methode:

1. Deckgläser mit 50% Formamid in 2x SSC in Quadriperms geben und unter dem Phasenkontrastmikroskop Areale mit Zellen markieren
2. Auftragen der Sonde auf ein 18x18mm Deckglas
3. Deckglas mit Zellareal umgekehrt auf das Deckglas mit der Sonde geben und Flüssigkeit um das Deckglas herum abtupfen
4. mit Fixogum versiegeln und an einem dunklen Ort vollständig trocknen lassen
5. 3 min auf dem Hotblock bei 75°C denaturieren
6. Inkubation für mindestens 48h in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad
7. Waschschrirte:

- 3x 5 min in 2x SSC bei 37°C auf dem Schüttler waschen (direkt markierte Sonden unter eine Abdeckung stellen und anschließend mit Schritt 15 weitermachen)
 - 2x 5 min in 0,1x SSC bei 62°C waschen
 - kurz in 4x SSC/T geben
8. 10 min mit BSA-Blocklösung (in 4x SSC/T) blocken
 9. Detektion erster Layer
 - Antikörperverdünnung herstellen mit BSA-Blocklösung (in 4xSSC/T)
 - 200 µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben (in feuchter dunkler Kammer)
 - 30 – 40 min inkubieren
 10. Antikörper durch 3x 5 min Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen (Abdunkeln)
 11. Detektion zweiter Layer
 - Antikörperverdünnung herstellen mit BSA-Blocklösung (in 4xSSC/T)
 - 200 µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben (in feuchter dunkler Kammer)
 - 30 – 40 min inkubieren
 12. Antikörper durch 3x 5 min Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen (Abdunkeln)
 13. wenn nötig: Detektion dritter Layer (siehe erster und zweiter Layer)
 14. bei BrdU- oder Ki67-Nachweis:
 - Umpuffern mit BSA-Blocklösung in 1x PBS+0,01% Tween für 10 min
 - Detektion wie oben
 - Waschen in 1x PBS+0,01% Tween
 15. Gegenfärbung mit DAPI und TOPRO
 - Lösung mit DAPI 1:100 und TOPRO 1:1000 in 4x SSC/T (bei BrdU/Ki67-Nachweis in 1x PBS/0,01% Tween)
 - Deckglas mit Zellen durch Einritzen mit einem Diamantstift auf die Größe des Areal zurechtschneiden
 - 300 µl der DAPI/TOPRO-Lösung auf einen Objektträger in der feuchten Kammer geben
 - Deckglas umgekehrt darauf legen
 - 5 min inkubieren lassen
 - Deckglas kurz in 4x SSC/T bzw. 1xPBS/0,01% Tween tauchen
 - Areal umgekehrt auf einen Objektträger mit Vectashield legen
 - überschüssige Flüssigkeit abtupfen und mit Nagellack versiegeln

2.9 Mikroskopie

2.9.1 Phasenkontrastmikroskopie

Das Phasenkontrastmikroskop wurde hauptsächlich zum Verfolgen des Zellwachstums benötigt. Außerdem wurde die Zelldichte von Lymphozyten während der Fixierung beobachtet.

Für 2D- und 3D-FISH wurde das Phasenkontrastmikroskop eingesetzt, um auf Metaphase-Präparaten Areale mit vielen gut gespreiteten Metaphasen zu finden und auf 3D-Präparaten Areale mit passender Zelldichte und vielen intakten, getrennt liegenden Kernen zu markieren.

2.9.2 Epifluoreszenzmikroskopie

Das Epifluoreszenzmikroskop funktioniert durch Detektion von Emissionslicht nach Anregung eines Fluorochroms. Durch einzelne Anregung der Fluorochrome mit einem begrenzten Spektrum, welches im Anregungsmaximum des jeweiligen Moleküls liegt, strahlen diese ein energieärmeres Licht ab (Emission). Dieses wird anschließend durch bestimmte Filter isoliert, wofür verschiedene Filtersätze notwendig sind. Ein Anregungsfilter sorgt dafür, dass das Licht, das von der Quecksilberlampe erzeugt wird, auf die nötige Spektrumsbreite reduziert wird. Ein dichromatischer Strahlenteiler (Farbteiler) lässt nur die längeren Wellenlängen des emittierten Strahls passieren, die dann auf das Präparat gelangen. Durch einen Emissionsfilter werden die Absorptionswellen unterdrückt. So wird nur das Emissionslicht detektiert. Das emittierte sichtbare Licht kann man nun durch ein Okular betrachten, nicht sichtbares Licht im Infrarotbereich kann mittels einer CCD-Kamera (charged coupled device) aufgenommen werden und auf dem Computer in Form von digitalen Bildern angezeigt werden. Die dazu benutzte Software heißt Cytovision von der Firma Applied Imaging. Sie erstellt Raw-Dateien.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Fluorochrome und Filtersätze:

Verwendet wurde das Epifluoreszenzmikroskop hauptsächlich für die Auswertung und Dokumentation von 2D-FISH-Experimenten. Es wurden Metaphasen über die CCD-Kamera aufgenommen, die Raw-Dateien wurden in Tiff-Dateien umgewandelt und anschließend in Adobe Photoshop bearbeitet.

Signale von 3D-FISH-Experimenten wurden ebenfalls am Epifluoreszenzmikroskop überprüft, bevor sie am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gescannt wurden.

Fluorochrom	Cy3	Cy5	DAPI	FITC	Alexa488	TOPRO	Triple-Filter
Farbe des Anregungslichts	grün	orange	ultraviolett	blau	blau	orange	weiß
Anregungsmaximum	550	649	355	495	495	642	355/495/550
Farbe des Emissionslichts	rot	infrarot	blau	grün	grün	infrarot	blau/grün/rot
Emissionsmaximum [nm]	570	670	450	520	519	661	450/520/570
Anregungsfilter [nm]	BP546	BP575-625	BP365	BP 450-490	BP 450-490	BP 575-625	TBP 400/495/570
Strahlenteiler [nm]	FT580	FT645	FT395	FT510	FT510	FT645	TFT 410/505/585
Emissionsfilter [nm]	LP590	LP 660-710	LP 450-490	LP 515-565	LP 515-565	LP 660-710	TLP 460/530/610

Tabelle 2: Flouochrome und Filtersätze des Epifluoreszenzmikroskops

2.9.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Bei einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop tragen neben dem emittierten Licht aus der Fokusebene alle Photonen, die ober- und unterhalb der fokalen Ebene emittiert werden, zur Bildentstehung bei. So kommen keine klaren Schärfenebenen bei der dreidimensionalen Darstellung zustande. Bei einem konfokalen LSM ermöglicht eine variable Lochblende (pinhole) die ausschließliche Detektion von Licht aus der fokalen Ebene, während alle Photonen, die nicht aus dieser Ebene stammen, wirkungsvoll ausgeblendet werden. Dies führt zu einer hochauflösenden Abbildung des Objekts. Außerdem verfügt das konfokale LSM über ein Scanning-Modul. Von einem Laser erzeugtes Licht definierter Wellenlänge gelangt dorthin und wird über zwei Spiegel als beugungsbegrenzter Lichtpunkt durch das Objektiv sequentiell auf das Präparat fokussiert. Aus der Focusebene emittiertes Licht gelangt über den Scanner zu verschiedenen Farbteilern, wo die Fluoreszenzemission wellenlängenspezifisch diskriminiert und pixelweise auf die Detektoren (Photomultiplier) verteilt wird. Diese Informationen werden dann durch eine spezielle Software auf einem angeschlossenen Computer angezeigt. Das zu scannende Objekt wird in Z-Richtung Schritt für Schritt verschoben und in jeder Focusebene gerastert. So wird das gesamte Objekt in Einzelschnitten abgebildet, die als tif-files gespeichert werden. Anschließend kann man diese Schnitte einzeln als Galerie darstellen, oder aber mit spezieller Software zu einem dreidimensionalen Objekt zusammenfügen.

Die verschiedenen Präparate wurden mit individuell abgestimmten Parametern gescannt:

1. Die **Accumulation (Average)** beschreibt die Anzahl der Rasterdurchgänge pro Focusebene. Eine höhere Accumulationszahl ist demnach gleichzusetzen mit einer besseren Auflösung. Je mehr Rasterdurchgänge man andererseits wählt, desto mehr bleicht das Objekt aus. Deshalb wurde bei den meisten Präparaten eine Accumulation von vier Durchgängen eingestellt, die ein vernünftiger Kompromiss für eine eindeutige Signaldarstellung war.
2. Die **Filter** wurden je nach verwendeten Fluorochromen und deren Intensität individuell eingestellt. Teilweise wurde Sequentiell Scanning eingestellt. Hier werden erst alle Fluorochrome einer Schärfenebene gescannt, bevor der Tisch in Z-Richtung verschoben wird. Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der angewendeten Filter:

Fluorochrom	Laser
Cy3/Tamra	Ar-Laser (568nm)
Cy5	HeNe-Laser (633nm)
FITC	Ar-Laser (488nm)
TexasRed	HeNe-Laser (594nm)
DAPI	UV-Laser (405nm)

3. Als **Format** wurde bei den Objekten 512x512 Pixel gewählt.
4. Die Helligkeit (PMT) und der Kontrast (Offset) wurden für jeden Zellkern individuell eingestellt. So wurde versucht, störende Hintergrundgeräusche zu minimieren und gleichzeitig alle Signale zu erhalten.
5. Als **Objektiv** wurde immer ein Plan-Apochromat 63x / 1.4 Ölimmersionsobjektiv verwendet.
6. Der **Scan-Speed** ist das Maß für die Belichtungszeit. Auch hier gilt, je höher, umso besser ist die Auflösung. Es wurde meist mit „medium“ Geschwindigkeit gescannt.
7. Die **Schnittdicke** wurde aufgrund der chromatischen Abberation (Shift) in der Z-Ebene gewählt. Der Shift wurde mit sogenannten Beads gemessen (Durchführung und genaue Erklärung der Shiftkorrektur siehe Diplomarbeit von Claudia Weierich) und lag bei etwa 160nm zwischen Cy3/FITC und Cy5.
8. Die Zellkerne wurden mit **Zoom** 9.31 gescannt, um eine Voxelsize von 0.05 µm in xy zu erreichen.

In dieser Arbeit wurden ein Leica SP2 und ein Leica SP5 CLSM verwendet.

2.10 Bildverarbeitende Software

2.10.1 Image J

Die ImageJ-Software diente dazu, die Einzelschnittbilder des konfokalen Mikroskops in sogenannte Stacks umzuwandeln. In Stacks werden die einzelnen Schnitte übereinander gelegt und mit Hilfe eines Cursors kann man den Zellkern von unten nach oben „durchfahren“. Mit einem speziellen Filter, „Gaussian Blur“ wurden alle Signale, die unterhalb eines bestimmten Intensitätswerts lagen herausgefiltert. Der Filter wurde für jeden Stack einzeln angewendet.

2.10.2 Erstellen von Stacks mit StackGroom

Zum Erstellen von 3D Stacks wurde das Plugin **StackGroom**, das von Boris Joffe für ImageJ entwickelt wurde angewandt. Mit Hilfe von **StackGroom** wird der Shift korrigiert und gleichzeitig Stacks für jeden einzelnen Farbkanal erstellt.

2.10.3 Weiterbearbeitung der 3D Stacks

2.10.3.1 Gaussian Blur

Nachdem die Stacks mit Hilfe von StackGroom erstellt wurden, wurde ein spezieller Filter, „Gaussian Blur“, angewendet, der alle Signale, die unterhalb eines bestimmten Intensitätswertes lagen, herausgefiltert. Dieser Filter wurde für jeden Stack einzeln angewendet.

2.10.3.2 Erstellen von RGB – Projektionen

Da es in dieser Arbeit nötig war, die beiden untersuchten X - Chromosomen in aktiv und inaktiv zu unterscheiden, wurden mit dem Plugin 3channels, das ebenfalls von Boris Joffe für ImageJ entwickelt wurde, RGB – Projektionen von jedem einzelnen Farbkanal erstellt, um anhand dieser das aktive und das inaktive X-Chromosom unterscheiden zu können (siehe Abb.29).

2.10.3.3 Trennen der beiden Signale innerhalb eines Farbkanals

Damit das aktive und das inaktive X - Chromosom getrennt voneinander ausgewertet werden konnten, mussten die beiden Signale in den einzelnen Farbkanälen voneinander getrennt werden. Dafür öffnet man die einzelnen Farbkanäle eines Zellkernes in ImageJ, synchronisiert sie mit **SyncWindows3D** und wählt anhand eines Auswahlwerkzeuges (Kreis, Viereck...) die Region aus, die das Signal des aktiven X-Chromosoms beinhaltet. Mit der Funktion **Clear outside** kann man nun alle Voxel, die sich außerhalb des markierten Areals befinden entfernen. Nun hat

man einen Stack, in dem sich nur Signale des aktiven X-Chromosoms befinden. Das Gleiche wiederholt man nun und kreist statt dem aktiven Signal das inaktive Signal ein.

2.10.3.4 Hintergrundreduzierung durch Definition eines Schwellwertes

Da es durch die Hybridisierung zu störenden Hintergrundsignalen kommen kann, die eine Auswertung der eigentlichen Signale stören würde, wird ein Schwellenwert festgesetzt. Dadurch werden alle Signale, die unterhalb dieses Schwellenwertes liegen auf den Wert 0 gesetzt. Der Schwellenwert wurde für jeden Zellkern und jeden Farbkanal einzeln festgesetzt.

2.10.4 Adobe Photoshop

Mit Adobe Photoshop hat man sehr viele Möglichkeiten, Bilder zu bearbeiten. Man kann Kontraste erhöhen, Signale verstärken oder unerwünschten Hintergrund verringern. All dies darf aber nur in einem Maße geschehen, dass man sicher sein kann, die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

Hauptsächlich wurde diese Software angewendet, um 2D-FISH-Metaphasen zu bearbeiten und die verschiedenen Filter in einem RGB-Bild übereinander zu lagern. Für die Auswertung von 3D-FISH –Bildern wurde Adobe Photoshop nur angewendet, um Galerien der einzelnen Schnitte anzufertigen.

2.10.5 Amira

Amira ist eine Software, mit deren Hilfe man 3D Datensets rekonstruieren kann. Dies diente in dieser Arbeit ausschließlich der Veranschaulichung von Zellkernen und Signalen.

2.11 Quantitative Auswertungsmethoden

2.11.1 Auswertungen mit eADS

Das Programm **eADS** wurde von Tobias Thormeyer im Rahmen seiner Diplomarbeit in unserem Labor entwickelt und stellt eine Weiterentwicklung des Programms **ADS** von Johann von Hase dar (nähere Beschreibung des ADS-Programms: Dissertation Katrin Küpper). Mit eADS ist es möglich, große Datenmengen in einer relativ kurzen Zeit auszuwerten. Das Programm arbeitet voxelbasiert und ermittelt die kürzeste, die mittlere und die mediane Distanz eines Signals zu einer vorher festgelegten

Referenzstruktur. Diese Referenzstruktur kann ein ganzer Zellkern sein, ein Chromosomenterritorium oder ähnliches.

Zudem hat man die Möglichkeit zwischen zwei verschiedenen Auswertungsmethoden zu wählen: die „iterative“ und die „non-iterative“ Methode. Die iterative Methode wird dann angewandt, wenn die Referenzstruktur eine geringe Anzahl an Voxeln besitzt, dafür aber eine große Oberfläche bildet. Die „non-iterative“ Methode wird empfohlen, wenn es sich umgekehrt verhält, wenn die Referenzstruktur aus vielen Voxeln besteht, dafür aber eine geringe Oberfläche besitzt. Beide Methoden liefern dasselbe Ergebnis, sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Laufzeit.

Durch eine weitere Verbesserung des Programms durch Tobias Thormeyer wurde eine dritte Auswahlmöglichkeit gegeben: die „ultra-rapid“ Methode. Diese Methode basiert auf der sogenannten kd-(k-dimensional)-tree-Methode, welche zur multidimensionalen Analyse von Nachbarschaften verwendet wird. Sie ist iterativ und im Gegensatz zu den beiden ursprünglichen Methoden sehr schnell.

Die Programmierung erfolgte in der Entwicklungsumgebung von MATLAB v7 (Mathworks). Einzelne Subroutinen wurden in C/C++ geschrieben. Das Programm ist in verschiedenen Versionen unter Windows, Linux und Macintosh lauffähig.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die „ultra-rapid“ Methode verwendet, da sie extrem zeitsparend ist. Aus diesem Grund wird hier auch nur die „iterative“ Methode genauer erläutert. Für weitergehende Informationen zur „non-iterative“-Methode siehe Dissertation Katrin Küpper.

Auswertungen mit der iterativen Methode

Nach dem Erstellen einer Parameterdatei (Beispiel siehe Anhang) mit dem eADS-Filemaker, die alle Informationen, wie Voxelgröße, Bildgröße, Anzahl der Zellkerne, Schwellenwerte und ähnliches, enthält, kann diese in das Programm eADS eingelesen werden und die Auswertung somit gestartet werden. eADS setzt nun die angegebenen Schwellenwerte, führt eine 3D-Objekterkennung durch und startet den Algorithmus zur Distanzbestimmung. Dabei werden um das zu vermessende Signal im 3D-Raum drei verschiedene Radien (abhängig von der angegebenen Voxeldimension in x, y und z Richtung) gelegt. Hierbei entsteht ein Ellipsoid, da die Voxelgröße in z-Richtung größer ist als die Voxelgrößen in x und y-Richtung. Alle Voxel innerhalb dieses Ellipsoids werden für die Auswertung berücksichtigt. Ist innerhalb des Ellipsoids kein Voxel enthalten, das im Referenzkanal eine schwellenwertrelevante Helligkeitsveränderung aufweist, werden die Radien solange iterativ vergrößert (wobei Radiengröße = Voxeldimension x Iteration) bis diese schwellenwertrelevante Helligkeitsveränderung für mindestens einen Voxel gefunden wird. Anschließend werden die Koordinaten dieses Voxels bestimmt und über die Koordinaten des zu vermessenden Signals die Distanz zwischen diesen beiden Punkten bestimmt. Sollten mehrere „Referenzvoxel“ gefunden worden sein, werden

alle Abstände gemessen und je nach Programmeinstellung daraus der kürzeste, der mittlere oder der mediane Abstand ermittelt.

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

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

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

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

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

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

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

2.11.2 Distangles

Das Programm Distangles ist ebenfalls von Tobias Thormeyer entwickelt worden. und misst Distanzen zwischen zwei Kanälen und Winkel zwischen drei Kanälen, indem es die Intensitätsschwerpunkte der Signale (zum Beispiel von einzelnen BACs, BAC-Pools...) bestimmt. Nach dem Erstellen einer Parameterdatei (Beispiel siehe Anhang), die die Schwellenwerte und Voxeldimensionen jedes einzelnen Kanals enthält ist das Programm in der Lage, die Intensitätsschwerpunkte der einzelnen Signale zu berechnen und somit die Distanzen und Winkel zwischen den Kanälen zu bestimmen.

2.11.3 Manders-Kolokalisation

Die Kolokalisationsanalyse ist eine Methode, den Überlappungsgrad von verschiedenen Signalen zu ermitteln. Hierfür ist eine Voxel für Voxel-Analyse, die auf Signalintensitäten beruht, die sogenannten Manders-Koeffizienten **M1** und **M2** (Manders, Verbeek et al. 1993) ausgewählt worden. Berechnet wurden diese Koeffizienten anhand eines Plugins in *ImageJ*, welches jeweils diese zwei Werte ausgibt. **M1** bedeutet hier den Grad der Überlappung von Kanal 1 mit Kanal 2, **M2** die Überlappung von Kanal mit Kanal 1. Die Manders-Koeffizienten messen den Anteil der Überlappung zwischen zwei Kanälen anhand eines voxelbasierten Algorithmus in Relation zum Gesamtsignalanteil jedes Kanals. **M1** und **M2** besitzen Werte zwischen 0 und 1 (0% und 100%) und können somit als Indikator für den Prozentsatz überlappender Signale im Vergleich zur Gesamtintensität der Signale zwischen zwei Kanälen gesehen werden.

Für eine detaillierte Beschreibung zur Anwendung dieser Kolokalisationsanalyse siehe Dissertation Roman Zinner.

2.12 Statistik

2.12.1 Mann Whitney Rank Sum Test

Der Mann Whitney Rank Sum Test oder auch U-Test genannt, ist ein parameterfreier statistischer Test. Mittels dieses Tests kann man überprüfen, ob zwei Verteilungen unabhängig sind oder übereinstimmen. Der Test kann einseitig oder zweiseitig angewendet werden. Beim einseitigen Test wird geprüft, ob $A > B$ oder $A < B$ ist, während beim zweiseitigen Test geprüft wird, ob $A = B$ ist. In dieser Arbeit wurde der zweiseitige Test mittels des Programms *SigmaStat* (SPSS, Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenstellung der BAC-Pools

3.1.1 Auswahl der BACs

Alle in dieser Arbeit verwendeten BACs (siehe Anhang) wurden freundlicherweise als isolierte DNA von Rogier Versteeg (AMC Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die BACs wurden unabhängig von enthaltenen Genen oder der Gendichte in ihrer Umgebung ausgewählt, die DNA aus E.coli-Stämmen isoliert und anschließend teilweise sequenziert, um sicherzustellen, dass die richtige Zielsequenz enthalten ist. Die Auswahl der BACs für die jeweiligen Versuche geschah nach Zielsetzung des Experiments.

3.1.2 BAC-Pools

Die verschiedenen BAC-Pools wurden je nach Fragestellung der einzelnen Experimente zusammengestellt.

3.1.2.1 **Radiale Verteilung der p- und q-Arme des X-Chromosoms**

In diesem Experiment sollte die Lokalisation des p- und des q-Arms innerhalb des Fibroblastenzellkerns untersucht werden. Deshalb wurden BACs entlang der Arme unabhängig von enthaltenen exprimierten Genen oder der Gendichte in ihrer Umgebung ausgewählt. Da die 10Mb-Pools (siehe unten) bereits vorhanden waren, wurden diese genutzt und die Pools 10Mb-1 bis 10Mb-6 für den kurzen Arm zusammengefasst, sowie die Pools 10Mb-7 bis 10Mb-16 für den langen Arm (siehe Abb.18).

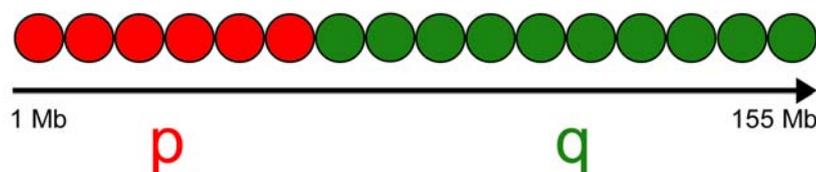


Abbildung 18: Schematische Darstellung der BAC-Pools p- und q-Arm ganz

3.1.2.2 **Unterteilung von Xp und Xq in je zwei gleich große Teile**

Hier sollte die Frage behandelt werden, ob es innerhalb der Arme Unterschiede in der Lokalisation gibt. Verwendet wurden wieder die vorhandenen 10Mb-Pools. Diesmal sind jeweils 10Mb-1 bis 10Mb-3 und 10Mb-4 bis 10Mb-6 für den kurzen Arm zusammengefasst worden, sowie 10Mb-7 bis 10Mb-11 und 10Mb-12 bis 10Mb-16 (siehe Abb.19).

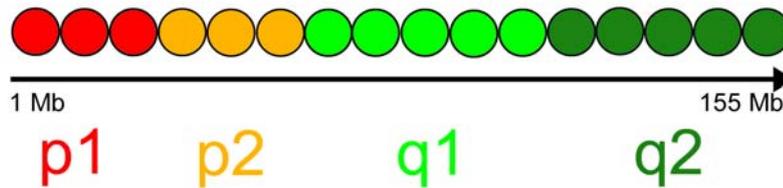


Abbildung 19: Schematische Darstellung der unterteilten Arme von Xq und Xp

3.1.2.3 Darstellung des gesamten X-Chromosoms anhand von 10Mb-Pools

Um die Gesamtstruktur und Lokalisation von Untereinheiten des X-Chromosoms zu untersuchen, wurden 10Mb große BAC-Pools über das gesamte X-Chromosom zusammengestellt (Abb.20) (BAC-Pool 16 erstreckt sich nur über 5 Mb). Die BACs wurden in ungefähr 1Mb großen Schritten ausgewählt, wobei die Expression enthaltener Gene sowie die Gendichteumgebung der BACs keine Rolle spielte. So sind in jedem Pool reichere, genärmere, sowie BACs mit exprimierten und nicht-exprimierten Genen enthalten.

Für die genaue Zusammenstellung der einzelnen BACs in den Pools siehe Anhang.

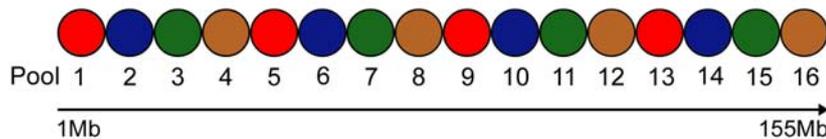


Abbildung 20: Schematische Darstellung der 10 Mb-Pools über das gesamte X-Chromosom

3.1.2.4 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms ermittelt anhand eines 2Mb-Gendichte-Fensters

Die 2Mb-Gendichtepools wurden zusammengestellt, indem die Gendichte innerhalb eines 2Mb-Fensters, gemessen vom Mittelpunkt der einzelnen BACs, berücksichtigt wurde (siehe Abschnitt 2.7.1). Da das X-Chromosom ein insgesamt relativ genarmes Chromosom ist (durchschnittlich 8.6 Gene/Mb, NCBI) wurde eine Gendichte von 15 Genen/Mb als genreich deklariert (n=50). BACs, die weniger als 15 Gene/Mb enthalten, wurden als genarm eingestuft (n=129). Das Expressionslevel spielte bei der Auswahl der BACs keine Rolle. In Abbildung 21 ist die Verteilung der genreichen und genarmen BACs der 2Mb-Gendichtepools dargestellt. Im Anhang befindet sich eine Liste aller hier verwendeten BACs.

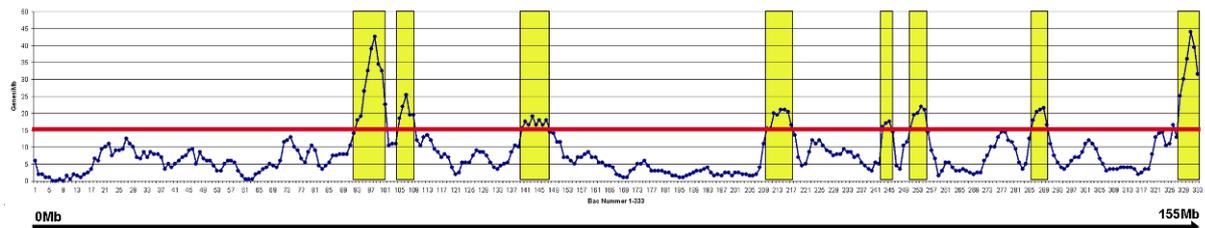


Abbildung 21: 2Mb-Gendichte der einzelnen BACs und BAC-Pools

Dargestellt ist die 2Mb-Gendichte der einzelnen BACs (blaue Linie) und die für den 2Mb-Gendichte-Pool verwendeten BACs (gelbe Fenster), die über der vorher festgesetzten Grenze von 15 Genen/Mb (rote Linie) lagen.

3.1.2.5 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms ermittelt anhand eines 10Mb-Gendichte-Fensters

Hier wurde die Gendichte innerhalb eines 10Mb-Fensters gemessen vom Mittelpunkt der einzelnen BACs (siehe Abschnitt 2.7.1) als Kriterium herangezogen. Wie bereits bei den 2Mb-Gendichtepools wurde die Grenze zwischen genarm und genreich bei 15 Genen/Mb festgesetzt. Das Expression der enthaltenen Gene wurde auch hier nicht berücksichtigt. In Abbildung 22 ist dargestellt, wie sich die 10Mb-Gendichtepools über das X-Chromosom verteilen. Eine Auflistung der verwendeten BACs findet sich im Anhang.

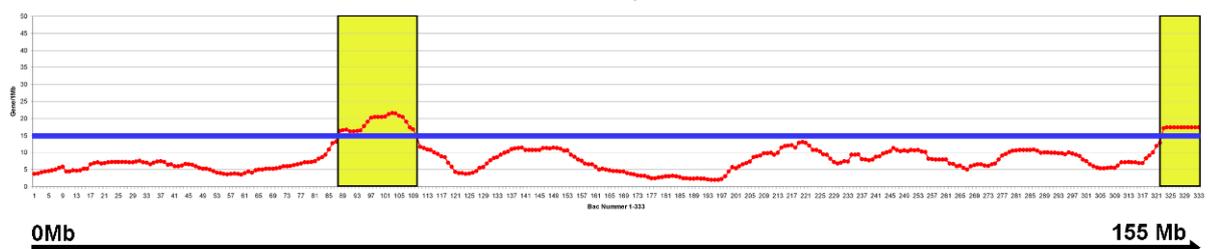


Abbildung 22: 10Mb-Gendichte der einzelnen BACs und BAC-Pools

Dargestellt ist die 10Mb-Gendichte der einzelnen BACs (rote Linie) und die für den 10Mb-Gendichte-Pool verwendeten BACs (gelbe Fenster), die über der vorher festgesetzten Grenze von 15 Genen/Mb (blaue Linie) lagen.

3.1.2.6 Radiale Verteilung der RIDGES und genarmen Bereiche des X-Chromosoms

3.1.2.6.1 RIDGES:

Für diese beiden Pools wurde der genreiche 10Mb-Gendichte-Pool verwendet, da die Bereiche auf dem X-Chromosom, die innerhalb des 10Mb-Fensters als genreich

gelten, sich auf die beiden RIDGEs beschränken. Für nähere Informationen zu RIDGEs siehe Abschnitt 1.2.4.2. Die BACs wurden aufgeteilt in RIDGE Xp und RIDGE Xq (siehe Abb.23).

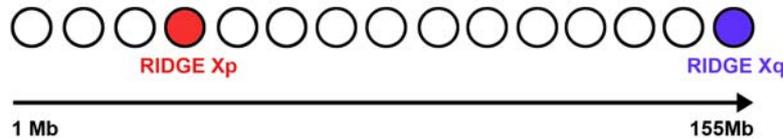


Abbildung 23: Schematische Darstellung der BAC-Pools RIDGE Xp und RIDGE Xq

3.1.2.6.2 genarme Bereiche „tail“ und „Mitte“

Hier wurden Teile des genarmen 10Mb-Gendichtepools (siehe oben) verwendet (siehe Abb.24). Eine genaue Auflistung der verwendeten BACs befindet sich im Anhang.

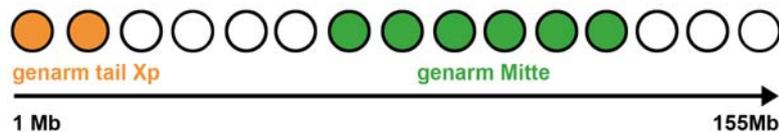


Abbildung 24: Schematische Darstellung der genarmen Bereiche „tail“ und „Mitte“

3.1.2.6.3 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb des RIDGE auf Xp11

In diesem Experiment wurden kleine BAC-Pools erstellt, die innerhalb und am Rand des RIDGE auf Xp liegen und unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Der Pool *RIDGE Xp Rand* besteht aus 7 BACs, die das RIDGE strangauf- und abwärts umranden und sowohl genarm sind als auch niedrig exprimierte Gene enthalten. Der Pool *RIDGE Xp genreich, niedrig exprimiert* besteht aus 4 BACs, die innerhalb des RIDGEs liegen, also genreich sind, aber keine Gene enthalten, die hoch exprimiert werden. Für den Pool *RIDGE Xp genreich, hoch exprimiert* kam nur ein BAC in Frage, der ein Gen enthält, welches in humanen Fibroblasten sehr hoch exprimiert wird. In Abbildung 25 sind die einzelnen BACs dargestellt.

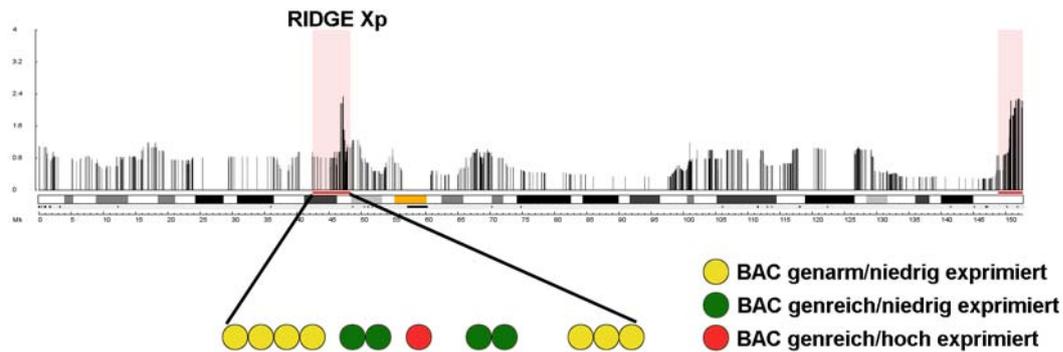


Abbildung 25: Verwendete BACs innerhalb des RIDGE Xp

Dargestellt ist das X-Chromosom mit den Medianen der Expressionslevel (Balken nach oben). Die beiden RIDGEs sind rosa schattiert. Die verwendeten BACs innerhalb des RIDGE Xp sind als Kugeln dargestellt (gelb, grün, rot).

3.1.2.6.4 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb der genarmen Region in Xq25

Hier wurden BACs innerhalb einer 4.6Mb großen, sehr genarmen Region auf Xq25 (3.5 Gene/Mb) ausgewählt, die sich in ihrem Expressionslevel unterscheiden und sich in ihrer Anordnung abwechseln. Das heißt, auf einen niedrig exprimierten Pool folgt ein hoch exprimierter Pool und darauf wieder ein niedrig exprimierter Pool. Für die beiden niedrig exprimierten Pools wurden jeweils 3 BACs ausgewählt, der hoch exprimierte Pool besteht aus 2 BACs (siehe Abb.26). Eine genaue Auflistung der verwendeten BACs mitsamt ihrer Eigenschaften ist dem Anhang zu entnehmen.

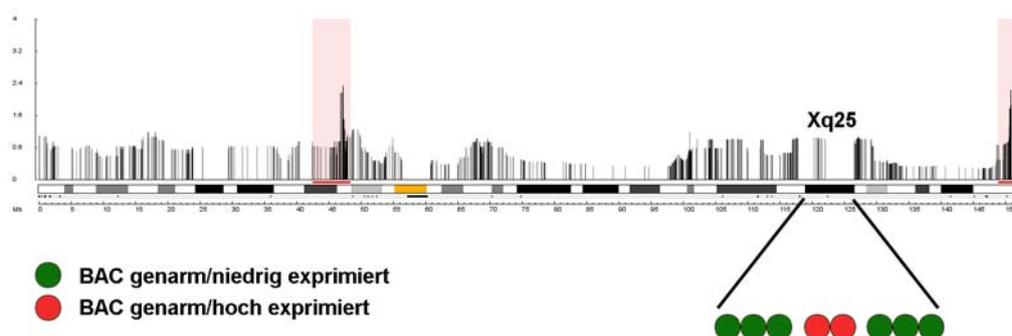


Abbildung 26: Verwendete BACs innerhalb der genarmen Region Xq25

Dargestellt ist das X-Chromosom mit den Medianen der Expressionslevel (Balken nach oben). Die beiden RIDGEs sind rosa schattiert. Die verwendeten BACs innerhalb der genarmen Region sind als Kugeln dargestellt (grün, rot).

3.1.2.6.5 Radiale Verteilung des RIDGE (Xp11) vs. Genarme Region (Xq25)

Der genreiche Pool besteht aus 8 BACs, die, unabhängig von ihrem Expressionslevel, innerhalb des RIDGES auf Xp liegen und demnach sehr genreich sind. Die 8 BACs für den genarmen Pool liegen in der Region Xq25 und wurden

ebenfalls unabhängig von ihrem Expressionslevel ausgewählt (siehe Abb.27). Das Kriterium hier war nur die Gendichte-Umgebung der BACs.

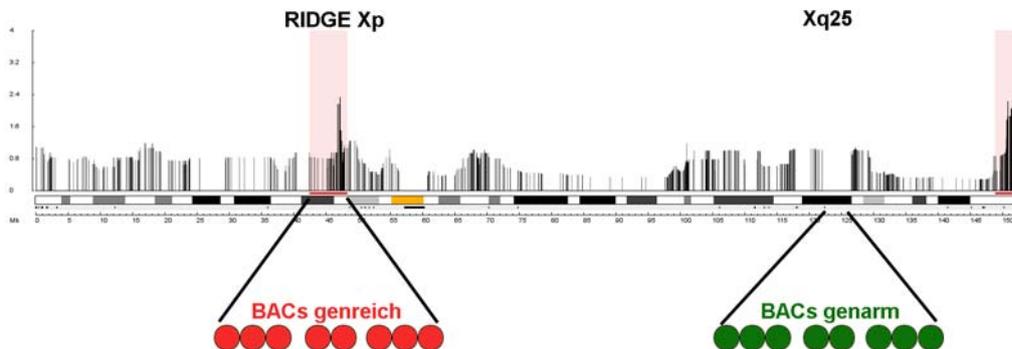


Abbildung 27: Verwendete BACs RIDGE vs. genarme Region

Dargestellt ist das X-Chromosom mit den Medianen der Expressionslevel (Balken nach oben). Die beiden RIDGEs sind rosa schattiert. Die verwendeten BACs innerhalb des RIDGES und der genarmen Region sind als Kugeln dargestellt (grün, rot).

3.1.2.6.6 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter BACs des gesamten X-Chromosoms

In diesem Experiment sollte die radiale Position der gesamten hoch und niedrig exprimierten Bereiche des X-Chromosoms in Bezug zum X-Territorium und in Bezug auf den Fibroblasten-Zellkern untersucht werden. Dafür wurden die BACs eingeteilt in „hoch exprimiert“ und „niedrig exprimiert“. „Hoch exprimiert“ waren alle BACs deren durch den Affymetrix-Chip ermittelten Werte über dem Mittelwert aller Expressionswerte lagen. Der Mittelwert lag bei ~669. Dieses Kriterium musste hier relativ niedrig gesetzt werden, da das X-Chromosom in humanen Fibroblasten relativ wenige hoch exprimierte Gene besitzt. Somit wurden 41 BACs in diesen Pools eingeordnet. In die Klasse „niedrig exprimiert“ wurden BACs eingeteilt, die einen Expressionswert von weniger als 300 besitzen. Da dieser Pool im Vergleich zum Pool „hoch exprimiert“ sehr groß ausfallen würde, wurden nicht alle vorhandenen BACs verwendet, sondern eine Auswahl (n=74), die das gesamte X-Chromosom überspannt, getroffen. Die Gendichteumgebung der BACs spielte hier keine Rolle. Für eine detaillierte Auflistung aller in diesen Pools verwendeten BACs siehe Anhang. In der Abbildung 28B ist eine schematische Darstellung der verwendeten BACs gezeigt.

3.1.2.6.7 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter BACs auf Xp

Um eine detailliertere Darstellung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des X-Chromosoms untersuchen zu können, wurde eine kleinere Region auf dem p-Arm ausgewählt. Es wurden jeweils 15 BACs für die Klassen „hoch exprimiert“ und „niedrig exprimiert“ ausgewählt. Es zählten die gleichen Auswahlkriterien wie oben

beschrieben. Die einzelnen verwendeten BACs sind im Anhang aufgelistet und schematisch in der Abbildung 28C dargestellt.

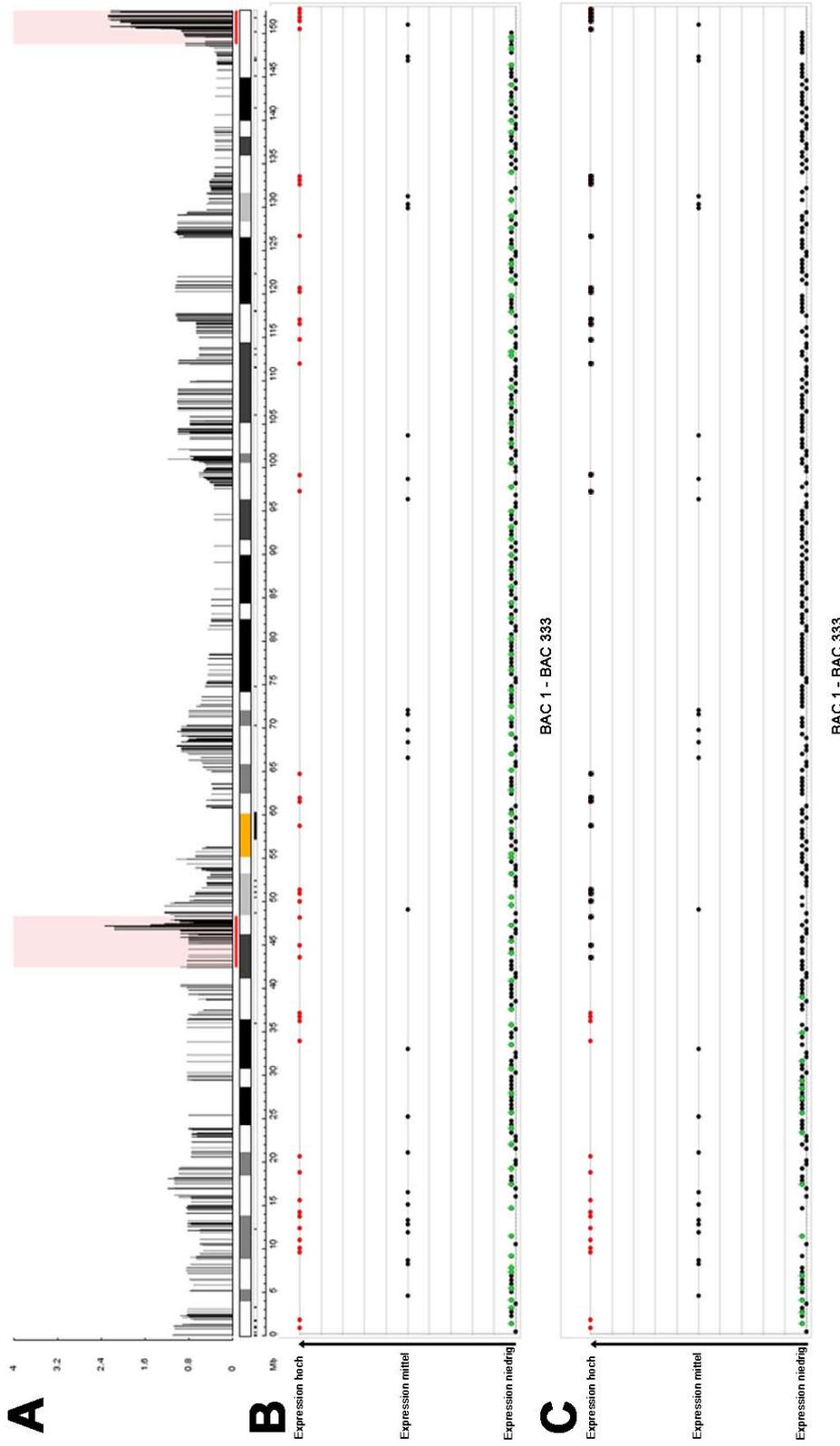


Abbildung 28: Ideogramm des humanen X-Chromosoms mit schematischer Darstellung der für die expressionsabhängigen Pools verwendeten BACs

A Ideogramm X-Chromosom mit Expressionsprofil, **B** verwendete BACs ganzes X-Chromosom, **C** verwendete BACs Xp rot: hoch exprimiert, grün: niedrig exprimiert. Der physikalische Abstand der BACs entspricht nicht genau dem genomischen Abstand. Für eine genaue Lokalisation der BACs auf dem X-Chromosom siehe BAC-Liste im Anhang.

3.2 Unterscheidung von aktivem und inaktivem X

In dieser Arbeit war es von besonderer Wichtigkeit, das aktive X-Chromosom vom inaktiven X-Chromosom verlässlich zu unterscheiden. Dafür wurde die DAPI-Färbung als Indikator verwendet. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA (Tanious, Veal et al. 1992). Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI blau. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Da das Chromatin des inaktiven X-Chromosoms aus fakultativem Heterochromatin besteht (Plath, Fang et al. 2003; Kohlmaier, Savarese et al. 2004; Rougeulle, Chaumeil et al. 2004) und somit dichter gepackt ist als das Chromatin der anderen Chromosomen sieht man in der DAPI-Färbung in ca. 85% der Fibroblasten-Zellkerne eine deutliche Verdichtung (siehe Abb.29). Es wurden nur Zellkerne in die Auswertung einbezogen, in denen eine sichere Unterscheidung der beiden Chromosomen möglich war.

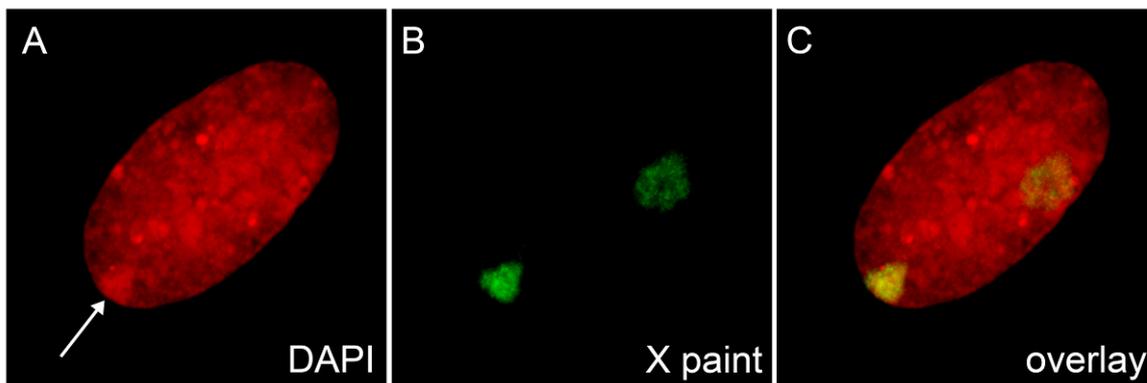


Abbildung 29 Identifizierung des inaktiven X-Chromosoms anhand des Barr-Bodys
DAPI-Färbung zeigt eine deutliche Verdichtung (Pfeil in A) an der Stelle des inaktiven X-Chromosoms (B). In C sind beide Farbkanäle übereinandergelagert.

3.3 Ki67-Markierung der Zellen

Da in dieser Arbeit ausschließlich Zellkerne verwendet wurden, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befanden, wurde nach jeder neuen Zellfixierung eine Ki67-Markierung durchgeführt. pKi67 ist ein Antigen, welches in proliferierenden, aber nicht in ruhenden Zellen vorkommt (Gerdes et al.1984) (Abb.30). Um Fibroblasten in der G0-Phase zu erhalten, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ungefähr 75% nur noch mit einem speziellen „Hungermedium“ (DMEM + 0.5% FCS + Penicillin/Streptomycin) versehen. Dadurch arretieren sie in der G0-Phase.

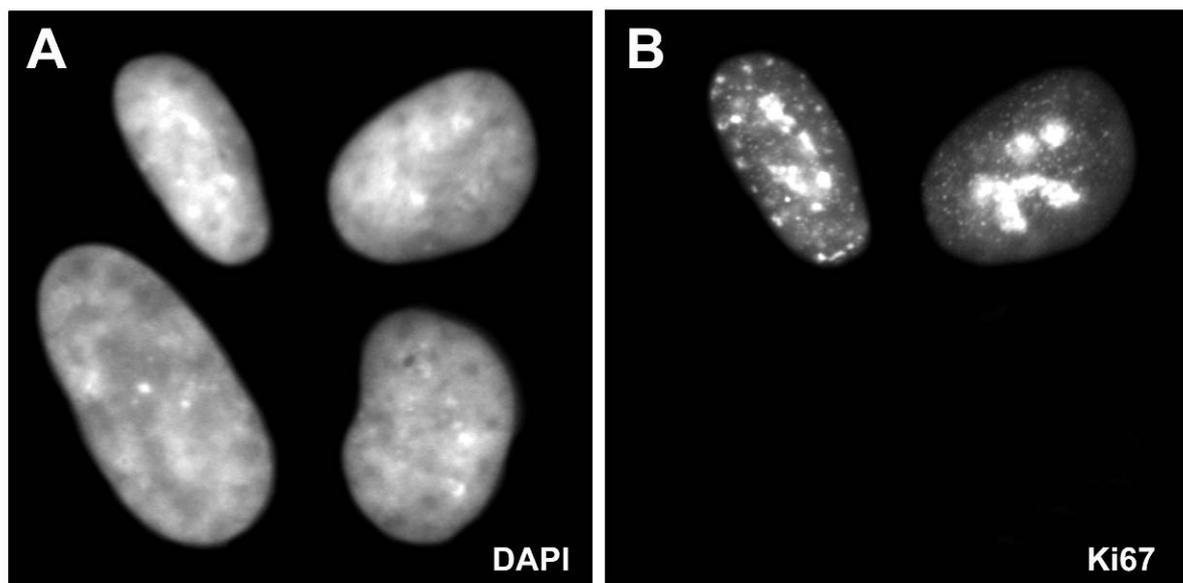


Abbildung 30: Ki67-Markierung von humanen Fibroblasten
A DAPI-Färbung, B Ki67-Markierung

Die fixierten Fibroblasten-Zellkerne wurden für 30 min mit einem Antikörper gegen dieses Protein inkubiert. Anschließend wurde dieser Antikörper mit einem mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundärem Antikörper nachgewiesen und die Ki67-negativen Zellen an einem Epifluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Detektionsschema:

	Antikörper
1. Layer	Mouse α pKi67
2. Layer	Goat α Mouse – Alexa488

Durchschnittlich waren 95% der Zellen in der G0-Phase, weswegen auf eine zusätzliche Markierung mit Ki67 in den 3D-FISH-Experimenten verzichtet wurde.

3.4 Durchführen der FISH-Experimente

3.4.1 Amplifizieren, Labeln und Testen der BAC-Pools in einer 2D-FISH

Jeder einzelne in dieser Arbeit verwendete BAC-Pool wurde nach dem Amplifizieren und Labeln in einem 2D-FISH-Experiment auf humanen Metaphasen getestet, um die Qualität des Pools zu testen und eventuelle Kreuzhybridisierungen auf andere Chromosomen auszuschließen.

Nachdem die BAC-Pools ausgewählt und die DNAs gepoolt und eingedampft waren, wurden sie mittels GenomiPhi amplifiziert (siehe Abschnitt 2.7.2.2) und die Effizienz der Amplifikation auf einem 1%igen Agarosegel getestet. Abbildung 31 zeigt ein Beispiel eines solchen Gels. Anschließend wurden die BAC-Pools durch Nicktranslation markiert (siehe Abschnitt 2.7.3.2) und es wurde jeweils ein 2D-FISH-

Experiment wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben, auf Metaphasen, die aus humanen Lymphozyten gewonnen wurden (siehe Abschnitt 2.5) durchgeführt. Um eine gute Hybridisierung zu erreichen, wurden ca. 200ng DNA / 5µl Hybridisierungsmix eingesetzt.

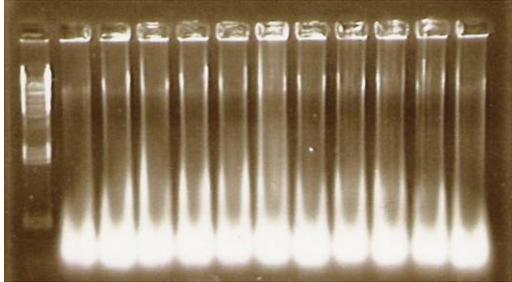


Abbildung 31: Beispiel eines typischen 1%igen Agarosegels nach einer GenomiPhi-Amplifikation

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten BAC-Pools, ihre Markierung und das jeweilige Detektionsschema. Bei BAC-Pools, die direkt mit TexasRed, Tamra oder Cy3 markiert wurden, ist keine weitere Antikörperdetektion notwendig gewesen. In den Experimenten, in denen eine paint-Sonde für das X-Chromosom verwendet wurde, wurde diese entweder mit Biotin, Digoxigenin oder DNP markiert und dementsprechend entweder mit Avidin-Alexa 488, Mouse α Dig-Cy5 oder Rabbit α DNP + Goat α Rabbit – Alexa488 nachgewiesen. Wurde in einem 2D-FISH-Experiment eine Kreuzhybridisierung entdeckt, wurden alle BACs des betroffenen Pools einzeln getestet und der jeweilige BAC aus dem Gesamtpool entfernt. Die Abbildung 32 A bis F zeigt Beispiele der 2D-FISH-Experimente.

BAC-Pool	Markierung	Detektion
p-Arm ganz	TexasRed	---
q-Arm ganz	Tamra	---
p-Arm halb 1 (p1)	TexasRed	---
p-Arm halb 2 (p2)	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
q-Arm halb 1 (q1)	Tamra	---
q-Arm halb 2 (q2)	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC
10 Mb-1	Tamra	---
10 Mb-2	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-3	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC
10 Mb-4	TexasRed	---
10 Mb-5	Tamra	---
10 Mb-6	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-7	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC

10 Mb-8	TexasRed	---
10 Mb-9	Tamra	---
10 Mb-10	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-11	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC
10 Mb-12	TexasRed	---
10 Mb-13	Tamra	---
10 Mb-14	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-15	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC
10 Mb-16	TexasRed	---
Expression hoch ganzes X	Tamra	---
Expression niedrig ganzes X	TexasRed	---
Expression hoch p-Arm	TexasRed	---
Expression niedrig p-Arm	Tamra	---
2 Mb-Gendichte genreich	TexasRed	---
2 Mb-Gendichte genarm	Tamra	---
10 Mb-Gendichte genreich	TexasRed	---
10 Mb-Gendichte genarm	Tamra	---
10 Mb-Gendichte RIDGE Xp	TexasRed	---
10 Mb-Gendichte RIDGE Xq	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-Gendichte genarm Mitte	Tamra	---
10 Mb-Gendichte RIDGES Xp,Xq	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
10 Mb-Gendichte genarm tail Xp	TexasRed	---
RIDGE Xp Rand genarm, niedrig exprimiert	Cy3	---
RIDGE Xp genreich, niedrig exprimiert	TexasRed	---
RIDGE Xp genreich, hoch exprimiert	Dig	Mouse α Dig – Cy5 Goat α Mouse – Cy5
Genarm Xq niedrig exprimiert 1	Tamra	---
Genarm Xq niedrig exprimiert 2	TexasRed	---
Genarm Xq hoch exprimiert	Biotin	Avidin – Alexa 488 Goat α Avidin - FITC
RIDGE vs. Genarme Region, genreich	Tamra	---
RIDGE vs. Genarme Region, genarm	TexRed	---

Tabelle 3: Markierungs- und Nachweisschemata der verwendeten BAC-Pools

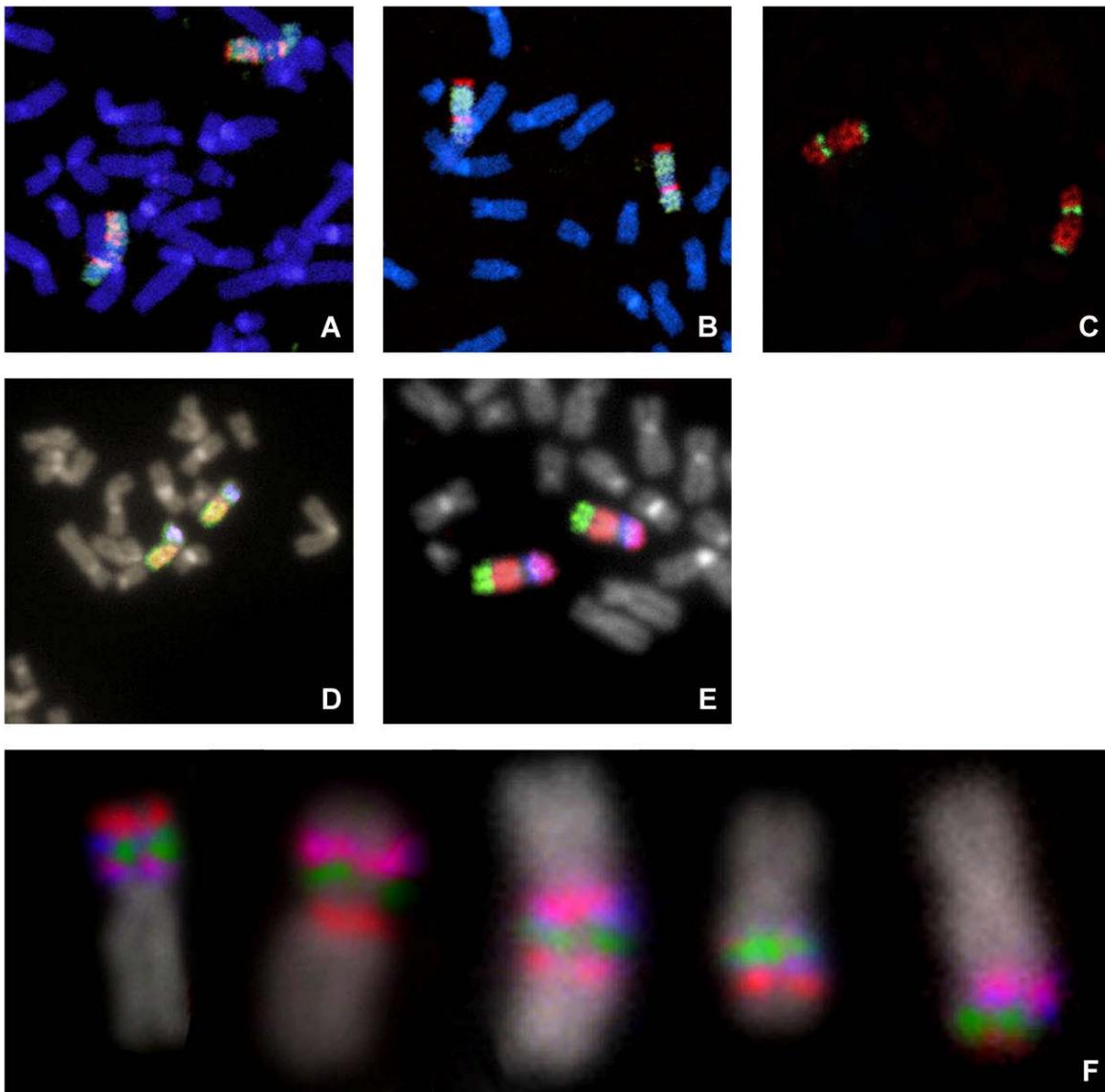


Abbildung 32: Beispiele der 2D-FISH-Experimente

A 2 Mb Gendichte Pool, genreiche Bereiche sind in rot, genarme Bereiche in grün dargestellt, **B** 10 Mb Gendichte Pool, genreiche Bereiche sind in rot, genarme Bereiche in grün dargestellt, **C** Expressionspool ganzes X, hoch exprimierte Bereiche sind in grün, niedrig exprimierte Bereiche in rot dargestellt, **D** p- (blau) und q-Arm (gelb), **E** p- und q-Arm halb (p1 pink, p2 blau, q1 rot, q2 grün), **F** 10 Mb-Pools (von links nach rechts: 1-40 Mb, 30-70 Mb, 60-100 Mb, 90-130 Mb, 120-155 Mb)

3.4.2 3D-FISH-Experimente

Nach der erfolgreichen Hybridisierung der verschiedenen BAC-Pools auf Metaphasen humaner Lymphozyten wurden die gleichen Pools in 3D-FISH-Experimenten auf fixierte humane Fibroblasten hybridisiert (siehe Abschnitt 2.8.4). Um eine erfolgreiche Hybridisierung zu erzielen, wurde die doppelte Menge an DNA im Vergleich zu den 2D-FISH-Experimenten (ca.400ng DNA/Pool/5µl Hybridisierungsmix) eingesetzt. Die Detektion der DNA-Sonden erfolgte nach dem gleichen Schema wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Abbildung 33 zeigt ein Beispiel für eine erfolgreiche Hybridisierung in einem Fibroblasten-Zellkern.

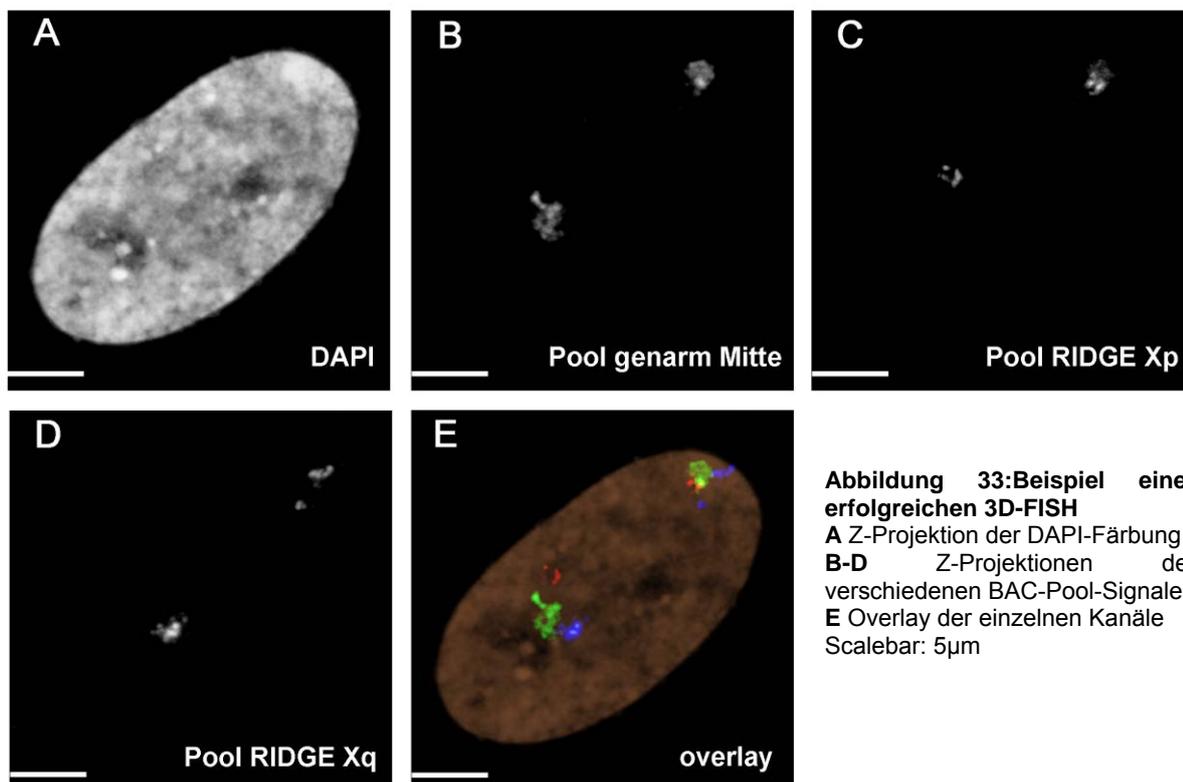


Abbildung 33: Beispiel einer erfolgreichen 3D-FISH
 A Z-Projektion der DAPI-Färbung
 B-D Z-Projektionen der verschiedenen BAC-Pool-Signale
 E Overlay der einzelnen Kanäle
 Scalebar: 5 μ m

Da bei jeder neuen Zellfixierung die Anzahl der zyklierenden Zellen in einem separaten Experiment (siehe Abschnitt 3.3) ausgezählt wurde, und nur Fixierungen verwendet wurden, in denen mindestens 95% der Zellen in G0 waren, wurde in den 3D-FISH-Experimenten auf eine zusätzliche Markierung mit Ki67 verzichtet. Nach der erfolgreichen Hybridisierung wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP2 bzw. Leica TCS SP5) lichtoptische Schnitte von 20-30 Zellkernen aufgenommen, die Daten entsprechend mit ImageJ prozessiert und anschließend je nach Fragestellung ausgewertet.

3.5 Radiale Verteilung des X-Chromosoms im Zellkern humaner diploider Fibroblasten

In diesem Experiment wurde die radiale Verteilung des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms als Ganzes untersucht. Hierfür wurde nur das X-Chromosom anhand einer paint-Sonde in einer 3D-FISH angefärbt und mit dem Programm eADS ausgewertet. Es wurden 96 Zellkerne in die Auswertung einbezogen. Das Ergebnis der eADS-Auswertung ist in Abbildung 34 dargestellt. Die Unterscheidung zwischen aktivem und inaktivem X-Chromosom erfolgte anhand der Darstellung des Barr-Bodies in der DAPI-Färbung (siehe Abschnitt 3.2).

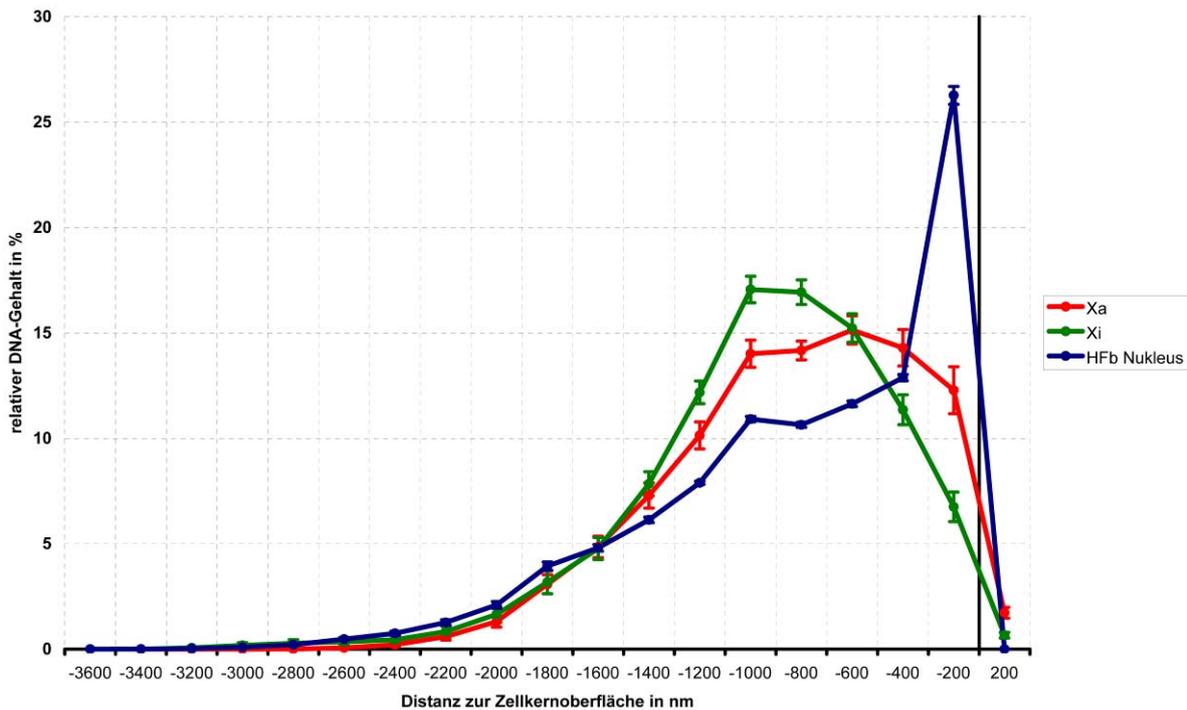


Abbildung 34: Radiale Verteilung des aktiven und inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten.

Xa: rote Kurve, Xi: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Das inaktive X-Chromosom liegt statistisch signifikant ($P=0.012$) weiter im Inneren des Fibroblasten-Zellkernes als das aktive X-Chromosom, wobei beide Chromosomen randständig sind.

Statistische Auswertung

Um zu testen, ob sich das aktive und das inaktive X-Chromosom hinsichtlich ihrer Position im Zellkern statistisch signifikant unterscheiden, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Signifikanztest durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

	n	Median
Xa	97	-643.894
Xi	97	-726.223

Pools	P-Wert
Xa-Xi	0.012

Dabei ergibt sich ein P-Wert von 0.012, was auf einen starken signifikanten Unterschied zwischen den beiden X-Chromosomen hinsichtlich ihrer Lage innerhalb des humanen Fibroblastenzellkerns hinweist.

In der Abbildung 35 ist das Ergebnis der radialen Verteilung des aktiven und inaktiven X-Chromosoms schematisch dargestellt. Das aktive X-Chromosom liegt statistisch weiter am Rand des Fibroblastenzellkerns als das inaktive X-Chromosom.

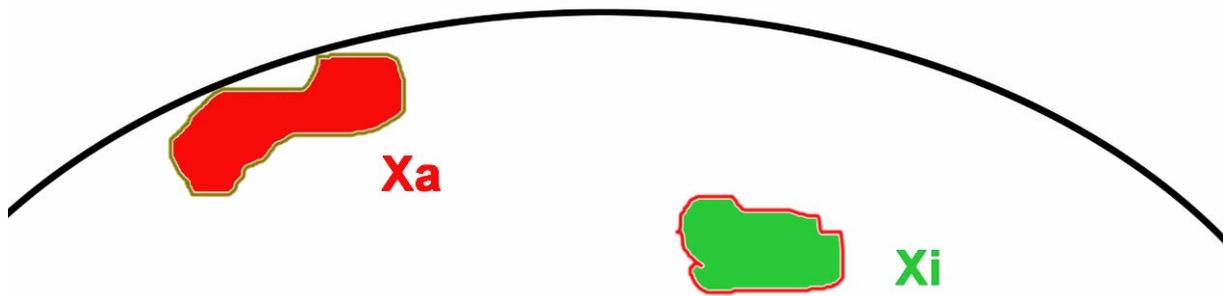


Abbildung 35: Schematische Darstellung der radialen Verteilung von Xa und Xi im Zellkern humaner Fibroblasten

3.6 Radiale Verteilung und Strukturanalysen der Chromosomenarme des X-Chromosoms

3.6.1 Radiale Verteilung des p- und des q-Arms im Zellkern humaner diploider Fibroblasten

Um herauszufinden, ob sich der p- und der q-Arm des humanen X-Chromosoms in weiblichen Fibroblasten gleich verteilen, wurden aus einzelnen BACs Pools erstellt, die sich jeweils über den p- und den q-Arm erstrecken (siehe Abschnitt 3.1). Nach erfolgreicher 2D- (siehe Abb.36A) und 3D-FISH (siehe Abb.36B) und anschließender Aufnahme von 23 Bilderserien an einem konfokalen Leica SP5 wurden die Zellkerne für das Programm eADS vorbereitet und schließlich ausgewertet.

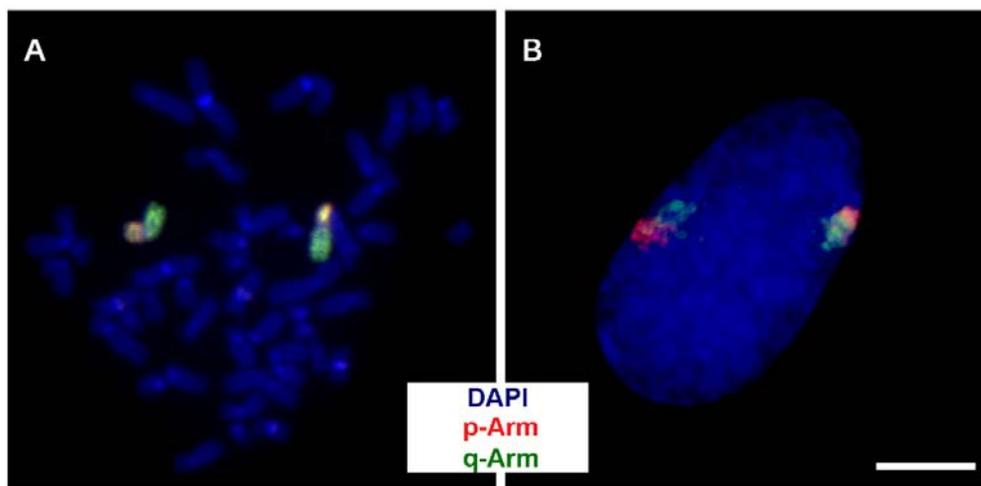


Abbildung 36: 2D- und 3D-FISH der Chromosomenarme des X-Chromosoms
A Metaphase nach einer 2D-FISH, **B** Z-Projektion eines Fibroblastenzellkerns nach einer 3D-FISH. Der p-Arm ist in rot dargestellt, der q-Arm in grün und DAPI in blau. Scalebar: 5µm

Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in den Abbildungen 37 (Xa) und 38 (Xi) dargestellt.

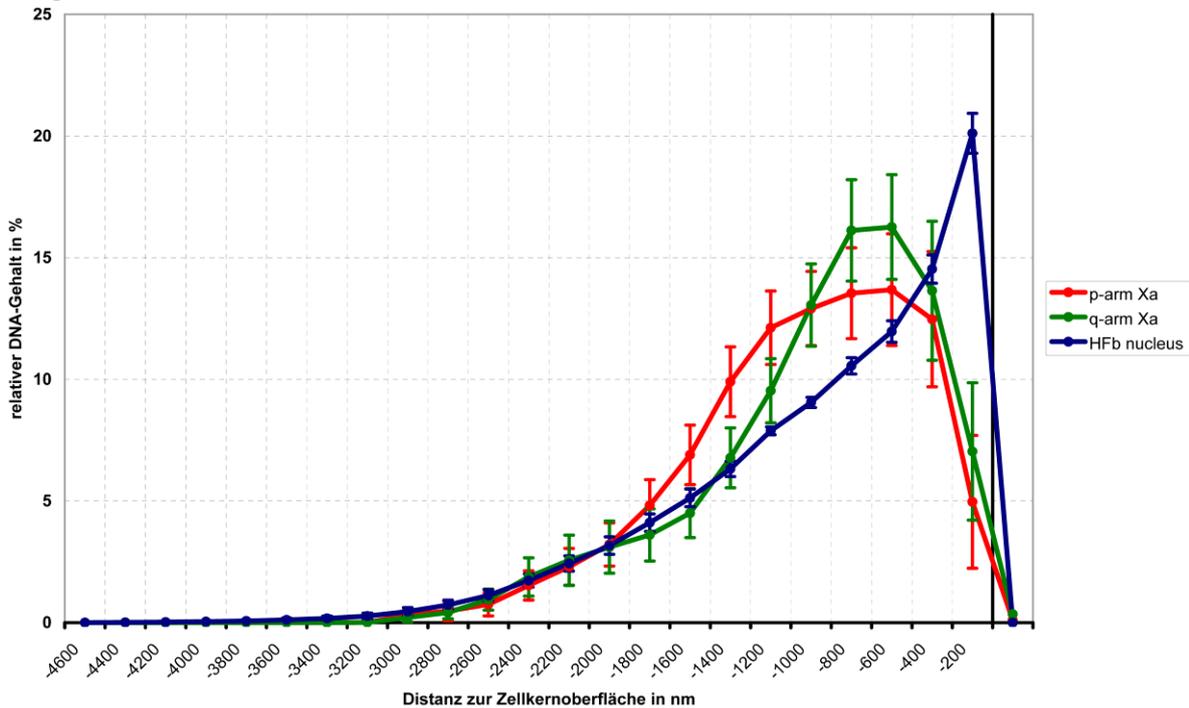


Abbildung 37: Radiale Verteilung der p- und q-Arme des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

p-Arm: rote Kurve, q-Arm: grüne Kurve, HFb Nucleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

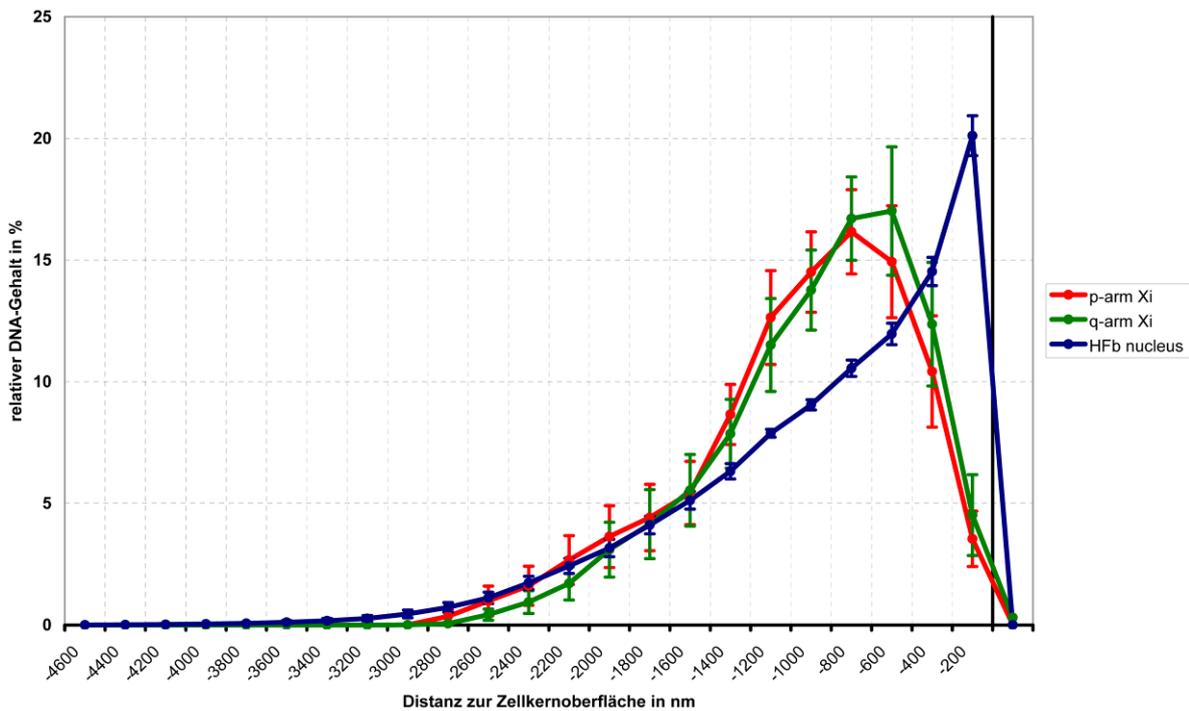


Abbildung 38: Radiale Verteilung der p- und q-Arme des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

p-Arm: rote Kurve, q-Arm: grüne Kurve, HFb Nucleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Im aktiven X-Chromosom ist der p-Arm (rote Kurve) tendenziell mehr zur Zellkernmitte orientiert als der q-Arm (statistisch nicht signifikant), während im inaktiven X-Chromosom kein Unterschied zwischen p- und q-Arm hinsichtlich ihrer Position im Zellkern humaner Fibroblasten besteht.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
p-Arm	23	-895.824	-806.226
q-Arm	23	-748.332	-680.073

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
p-q	0.312	0.59

Für das aktive X-Chromosom ergibt sich bei Durchführung des Mann-Whitney Rank Sum Test ein P-Wert von 0.312, für das inaktive X-Chromosom ergibt sich ein P-Wert von 0.59. Dies bedeutet, dass in beiden Chromosomen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem p- und q-Arm bezüglich ihrer Lage im humanen Fibroblastenzellkern vorhanden ist.

Schematisch ist die radiale Lokalisation von p- und q-Arm in der Abbildung 39 dargestellt.

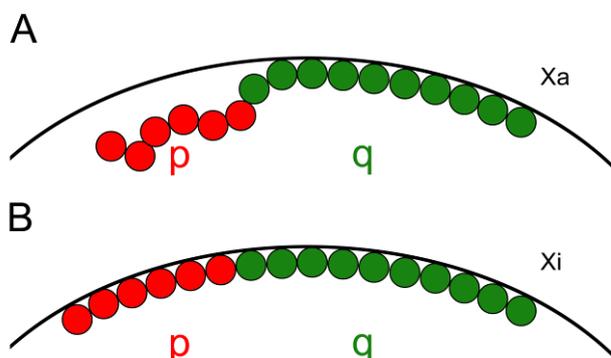


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Ergebnisse der radialen Verteilung der p- und q-Arme

A: radiale Verteilung der p- und q-Arme des aktiven X-Chromosoms

B: radiale Verteilung der p- und q-Arme des inaktiven X-Chromosoms

Der Zellkernrand ist als schwarze Linie dargestellt

3.6.2 Ko-Lokalisation von Xp und Xq im inaktiven X-Chromosom

Anhand von Maximum Intensity Projektionen der p- und q-Arme wurde festgestellt, dass sich die beiden Arme im inaktiven X-Chromosom mehr überlagern, als im aktiven X-Chromosom (Abb.40). Um diese Kolokalisation zu quantifizieren, wurde der sogenannte Manders-Koeffizient in 3D Bilderstapeln bestimmt (siehe Abschnitt 2.11.3).

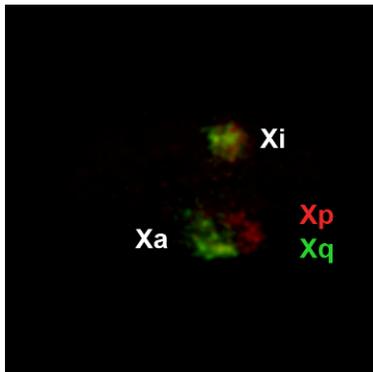


Abbildung 40: 3D Maximum Intensity Projektion der p- und q-Arme des X-Chromosoms

Hierbei ergaben sich folgende Manders-Werte:

Kern	M1 Xa	M2 Xa	M1 Xi	M2 Xi
1	0.276	0.297	0.946	0.583
2	0.998	0.138	0.585	0.413
3	0.168	0.29	0.839	0.563
4	0.731	0.556	0.739	0.355
5	0.715	0.256	0.932	0.669
6	0.596	0.309	0.898	0.661
7	0.676	0.533	0.911	0.581
8	0.156	0.189	0.173	1
9	0.144	0.416	0.725	0.394
10	0.815	0.329	0.669	0.391
11	0.697	0.48	0.657	0.453
12	0.675	0.322	0.864	0.693
13	0.713	0.554	0.78	0.552
14	0.617	0.484	0.776	0.497
15	0.61	0.383	0.716	0.549
16	0.465	0.504	0.806	0.893
17	0.379	0.087	0.908	0.649
18	0.233	0.171	0.389	0.214
19	0.706	0.397	0.793	0.563
20	0.86	0.41	0.947	0.676
21	0.832	0.368	0.824	0.58
22	0.586	0.24	0.818	0.82
23	0.659	0.488	0.789	0.892

Tabelle 4: Werte der Manders-Kolokalisationsanalyse

Die Manders-Werte liegen zwischen 0 und 1 (0% und 100%), wobei 0 keine Ko-Lokalisation und 1 volle Ko-Lokalisation bedeutet. M1 zeigt an, wieviel Prozent des p-Arms mit dem q-Arm kolokalisiert, M2 zeigt an, wieviel Prozent des q-Arms mit dem p-Arm kolokalisiert. Die Werte, die diese Auswertung ergaben, zeigen, dass sich die

beiden Chromosomen tatsächlich unterscheiden und Xp und Xq im inaktiven X-Chromosom mehr überlagern als im aktiven X-Chromosom. Der Unterschied zwischen den beiden Chromosomen ist statistisch signifikant. Schematisch kann man nun, basierend auf den bisherigen Ergebnissen, Xp und Xq im aktiven und inaktiven X-Chromosom wie folgt darstellen:

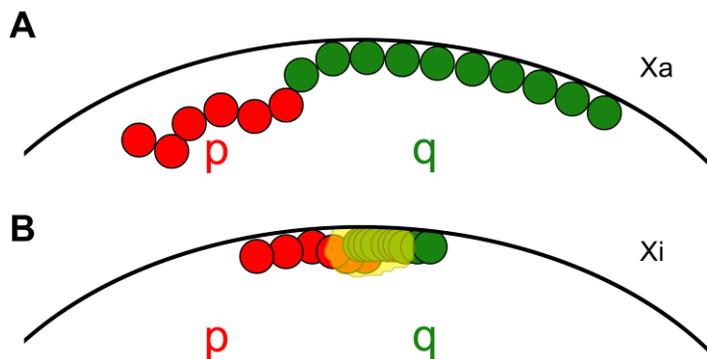


Abbildung 41: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse nach der Manders-Co-Lokalisationsanalyse

A: p- und q-Arm des aktiven X-Chromosoms

B: p- und q-Arm des inaktiven X-Chromosoms, die Überlagerung der beiden Arme ist schematisch als gelbe Wolke dargestellt.

Der Zellkernrand ist als schwarze Linie dargestellt.

3.7 Radiale Verteilung und Strukturanalysen der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

3.7.1 Radiale Verteilung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

Nachdem im vorherigen Versuch Xp und Xq als Ganzes untersucht wurden, wurde hier nun eine Untergliederung in Xp1, Xp2, Xq1 und Xq2 vorgenommen, um eine eventuelle bevorzugte Position von Untereinheiten der Arme des X-Chromosoms in humanen Fibroblastenzellkernen zu eruieren. Dafür wurden die Pools aus dem vorherigen Versuch in gleiche Teile aufgeteilt, verschieden gelabelt, auf humanen Metaphasen in einer 2D-FISH getestet (Abb.42A,B) und anschließend in einem 3D-FISH-Experiment auf humanen Fibroblasten (Abb.42C,D) untersucht. Nach der erfolgreichen 3D-FISH wurden 25 Zellkerne an einem konfokalen Leica SP5 als 3D-Bilderstapel aufgenommen, in ImageJ prozessiert und anschließend mit eADS ausgewertet.

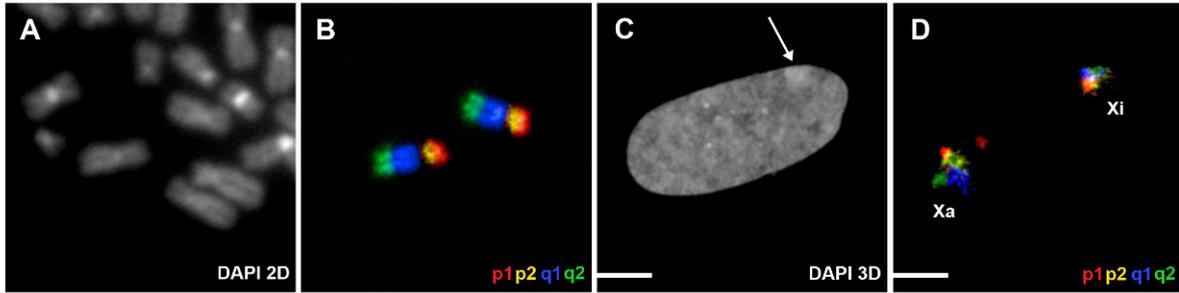


Abbildung 42: 2D- und 3D-FISH-Experiment mit den BAC-Pools p1, p2, q1 und q2 für die unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

A DAPI-Färbung einer Metaphase, B 2D-FISH der p1-(rot), p2-(gelb), q1-(blau) und q2-BAC-Pools (grün) auf einer humanen Metaphase, C DAPI-Färbung eines humanen Fibroblastenzellkerns (Maximum Intensity Projektion eines 3D-Bilderstapels), Pfeil: Barr-Body, D 3D-FISH der p1-(rot), p2-(gelb), q1-(blau) und q2-BAC-Pools (grün) auf humane Fibroblastenzellkerne (Maximum Intensity Projektion eines 3D-Bilderstapels)
Scalebar: 5µm

Im aktiven X-Chromosom sieht man wieder eine deutliche Verschiebung des p-Arms zur Zellkernmitte (Abb.43). Auch der erste Teil des q-Arms liegt deutlich weiter innen als der Rest des q-Arms, der am Zellkernrand lokalisiert ist (Abb.43), wohingegen im inaktiven X-Chromosom kein Unterschied zwischen den einzelnen Kurven zu erkennen ist (Abb.44). Die radiale Position des p1-, p2- und q1-BAC-Pools in Xa ist statistisch signifikant verschieden zur Position von q2 (P-Werte zwischen 0.017 und 0.001, siehe unten).

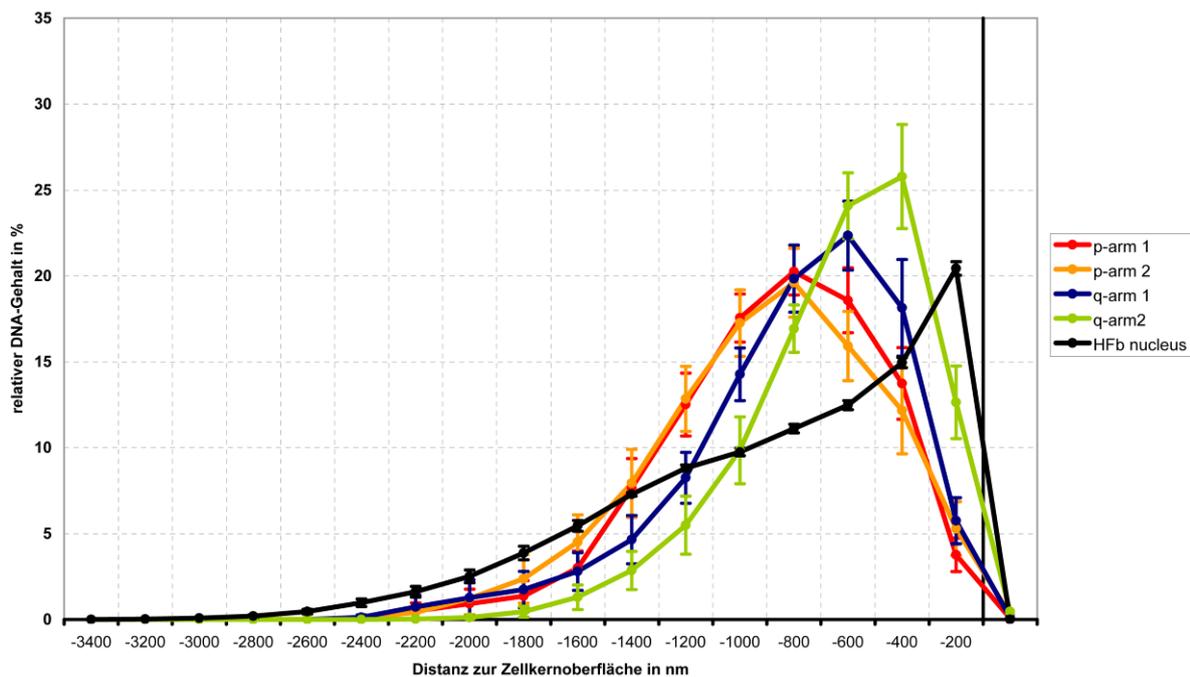


Abbildung 43: Radiale Verteilung von p1, p2, q1 und q2 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

p1: rote Kurve, p2: orange Kurve, q1: blaue Kurve, q2: grüne Kurve, HFb Nucleus: schwarze Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

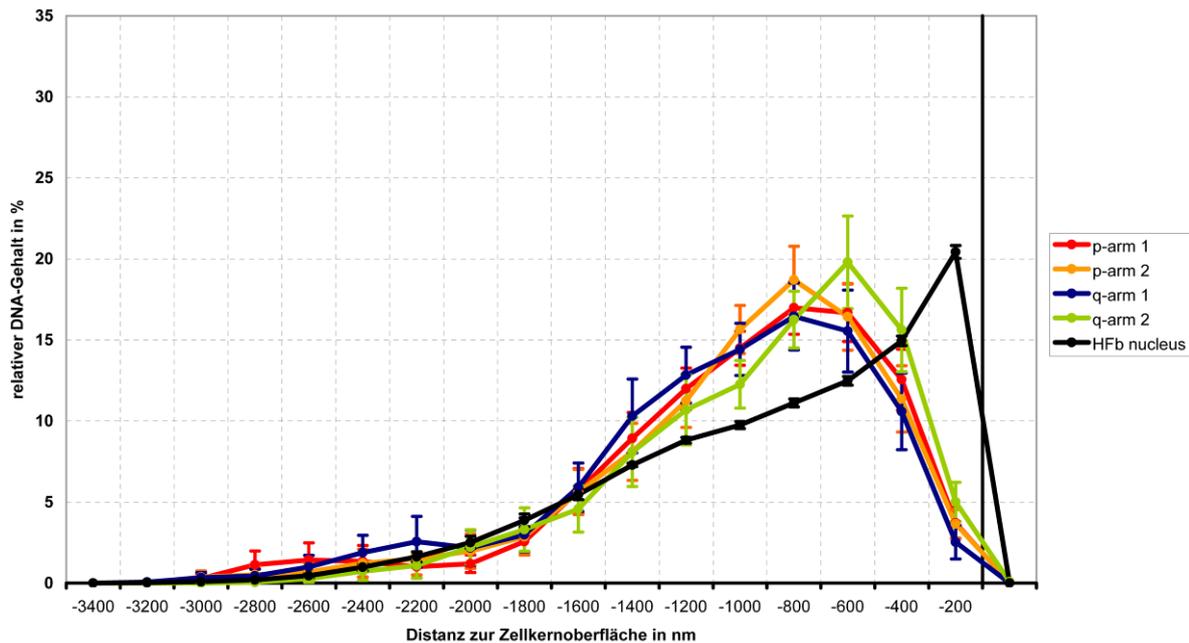


Abbildung 44: Radiale Verteilung von p1, p2, q1 und q2 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

p1: rote Kurve, p2: orange Kurve, q1: blaue Kurve, q2: grüne Kurve, HFb Nucleus: schwarze Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

In der Abbildung 45 sind die bisherigen Ergebnisse zur radialen Verteilung der p- und q-Arme des X-Chromosoms schematisch dargestellt.

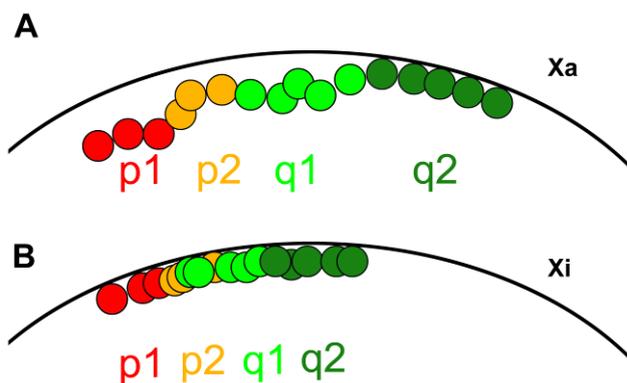


Abbildung 45: Schematische Darstellung des aktiven und inaktiven X-Chromosoms nach der Untersuchung der radialen Position der „halben Arme“ in humanen Fibroblasten

A „halbe Arme“ Xa
B „halbe Arme“ Xi
Der Zellkernrand ist als schwarze Linie dargestellt

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung anhand des Mann Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
p1	25	-764.853	-715.891
p2	25	-736.546	-700.000
q1	25	-600.000	-776.209
q2	25	-415.331	-600.000

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
p1-p2	0.992	0.907
p1-q1	0.146	0.635
p1-q2	<0.001	0.211
p2-q1	0.171	0.522
p2-q2	0.005	0.332
q1-q2	0.017	0.084

Die in Rot dargestellten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

3.7.2 Strukturanalyse der unterteilten Arme des X-Chromosoms

Um die Struktur der „halben Arme“ zu untersuchen, wurden die BAC-Pools aus dem vorherigen Versuch mit dem Programm *Distangles* ausgewertet. Dieses Programm bestimmt den Intensitätsschwerpunkt eines Signals in einem Farbkanal und berechnet Distanzen und Winkel zu allen Intensitätsschwerpunkten der anderen Farbkanäle (Abb.46). Somit kann ein Überblick über eventuelle Kondensation (Distanzen) beziehungsweise Faltung (Winkel) der DNA erlangt werden.

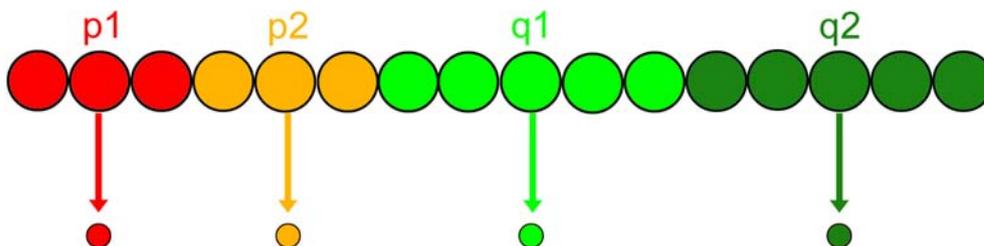


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Intensity Gravity Center der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

3.7.2.1 Kompaktierung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

Das Programm *Distangles* errechnet Distanzen zwischen einzelnen Intensitätsschwerpunkten der verschiedenen Farbkanäle. Hier wurden die vier BAC-Pools p1, p2, q1 und q2 untersucht (Abb.46), um festzustellen, ob es einen Unterschied in den Distanzen zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom gibt. Es wurden 25 Zellkerne untersucht.

In der Abbildung 47 sind die gemittelten Distanzen zwischen den einzelnen Intensitätsschwerpunkten schematisch dargestellt. Wie deutlich zu sehen ist, sind die Distanzen des inaktiven X-Chromosoms sehr viel kürzer, als die Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten des aktiven X-Chromosoms. Berechnet man die

absolute Länge aus den einzelnen Distanzen ergibt sich eine Länge von 3563.34 nm für das aktive X-Chromosom und eine Länge von 1902 nm für das inaktive X-Chromosom. Damit ist das aktive X-Chromosom, geht man von einer linearen Struktur aus, um 47% länger als das inaktive X-Chromosom. Der Unterschied zwischen den einzelnen Distanzen ist statistisch signifikant (P-Werte siehe unten).

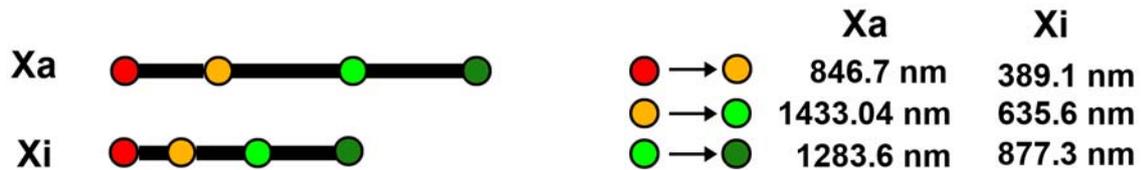


Abbildung 47: Darstellung der absoluten Distanzen zwischen den Intensity Gravity Centern der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

links: maßstabgetreue Abbildung der Distanzen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms

rechts: Auflistung der Distanzen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms

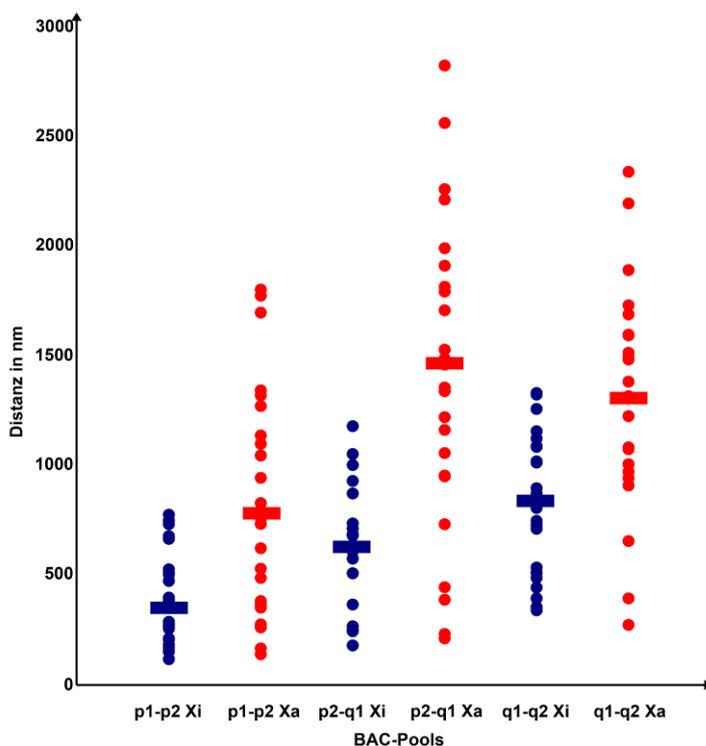


Abbildung 48: Verteilung der einzelnen Distanzen zwischen den Intensity Gravity Centern des aktiven (rot) und inaktiven (blau) X-Chromosoms

Abzisse: BAC-Pools

Ordinate: absolute Distanz in nm

rote und blaue Querbaiken: Mediane

Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Distanzen und ihre Mediane (Abb.48) ist ein ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom zu erkennen. Die Distanzen im inaktiven X-Chromosom besitzen eine weitaus geringere Spannweite und Variabilität als die Distanzen im aktiven X-Chromosom.

Statistische Auswertung:

Um auszuschließen, dass es sich hier um eine zufällige Verteilung der Distanzen handelt, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Mean Xa	Mean Xi	Median Xa	Median Xi	P-Wert
p1 – p2	25	846.672	389.099	777.743	351.124	<0.001
p2 – q1	25	1433.04	635.622	1458.493	636.258	<0.001
q1 – q2	25	1283.597	877.263	1303.911	841.167	0.003

Die in Rot dargestellten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

3.7.2.2 Faltung der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

Neben der Kompaktierung sollte die Frage geklärt werden, ob die einzelnen Teilstücke der Arme des aktiven und inaktiven X-Chromosoms gefaltet oder eher linear vorliegen. Daher wurden wieder die Intensitätsschwerpunkte der BAC-Pools p1, p2, q1 und q2 (Abb.49A) untersucht und diesmal die Winkel zwischen den einzelnen Punkten mit dem Programm Distangles bestimmt. Dabei konnte beobachtet werden, dass der Winkel p1-p2-q1 im inaktiven X-Chromosom statistisch signifikant (P-Werte siehe unten) kleiner ist, als der korrespondierende Winkel im aktiven X-Chromosom (Xi: 36.933°, Xa: 64.3°) (Abb.49B). Das heißt, das inaktive X-Chromosom ist an dieser Stelle enger gefaltet als das aktive X-Chromosom (Abb.49C). Der Winkel p2-q1-q2 ist im inaktiven X-Chromosom durchschnittlich größer als im aktiven X-Chromosom (Xi: 93.193°, Xa: 78.54°). Dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant.

Desweiteren wurden die Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten des ersten und des letzten BAC-Pools (p1 und q2) des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms miteinander verglichen, um zu untersuchen, ob sich die Telomere annähern und somit eine Faltung des X-Chromosoms nachzuweisen ist. Hierbei kam heraus, dass die Distanzen im aktiven X-Chromosom statistisch signifikant größer sind als im inaktiven X-Chromosom (P=0.004).

Statistische Auswertung:

Um die Winkel und die Distanzen auf ihre statistische Signifikanz zu überprüfen wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Winkel:

Pools	n	Mean Xa	Mean Xi	Median Xa	Median Xi	P-Wert
p1 – p2 – q1	25	64.304	36.933	53.083	79.197	0.048
p2 – q1 – q2	25	78.539	93.193	30.806	87.433	0.269

Distanzen:

Pools	n	Mean Xa	Mean Xi	Median Xa	Median Xi	P-Wert
p1 – q2	25	1526.8623	919.138	1354.58	877.165	0.004

Der in Rot dargestellte P-Wert ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

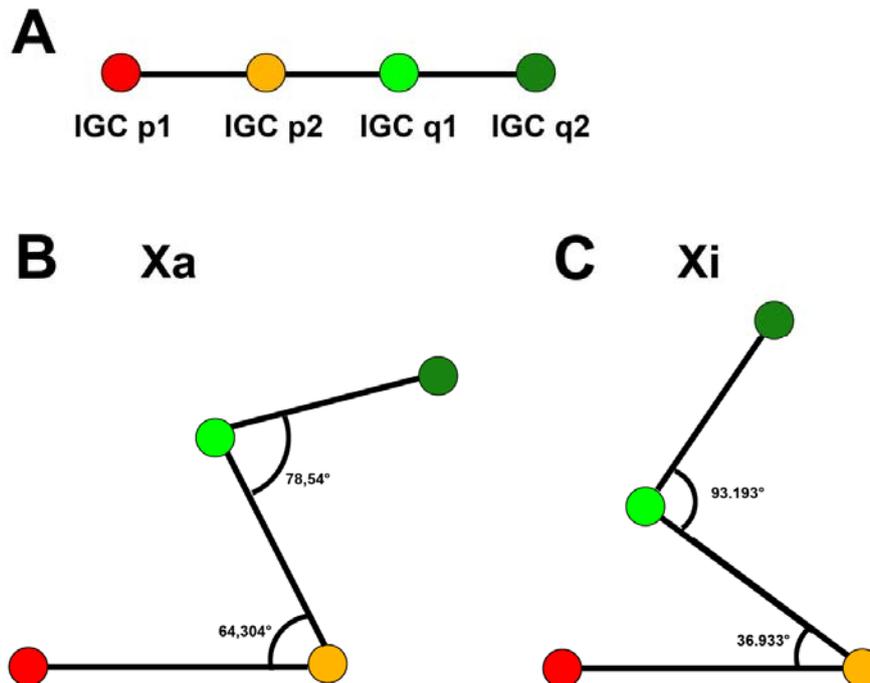


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Winkel zwischen den Intensity Gravity Centern der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

A lineare Darstellung

B und **C** Maßstabsgetreue Darstellung der durchschnittlichen Winkel zwischen den Intensity Gravity Centern der „halben Arme“ des aktiven (B) und inaktiven (C) X-Chromosoms.

3.7.2.3 Zusammenfassende Darstellung der Distanzen und Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der halben Arme

In der Abbildung 50 sind die errechneten durchschnittlichen Distanzen und Winkel in einer schematischen Darstellung gezeigt. Die schwarz gezeichneten Distanzen sowie die Winkel sind wirklichkeitstreu dargestellt.

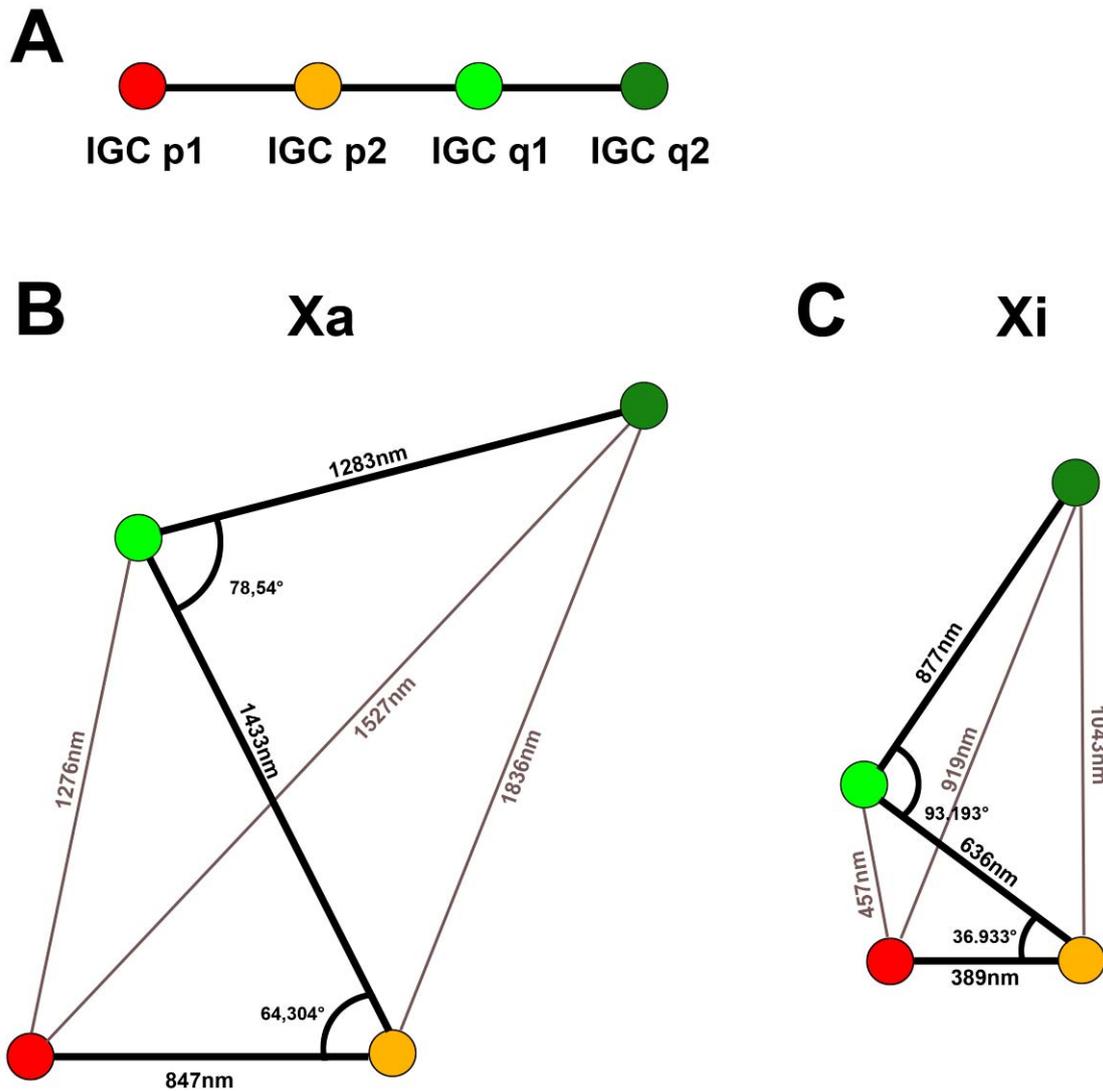


Abbildung 50: Zusammenfassende schematische Darstellung der Distanzen und Winkel zwischen den Intensity Gravity Centern der unterteilten Chromosomenarme des X-Chromosoms

A lineare Darstellung

B und C Darstellung der Distanzen und Winkel zwischen den Intensity Gravity Centern der „halben Arme“ des aktiven (B) und inaktiven (C) X-Chromosoms. Die schwarzen Linien sowie die Winkel sind maßstabsgetreu dargestellt.

3.8 Das X-Chromosom in 10Mb-Stücken

3.8.1 Radiale Verteilung der 10Mb-Stücke des gesamten X-Chromosoms

Nachdem die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, dass sich bestimmte Bereiche des (aktiven) X-Chromosoms tendenziell weiter zur Zellkernmitte hin orientieren, wurde das X-Chromosom in 15 10Mb große Stücke (Pool 1-15) und ein 5Mb (Pool 16) großes Stück aufgeteilt und BAC-Pools erstellt, die in 1Mb-Schritten

das gesamte X-Chromosom abdecken, um die Bereiche, die mehr im Inneren des Zellkerns liegen genauer lokalisieren zu können. In 5 verschiedenen Versuchen, die jeweils 4 angrenzende BAC-Pools beinhalten und jeweils einen überlappenden Pool wurde das gesamte X-Chromosom untersucht (Abb.51).

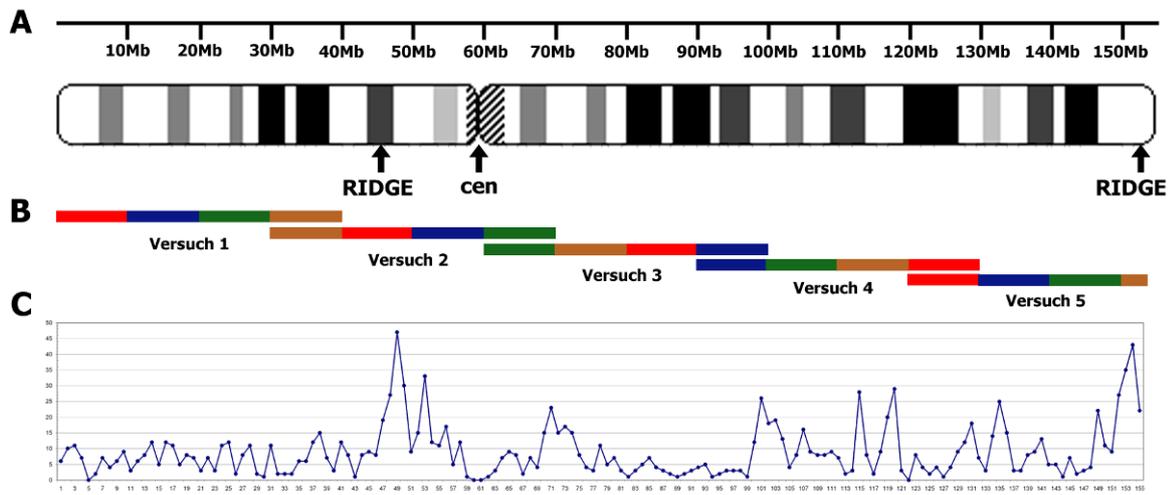


Abbildung 51: Schematische Darstellung der 10Mb-Pools

A Ideogramm des humanen X-Chromosoms

B Aufteilung der 10Mb-Pools in den verschiedenen Versuchsansätzen

C Gendichte des X-Chromosoms in 1Mb-Schritten

Von jedem Versuch wurden 2D-FISH-Experimente gemacht und anschließend, nach einer erfolgreichen Hybridisierung 3D-FISH-Experimente von denen zwischen 20 und 30 Zellkerne als 3D-Bilderstapel an einem konfokalen Leica SP5 aufgenommen, in ImageJ bearbeitet und mit dem Programm eADS ausgewertet wurden. Eine Beispielabbildung einer 2D-FISH und einer 3D-FISH ist in Abbildung 52 zu sehen.

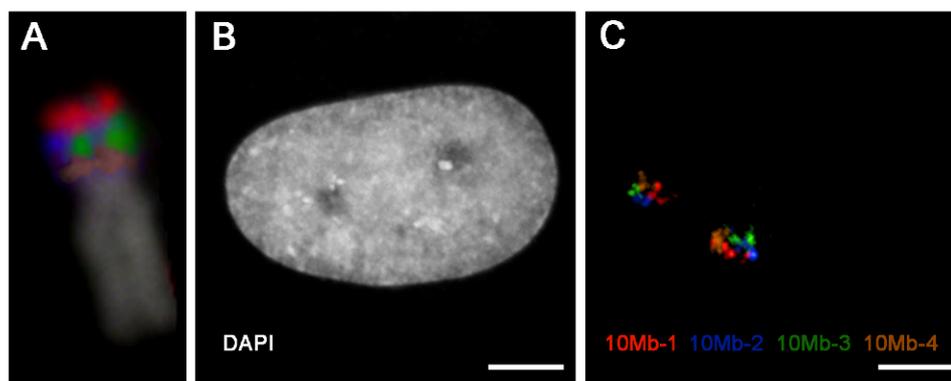


Abbildung 52: Beispiel einer 2D- und 3D-FISH mit 10Mb-Pools

A X-Chromosom nach einer 2D-FISH mit Sonden für die ersten 40Mb des X-Chromosoms

B Z-Projektion der DAPI-Färbung nach der 3D-FISH

C Z-Projektion der Signale der ersten 4 10Mb-Pools nach der 3D-FISH

Scalebar: 5µm

3.8.1.1 Radiale Verteilung von Mb 1 – Mb 40 des X-Chromosoms (Versuch 1)

Im ersten Teil dieses Versuchs wurden die ersten 40Mb des X-Chromosoms (Abb.51B) auf Xp hinsichtlich ihrer radialen Verteilung innerhalb des Fibroblastenzellkerns untersucht. Die Gendichte innerhalb dieser 40Mb beträgt 6.3 Gene/Mb und liegt damit unter der durchschnittlichen Gendichte des X-Chromosoms (8.6 Gene/Mb). Ansonsten sind in diesem Teil des X-Chromosoms keine Besonderheiten vorhanden. In den Abbildungen 53 und 54 sind die Ergebnisse der radialen Auswertung mit dem Programm eADS dargestellt. Es wurden 26 Zellkerne ausgewertet.

Im aktiven X-Chromosom (Abb.53) fällt auf, dass die Werte des zweiten BAC-Pools (11-20Mb, blaue Kurve) etwas weiter innerhalb des Zellkerns liegen als die Werte der anderen BAC-Pools. Vergleicht man die Werte des 11-20Mb-BAC-Pools mit denen des 21-30Mb-BAC-Pools (grüne Kurve) bekommt man einen statistisch signifikanten Unterschied ($P=0.049$). Zwischen den anderen Pools liegt kein statistisch signifikanter Unterschied vor (P -Werte siehe unten).

Im inaktiven X-Chromosom (Abb.54) unterscheiden sich die Werte der einzelnen BAC-Pools nicht signifikant voneinander (P -Werte siehe unten).

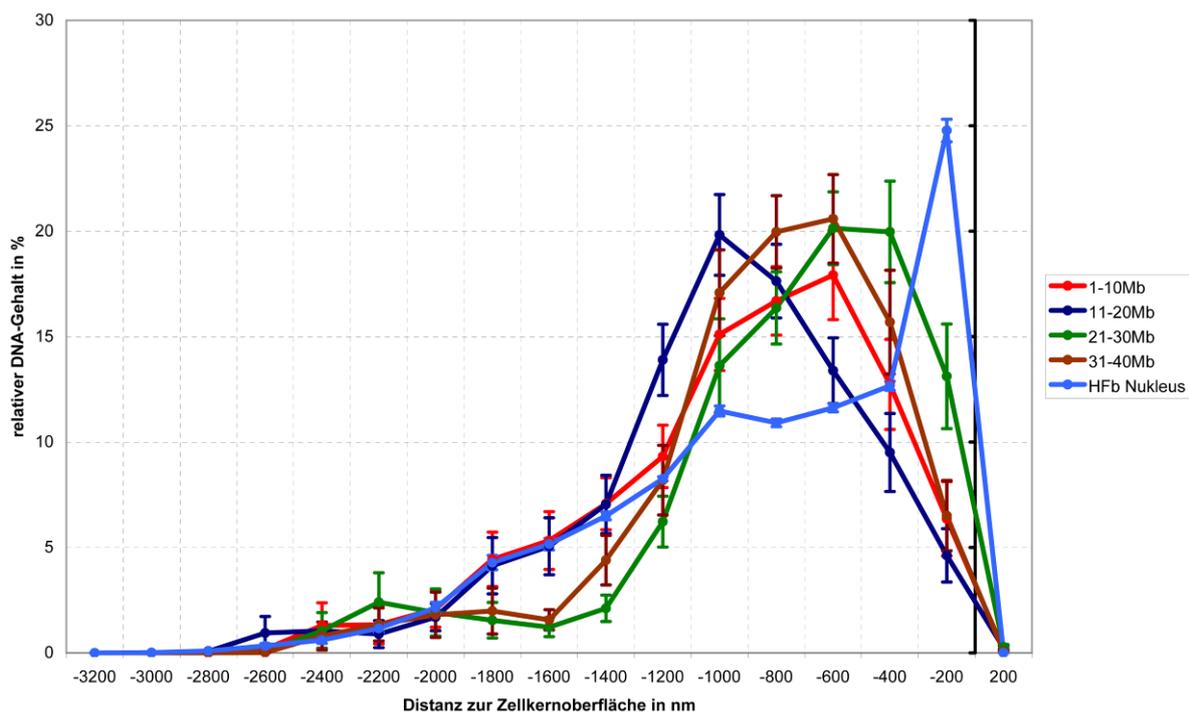


Abbildung 53: radiale Verteilung von Mb 1 – Mb 40 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

1Mb – 10Mb: rote Kurve, 11Mb – 20Mb: blaue Kurve, 21Mb – 30Mb: grüne Kurve, 31 – 40Mb: braune Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

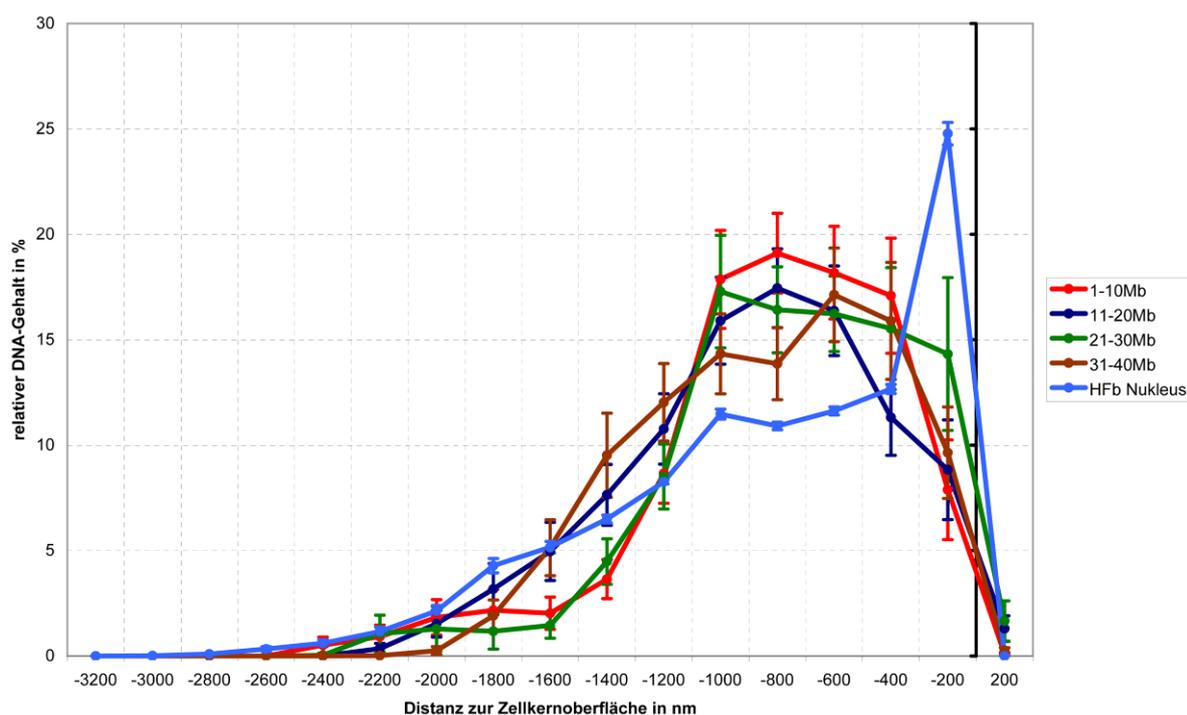


Abbildung 54: radiale Verteilung von Mb 1 – Mb 40 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

1Mb – 10Mb: rote Kurve, 11Mb – 20Mb: blaue Kurve, 21Mb – 30Mb: grüne Kurve, 31 – 40Mb: braune Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung

Mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests wurde untersucht, ob sich die einzelnen BAC-Pools hinsichtlich ihrer radialen Verteilung innerhalb des Fibroblastenzellkerns unterscheiden oder ob sie zufällig verteilt sind. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi	Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
1-10Mb	26	-697.511	-687.095	1-10Mb – 11-20Mb	0.949	0.595
11-20Mb	26	-808.407	-738.969	1-10Mb – 21-30Mb	0.056	0.536
21-30Mb	26	-537.540	-679.866	1-10Mb – 31-40Mb	0.426	0.826
31-40Mb	26	-643.039	-669.343	11-20Mb – 21-30Mb	0.049	0.269
				11-20Mb – 31-40Mb	0.385	0.634
				21-30Mb – 31-40Mb	0.288	0.408

Der in Rot dargestellte P-Wert ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

3.8.1.2 Radiale Verteilung von Mb 31 – Mb 70 des X-Chromosoms (Versuch 2)

Im zweiten Teil des Versuches wurde die Region von Mb 31 bis Mb 70 untersucht. Innerhalb dieser Region befinden sich das RIDGE Xp, welches von dem BAC-Pool 41-50Mb umspannt wird, sowie das Centromer des X-Chromosoms (Abb.51B). Die Gendichte innerhalb dieser 40Mb beträgt 9.4 Gene/Mb und liegt somit über der durchschnittlichen Gendichte des X-Chromosoms (8.6 Gene/Mb). In die Auswertung mit dem Programm eADS wurden 24 Zellkerne einbezogen.

Im aktiven X-Chromosom sind alle BAC-Pools dieses Versuchs nahezu gleich im Zellkern verteilt (Abb.55). Der BAC-Pool 51-60Mb, der an das RIDGE anschließt und zum Centromer hin geht ist etwas mehr nach Innen verlagert. Allerdings ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant verschieden (P-Werte siehe unten).

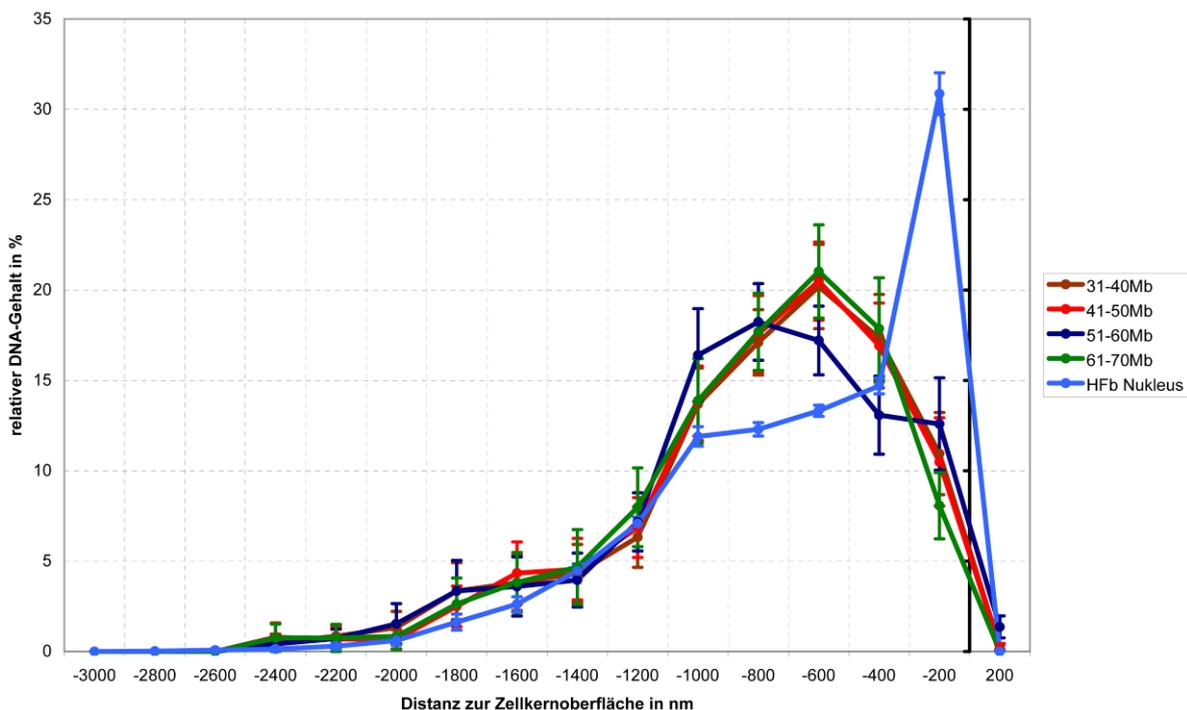


Abbildung 55: radiale Verteilung von Mb 31 – Mb 70 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

31Mb – 40Mb: braune Kurve, 41Mb – 50Mb: rote Kurve, 51Mb – 60Mb: blaue Kurve, 61 – 70Mb: grüne Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Im inaktiven X-Chromosom sieht die Situation ähnlich aus. Auch hier sind keine Unterschiede zwischen den einzelnen BAC-Pools hinsichtlich ihrer radialen Verteilung im Zellkern humaner Fibroblasten zu sehen (Abb.56).

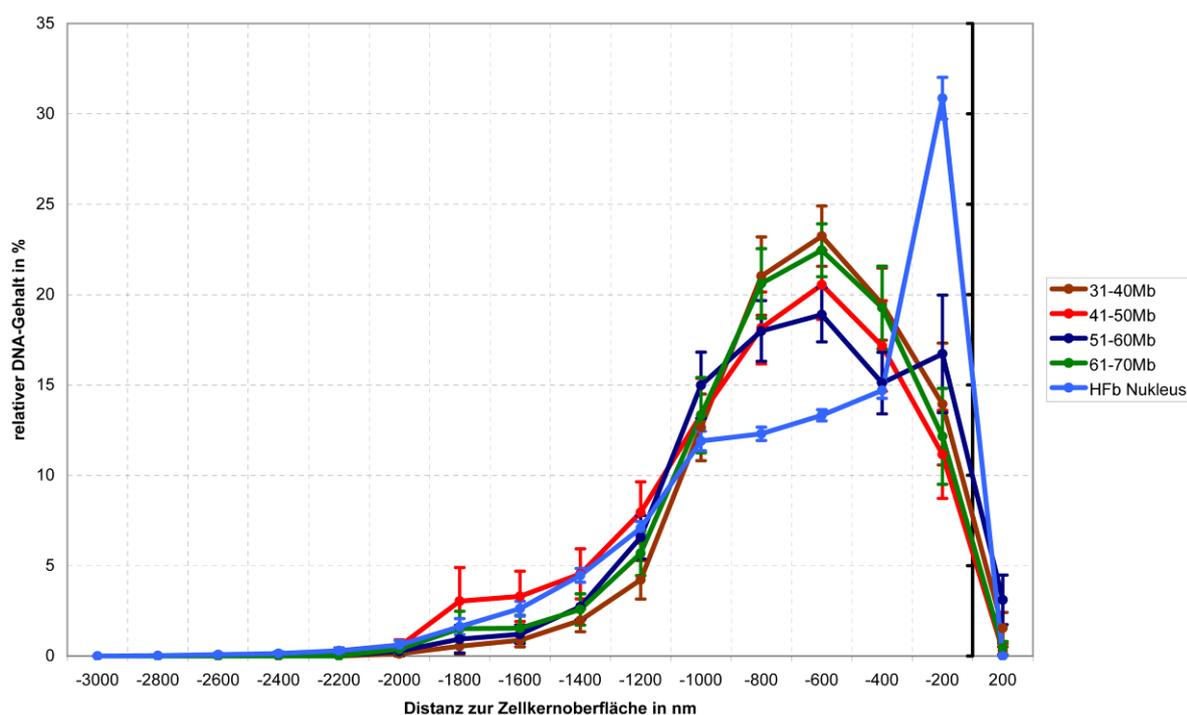


Abbildung 56: radiale Verteilung von Mb 31 – Mb 70 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

31Mb – 40Mb: braune Kurve, 41Mb – 50Mb: rote Kurve, 51Mb – 60Mb: blaue Kurve, 61 – 70Mb: grüne Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Auch hier wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
31-40Mb	24	-535.365	-555.875
41-50Mb	24	-594.395	-573.591
51-60Mb	24	-620.998	-593.221
61-70Mb	24	-578.424	-509.917

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
31-40Mb – 41-50Mb	0.711	0.293
31-40Mb – 51-60Mb	0.680	0.984
31-40Mb – 61-70Mb	0.695	0.680
41-50Mb – 51-60Mb	0.926	0.386
41-50Mb – 61-70Mb	0.885	0.464
51-60Mb – 61-70Mb	0.926	0.773

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% liegt kein signifikanter Unterschied vor.

3.8.1.3 Radiale Verteilung von Mb 61 – Mb 100 des X-Chromosoms (Versuch 3)

Der dritte Teil des Versuchs erstreckt sich von Mb 61 bis Mb 100 des X-Chromosoms. In diesem Bereich liegt die Gendichte bei lediglich 5.4 Genen/Mb. Es handelt sich hierbei um eine der genärmsten Regionen des X-Chromosoms. Die radiale Verteilung der verschiedenen BAC-Pools innerhalb des Fibroblastenzellkerns wurde anhand des Programms eADS ermittelt. In die Auswertung wurden 25 Zellkerne einbezogen.

In den Abbildungen 57 und 58 sind die Ergebnisse dieser Auswertung zu sehen. Hier kann man weder im aktiven (Abb.57) noch im inaktiven (Abb.58) X-Chromosom Unterschiede in der radialen Verteilung der BAC-Pools erkennen. Alle Pools sind zufällig verteilt (P-Werte siehe unten).

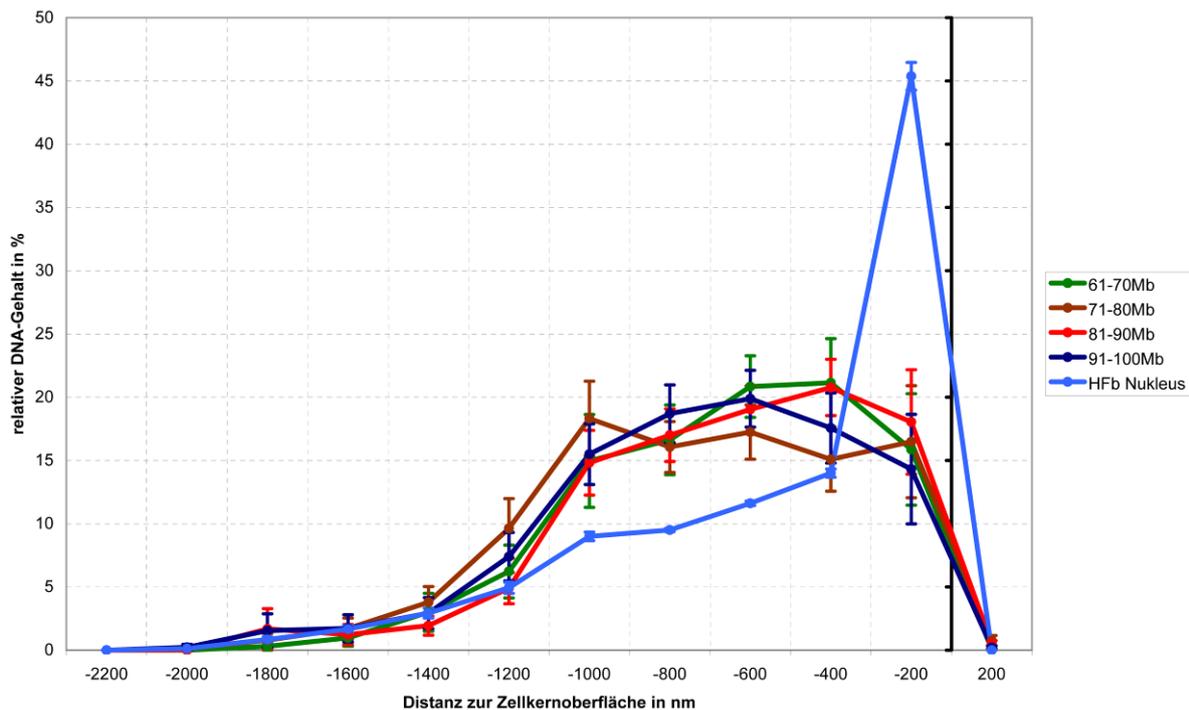


Abbildung 57: radiale Verteilung von Mb 61 – Mb 100 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

61Mb – 70Mb: grüne Kurve, 71Mb – 80Mb: braune Kurve, 81Mb – 90Mb: rote Kurve, 91 – 100Mb: blaue Kurve, HFb Nucleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

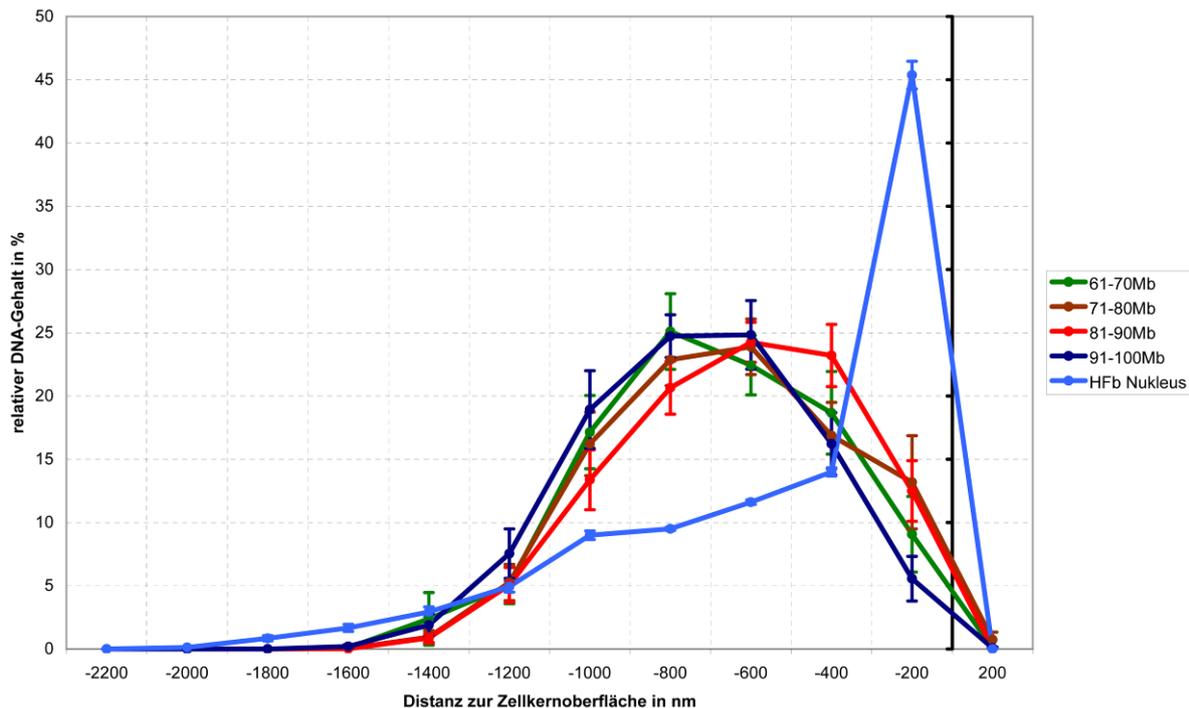


Abbildung 58: radiale Verteilung von Mb 61 – Mb 100 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

61Mb – 70Mb: grüne Kurve, 71Mb – 80Mb: braune Kurve, 81Mb – 90Mb: rote Kurve, 91 – 100Mb: blaue Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung

Um eine nicht zufällige Verteilung der BAC-Pools hier ausschließen zu können wurde der Mann Whitney Rank Sum angewandt und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi	Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
61-70Mb	25	-514.684	-600.333	61-70Mb – 71-80Mb	0.655	0.473
71-80Mb	25	-647.765	-541.202	61-70Mb – 81-90Mb	0.793	0.295
81-90Mb	25	-492.849	-482.597	61-70Mb – 91-100Mb	0.641	0.600
91-100Mb	25	-624.820	-576.975	71-80Mb – 81-90Mb	0.372	0.516
				71-80Mb – 91-100Mb	0.869	0.187
				81-90Mb – 91-100Mb	0.541	0.060

3.8.1.4 Radiale Verteilung von Mb 91 – Mb 130 des X-Chromosoms (Versuch 4)

Der vierte Teil dieses Versuchs erstreckt sich von Mb 91 bis Mb 130 und beinhaltet sowohl genreichere als auch genärmere Regionen (Abb.51B). Die Gendichte liegt deshalb bei 7.5 Genen/Mb, was der durchschnittlichen Gendichte des X-Chromosoms (8.6 Gene/Mb) sehr nahe kommt.

In die Auswertung mit dem Programm eADS wurden 23 Zellkerne einbezogen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 59 und 60 gezeigt.

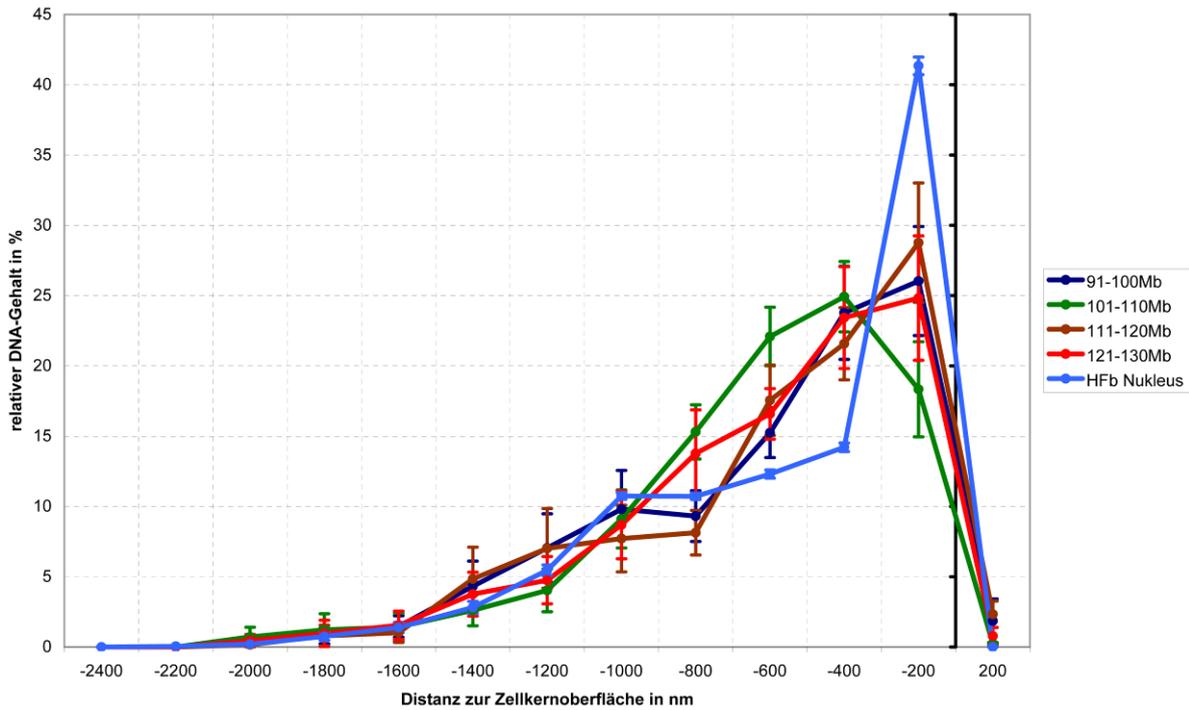


Abbildung 59: radiale Verteilung von Mb 91 – Mb 130 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

91Mb – 100Mb: blaue Kurve, 101Mb – 110Mb: grüne Kurve, 111Mb – 120Mb: braune Kurve, 121 – 130Mb: rote Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

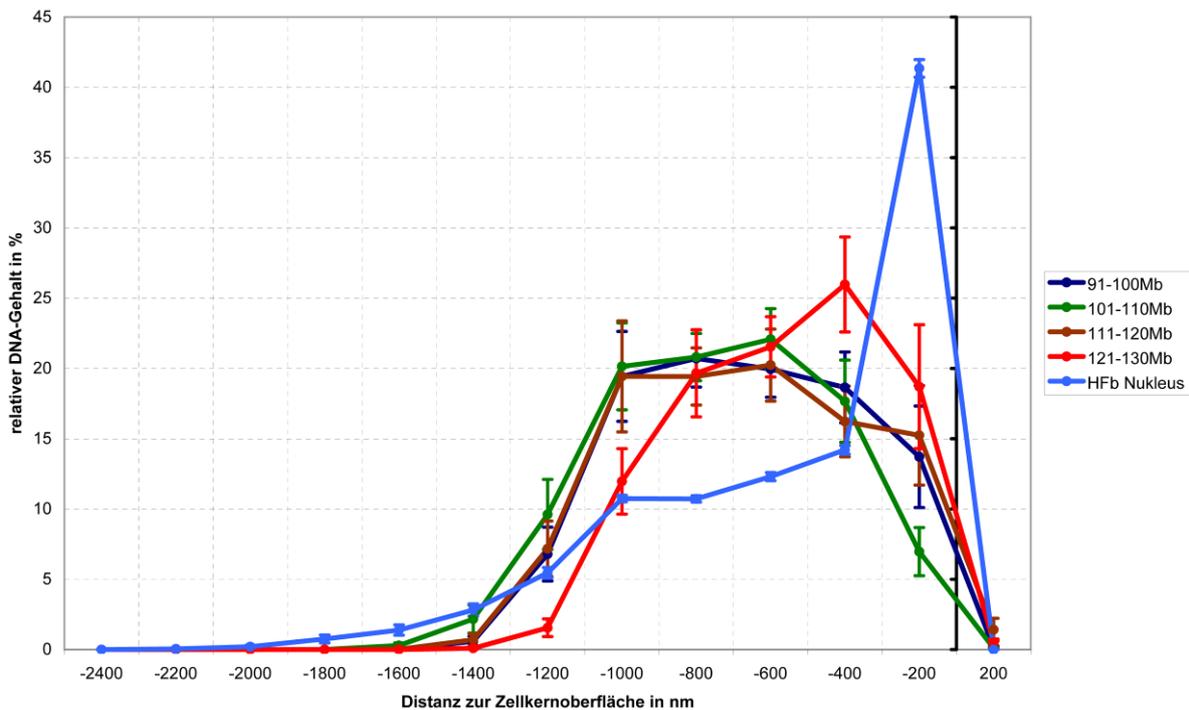


Abbildung 60: radiale Verteilung von Mb 91 – Mb 130 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

91Mb – 100Mb: blaue Kurve, 101Mb – 110Mb: grüne Kurve, 111Mb – 120Mb: braune Kurve, 121 – 130Mb: rote Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Die BAC-Pools von 91-130Mb auf dem aktiven X-Chromosom zeigen keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Verteilung innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten (P-Werte siehe unten).

Im inaktiven X-Chromosom liegt der Pool 101-110Mb signifikant weiter innen als der Pool 121-130Mb. Zwischen den anderen BAC-Pools besteht kein Unterschied in ihrer radialen Position im Zellkern (P-Werte siehe unten).

Pools	n	Median Xa	Median Xi	Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
91-100Mb	23	-300.000	-632.772	91-100Mb – 101-110Mb	0.244	0.455
101-110Mb	23	-432.897	-585.577	91-100Mb – 111-120Mb	0.895	0.801
111-120Mb	23	-335.261	-545.985	91-100Mb – 121-130Mb	0.921	0.079
121-130Mb	23	-332.566	-460.977	101-110Mb – 111-120Mb	0.121	0.380
				101-110Mb – 121-130Mb	0.318	0.017
				111-120Mb – 121-130Mb	0.758	0.160

Der in Rot dargestellte P-Wert ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

3.8.1.5 Radiale Verteilung von Mb 121– Mb 155 des X-Chromosoms (Versuch 5)

Im fünften und letzten Teil des Versuches wurde die Region von 121-155Mb untersucht. Der letzte BAC-Pool (Pool 16) ist kein 10Mb-Pool, sondern umspannt lediglich die letzten 5Mb des X-Chromosoms und somit das RIDGE Xq. Außerdem befindet sich in diesem Abschnitt die pseudoautosomale Region 2 (Abb.51B). Hier wurden 23 Zellkerne mittels eADS ausgewertet.

Sowohl im aktiven (Abb.61) als auch im inaktiven (Abb.62) X-Chromosom kann kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der einzelnen BAC-Pools innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten nachgewiesen werden (P-Werte siehe unten). Demnach liegt das RIDGE Xq nicht weiter im Inneren des Zellkerns als die genarnen Bereiche, die die anderen Pools umspannen.

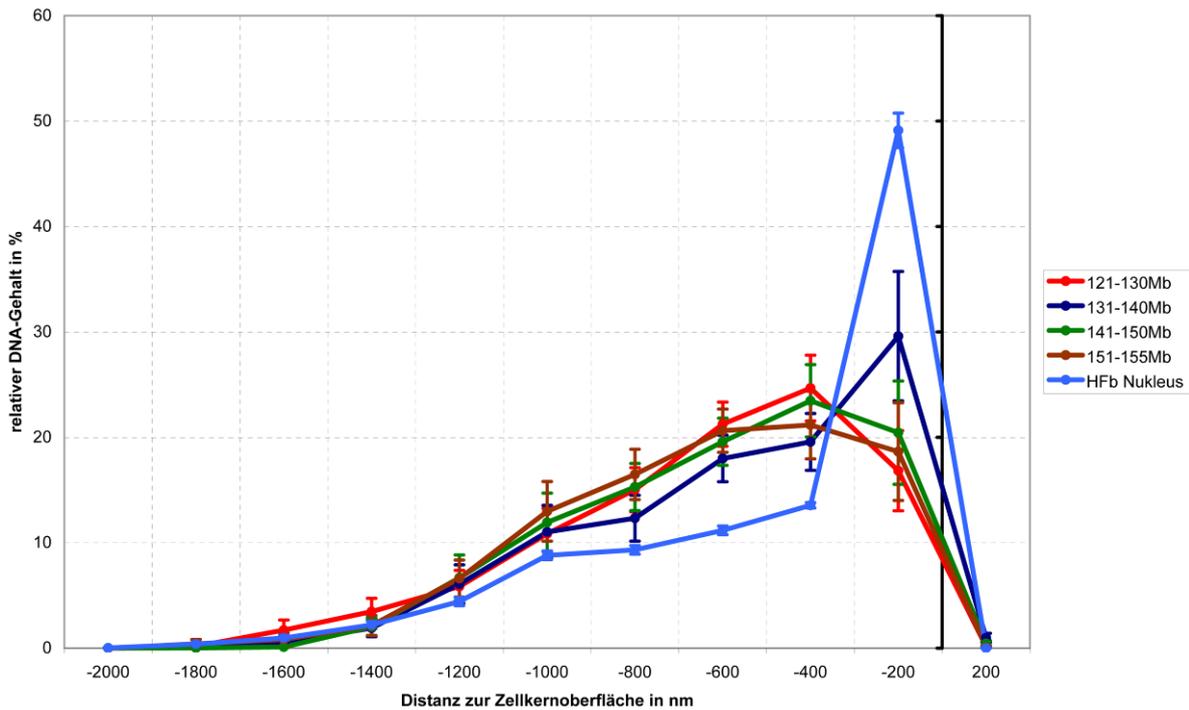


Abbildung 61: radiale Verteilung von Mb 121 – Mb 155 des aktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

121Mb – 130Mb: rote Kurve, 131Mb – 140Mb: blaue Kurve, 141Mb – 150Mb: grüne Kurve, 151 – 155Mb: braune Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

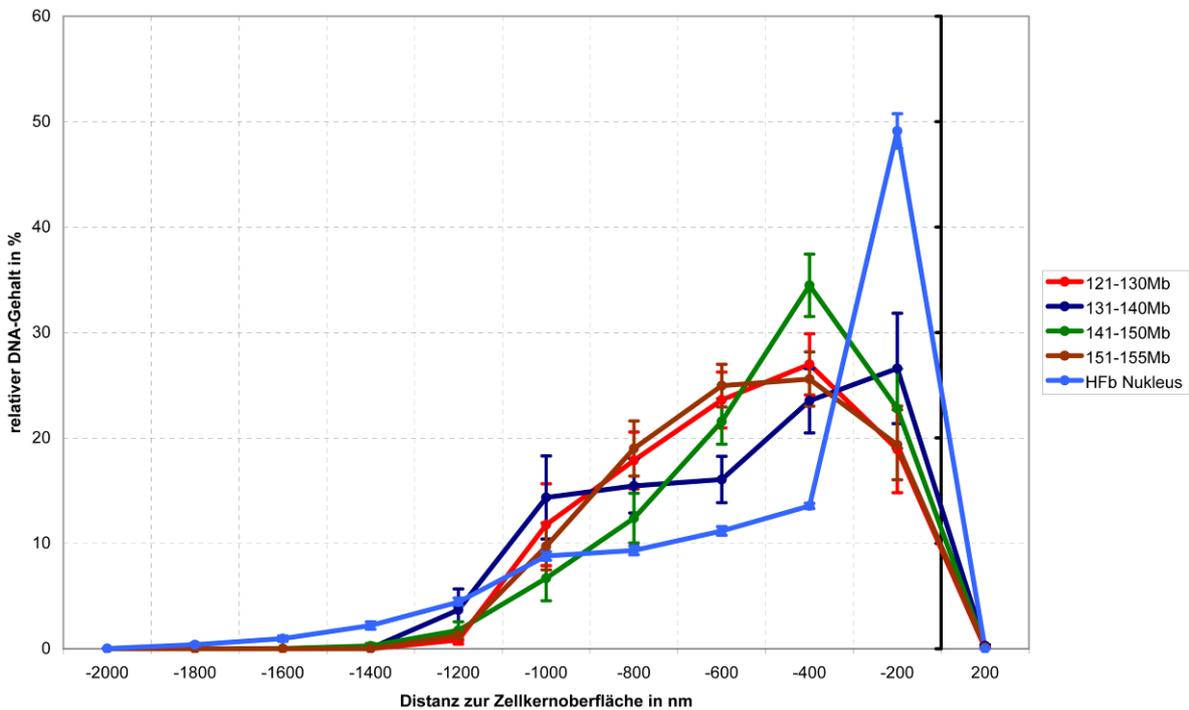


Abbildung 62: radiale Verteilung von Mb 121 – Mb 155 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern humaner Fibroblasten

121Mb – 130Mb: rote Kurve, 131Mb – 140Mb: blaue Kurve, 141Mb – 150Mb: grüne Kurve, 151 – 155Mb: braune Kurve, HFb Nukleus: hellblaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Der Mann Whitney Rank Sum-Test ergab folgende Ergebnisse:

Pools	n	Median Xa	Median Xi	Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
121-130Mb	24	-452.659	-449.889	121-130Mb – 131-140Mb	0.318	0.725
131-140Mb	24	-433.705	-335.261	121-130Mb – 141-150Mb	0.750	0.350
141-150Mb	24	-505.371	-353.553	121-130Mb – 151-155Mb	0.904	0.991
151-155Mb	24	-441.475	-406.079	131-140Mb – 141-150Mb	0.429	0.733
				131-140Mb – 151-155Mb	0.292	0.676
				141-150Mb – 151-155Mb	0.767	0.263

3.8.1.6 Schematische Zusammenfassung der radialen Verteilung der 10Mb-Pools des gesamten X-Chromosoms

In der Abbildung 63 sind die Distanzen der einzelnen 10Mb-BAC-Pools von 1-155Mb dargestellt. Wie man deutlich erkennen kann, besteht kein großer Unterschied in der radialen Verteilung der Pools sowohl innerhalb des aktiven (Abb.63A) und des inaktiven (Abb.63B) X-Chromosoms als auch zwischen den beiden Chromosomen (Abb.63C).

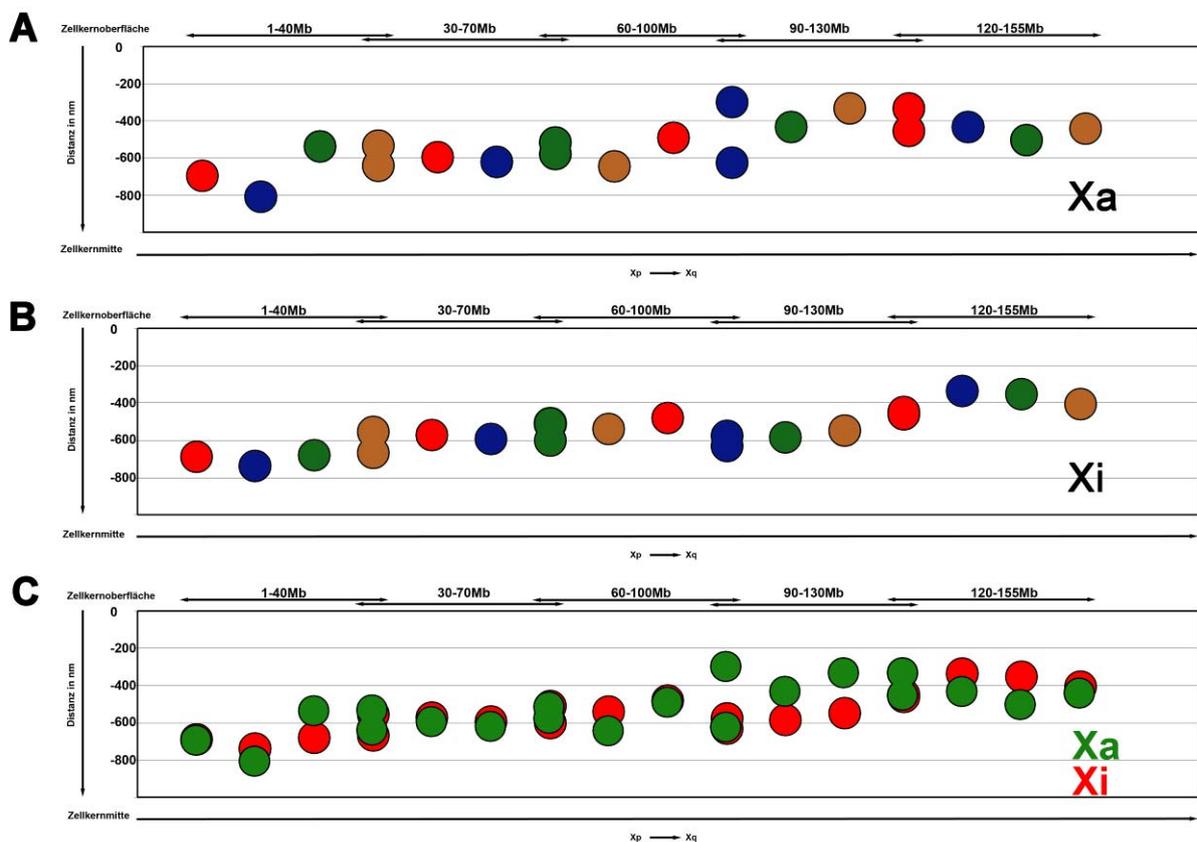


Abbildung 63: Darstellung der durchschnittlichen Distanzen der 10-Mb-Pools vom Zellkernrand zur Zellkernmitte

A Xa, B Xi, C Überlagerung von Xa und Xi

Distanzen in nm, doppelte Punkte entsprechen den überlappend verwendeten Pools

3.8.2 Strukturanalysen der 10 Mb-Pools des gesamten X-Chromosoms

Die Struktur der 10Mb-BAC-Pools wurde mit dem Programm *Distangles* untersucht. Dieses Programm bestimmt den Intensitätsschwerpunkt eines Signals (Abb.64) in einem Farbkanal und berechnet Distanzen und Winkel zu allen Intensitätsschwerpunkten der anderen Farbkanäle. Somit kann ein Überblick über eventuelle Kondensation (Distanzen) beziehungsweise Faltung (Winkel) der DNA erlangt werden. Hierfür wurden die 3D-Bilderstapel aus den vorherigen Versuchen ausgewertet.

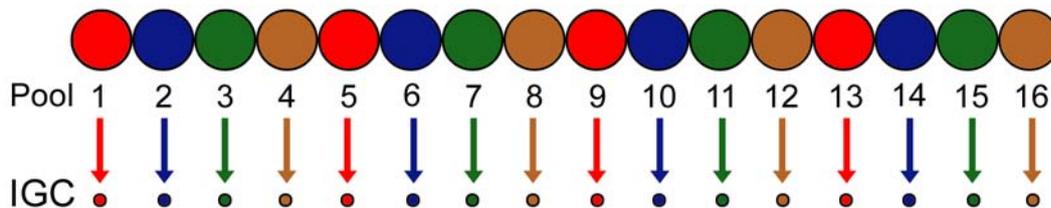


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Intensity Gravity Center der 10Mb-Pools des gesamten X-Chromosoms

3.8.2.1 Kompaktierung des X-Chromosoms

Das Programm *Distangles* errechnet Distanzen zwischen einzelnen Intensitätsschwerpunkten der verschiedenen Farbkanäle. Hier wurden die Intensitätsschwerpunkte der 16 BAC-Pools untersucht (Abb.64), um festzustellen, ob es einen Unterschied in den Distanzen und somit in der Kompaktierung zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom gibt. In der Abbildung 65 sind die absoluten Distanzen zwischen den einzelnen BAC-Pools wirklichkeitsgetreu in 2D dargestellt.

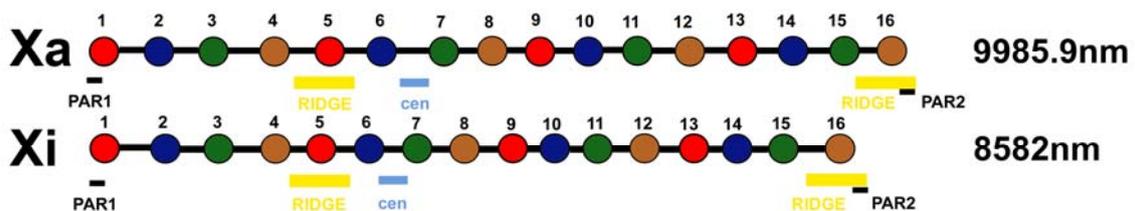


Abbildung 65: Maßstabsgetreue Darstellung der absoluten Distanzen zwischen den Intensity Gravity Centern der 10Mb-Pools des aktiven und inaktiven X-Chromosoms

Das aktive X-Chromosom hat eine absolute Länge von 9985.9nm in 2D, das inaktive X-Chromosom ist 8582nm lang. Das entspricht einem Unterschied von 14.06%. Die Distanzen zwischen den BAC-Pools 4 und 5 des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms besteht ein signifikanter Unterschied. Das heißt, das RIDGE auf dem aktiven X-Chromosom ist weniger kompakt als das RIDGE auf dem inaktiven X-Chromosom ($P=0.038$). Des Weiteren bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Distanzen der BAC-Pools 6 und 7 ($P=0.001$), welche das Centromer des X-Chromosoms umspannen und zwischen den BAC-Pools 9-10 ($P=0.010$) sowie 10-11. ($P=0.012$). Die Distanzen des inaktiven X-Chromosoms sind jeweils kürzer als die des aktiven X-Chromosoms. Geht man von einer Länge von 0.34nm/Basenpaar aus (Wakelin, McFadyen et al. 1984) und von einer genomischen Länge zwischen den Intensitätsschwerpunkten der 10Mb-Stücke von ca 150Mb hat das X-Chromosom eine genomische Länge in der 2nm-Fiber von 51mm. Nun wurden physikalische Längen von 9985.9nm für das aktive X-Chromosom und 8582nm für das inaktive X-Chromosom anhand der Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten berechnet. Dies bedeutet somit eine Kompaktierung des aktiven X-Chromosoms um den Faktor 5107 und eine Kompaktierung des inaktiven X-Chromosoms um den Faktor 5943. Das inaktive X-Chromosom ist somit mehr als 800fach komprimierter als das aktive X-Chromosom.

Statistische Auswertung

Um eine zufällige Verteilung der Werte ausschließen zu können, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Mean Xa	Mean Xi	Median Xa	Median Xi	P-Wert
IGC Pool 1 – IGC Pool 2	26	760.921	946.703	709.065	865.010	0.122
IGC Pool 2 – IGC Pool 3	26	716.211	708.077	624.615	635.242	0.819
IGC Pool 3 – IGC Pool 4	26	917.713	826.397	810.112	780.722	0.448
IGC Pool 4 – IGC Pool 5	24	743.542	504.090	701.964	545.697	0.038
IGC Pool 5 – IGC Pool 6	24	646.808	529.180	593.414	456.500	0.130
IGC Pool 6 – IGC Pool 7	24	949.596	533.935	797.897	408.786	0.001
IGC Pool 7 – IGC Pool 8	25	532.795	511.210	506.450	449.531	0.756
IGC Pool 8 – IGC Pool 9	25	525.491	557.361	544.512	540.694	0.801
IGC Pool 9 – IGC Pool 10	25	543.030	358.603	517.014	331.794	0.010
IGC Pool 10 – IGC Pool 11	23	554.811	378.484	566.778	400.194	0.012
IGC Pool 11 – IGC Pool 12	23	664.634	505.942	573.667	485.509	0.244
IGC Pool 12 – IGC Pool 13	23	663.471	583.608	569.242	457.925	0.404
IGC Pool 13 – IGC Pool 14	24	612.557	389.553	496.215	375.792	0.089
IGC Pool 14 – IGC Pool 15	24	639.560	470.413	600.475	432.869	0.085
IGC Pool 15 – IGC Pool 16	24	514.802	378.595	358.500	360.824	0.130

3.8.2.2 Faltung des gesamten X-Chromosoms

Es wurde untersucht, ob die einzelnen 10Mb-Teilstücke des aktiven und inaktiven X-Chromosoms gefaltet oder eher linear vorliegen. Daher wurden wieder die Intensitätsschwerpunkte der 16 BAC-Pools untersucht und diesmal die Winkel zwischen den einzelnen Punkten mit dem Programm *Distangles* bestimmt. Dabei wurde beobachtet, dass die Winkel zwischen den IGCs des aktiven X-Chromosoms durchschnittlich größer sind, als die Winkel des inaktiven X-Chromosoms. In der Abbildung 66 sind die durchschnittlichen Winkel in 2D schematisch dargestellt. Die ockerfarbenen Kreise zeigen die Übergänge zwischen den einzelnen Versuchen für die keine Winkel zur Verfügung stehen. Die gelb eingefärbten Winkel unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander. Auffällig ist hier, dass das aktive X-Chromosom an der Stelle, an der sich das RIDGE Xp befindet (Winkel 4-5-6, Abb.66) deutlich mehr geöffnet ist als die korrespondierende Stelle auf dem inaktiven X-Chromosom. Der zweite Winkel, der statistisch signifikant größer auf dem aktiven X-Chromosom ist als auf dem inaktiven befindet sich auf Xq in einer eher genarmen Region (Winkel 7-8-9, Abb.66) mit einer mittleren Gendichte von lediglich 5.4 Genen/Mb. Die durchschnittlichen Winkel sind in der statistischen Auswertung aufgelistet.

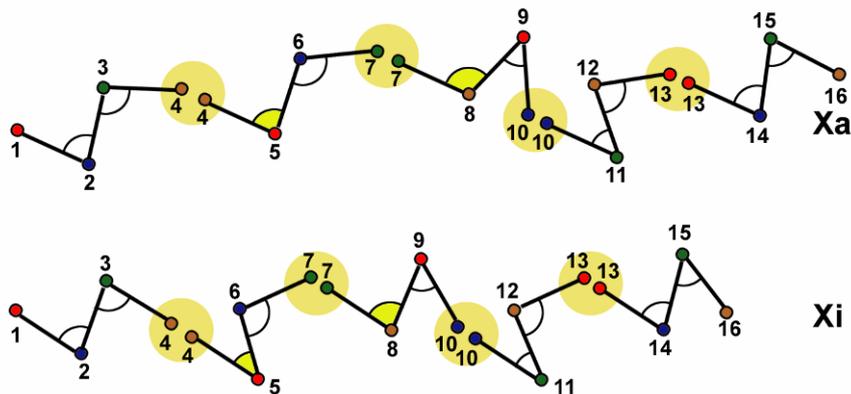


Abbildung 66: Maßstabsgetreue 2D-Darstellung der Winkel zwischen den Intensity Gravity Centern der 10Mb-Pools

beige Kreise: Übergang zwischen den Experimenten, deswegen keine Winkelberechnung möglich

Statistische Auswertung:

Um die verschiedenen Winkel auf ihre Zufälligkeit zu testen wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Winkel	Mean Xa	Mean Xi	Median Xa	Median Xi	P-Werte Xa - Xi
1-2-3	77.893	75.913	75.819	80.548	0.949
2-3-4	100.157	77.910	103.157	72.332	0.077
4-5-6	83.125	40.695	71.121	23.952	<0.001
5-6-7	113.654	98.874	123.709	116.657	0.298
7-8-9	109.035	79.768	110.809	91.156	0.036
8-9-10	47.656	52.806	37.931	29.872	0.801
10-11-12	46.160	33.469	34.533	32.536	0.292
11-12-13	79.939	91.632	79.650	96.796	0.429
13-14-15	73.032	70.853	68.819	72.831	0.703
14-15-16	70.109	51.951	56.371	40.414	0.252

Die in Rot dargestellten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant unterschiedlich.

3.8.2.3 Verschiedene Strukturen der 10Mb-Stücke

Bei der Durchsicht der 3D-Bilderstapel sind verschiedene Strukturen der einzelnen 10Mb-BAC-Pools aufgefallen. Diese Strukturen wurden in einzelne Klassen unterteilt und ausgezählt. Die Klassen sind:

- Knäuel (Abb.67A)
- Hufeisen (Abb.67B)
- linear (Abb.67C)
- Schlaufe (Abb.67D)

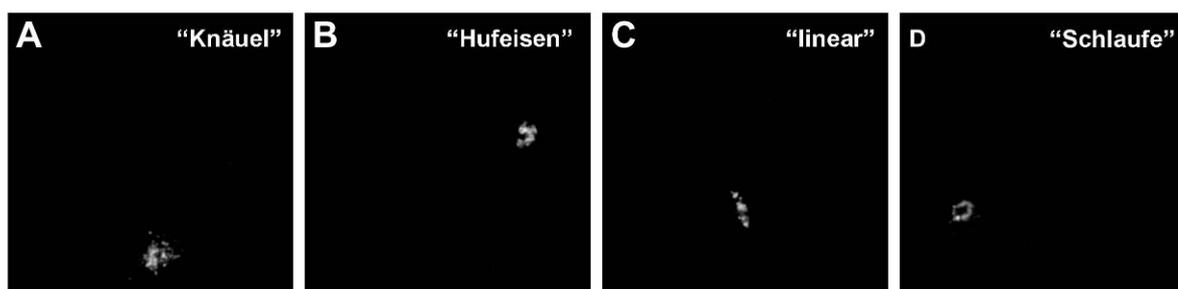


Abbildung 67: Verschiedene Strukturen der 10Mb-Pools
A „Knäuel“, B „Hufeisen“, C „linear“, D „Schlaufe“

Insgesamt wurden 488 Bilderstapel mit Signalen des aktiven X-Chromosoms und 488 Bilderstapel mit Signalen des inaktiven X-Chromosoms ausgezählt. Dabei fiel auf, dass sowohl im aktiven als auch im inaktiven X-Chromosom die Konformation „Knäuel“ am häufigsten vertreten ist (Xa: 46.9%, Xi: 56.9%). Das „Hufeisen“ und die „lineare“ Struktur sind bei ca ¼ der Bilderstapel zu beobachten. Am geringsten vorhanden ist somit die „Schlaufe“, die im aktiven X-Chromosom lediglich bei 8.7%

und im inaktiven X-Chromosom bei 7.3% der Signale zu sehen ist. Eine genaue Auflistung aller prozentualen Anteile findet sich in Tabelle 5.

	n gesamt	„Knäuel“ n/%	„Hufeisen“ n/%	„linear“ n/%	„Schleife“ n/%
Xa	488	229 / 46.9	119 / 24.3	98 / 20.1	42 / 8.7
Xi	488	277 / 56.9	90 / 18.4	85 / 17.4	36 / 7.3

Tabelle 5: Häufigkeiten der verschiedenen Strukturen der 10Mb-Stücke

3.9 Radiale Verteilung von Bereichen mit unterschiedlicher Gendichte

3.9.1 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms innerhalb eines 2Mb-Fensters

In diesem Versuch sollte der Einfluss der Gendichteumgebung auf die Lokalisation von BACs innerhalb des Chromosomenterritoriums und innerhalb des Fibroblastenzellkerns untersucht werden. Hierfür wurden zunächst BACs ausgewählt, die genreich (n=50) beziehungsweise genarm (n=129) innerhalb eines 2Mb-Fensters sind (siehe Abschnitt 3.1.2.4). Aus den ausgewählten BACs wurden ein genreicher und ein genarmer Pool erstellt, die das gesamte X-Chromosom abdecken. Nach dem erfolgreichen Testen der BAC-Pools in einer 2D-FISH auf humanen Metaphasen (siehe Abb.68A) wurde eine 3D-FISH durchgeführt, bei der die beiden Pools zusammen mit einer paint-Sonde für das humane X-Chromosom auf fixierte Fibroblasten hybridisiert wurden (Abb.68B,C). Anschließend wurden von 25 Zellkernen 3D-Bilderstapel an einem konfokalen Leica SP2 aufgenommen, in ImageJ für das Programm eADS vorbereitet und schließlich ausgewertet.

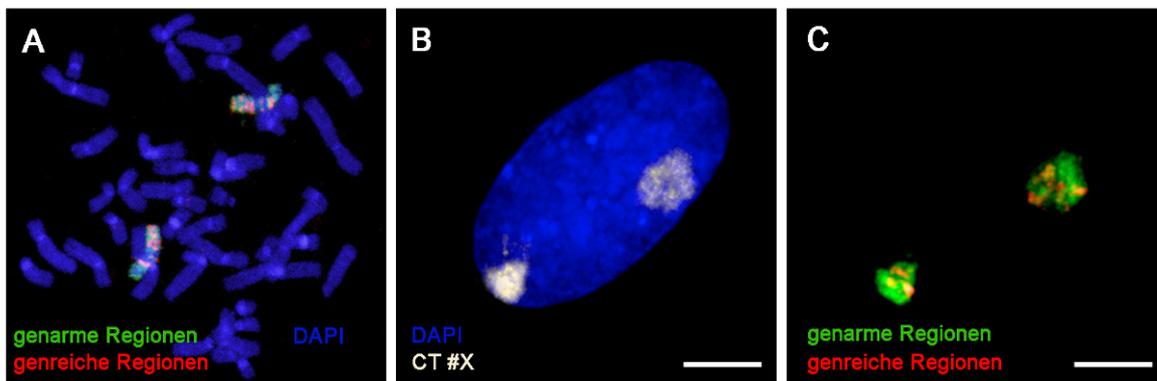


Abbildung 68: Beispiele für eine 2D- und 3D-FISH mit DNA-Sonden für genarme und genreiche Bereiche innerhalb des 2Mb-Gendichtefensters

A Metaphase nach einer 2D-FISH

B Z-Projektion der DAPI-Färbung und des X-paints nach einer 3D-FISH

C Z-Projektion der genarmen und genreichen Bereiche nach einer 3D-FISH

Scalebar: 5µm

3.9.1.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

In den Abbildungen 69 und 70 ist zu erkennen, dass sich die genreichen und genarmen Bereiche sowohl im aktiven als auch im inaktiven X-Chromosom nahezu gleich verteilen. Auch zur jeweiligen Verteilung des Chromosomenterritoriums findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe unten).

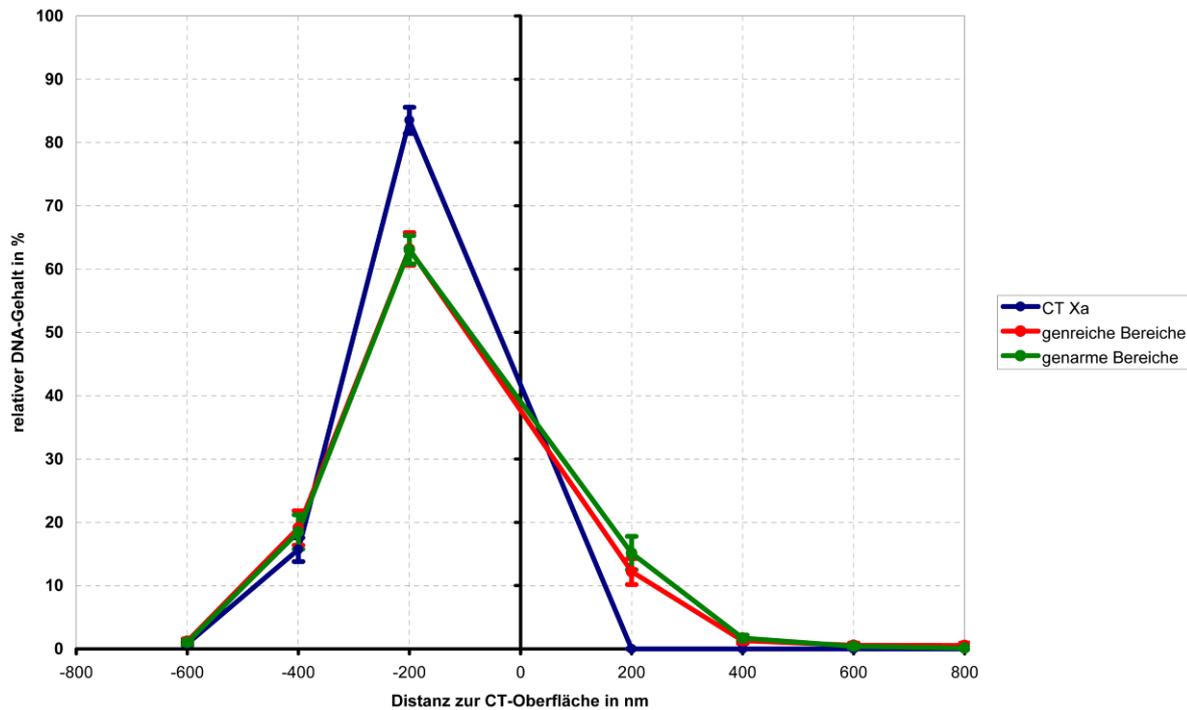


Abbildung 69: radiale Verteilung der genreichen und genarmen Bereiche (2Mb-Gendichtefenster) des aktiven X-Chromosoms innerhalb des Chromosomenterritoriums

genreiche Bereiche: rote Kurve, genarme Bereiche: grüne Kurve, CT Xa: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

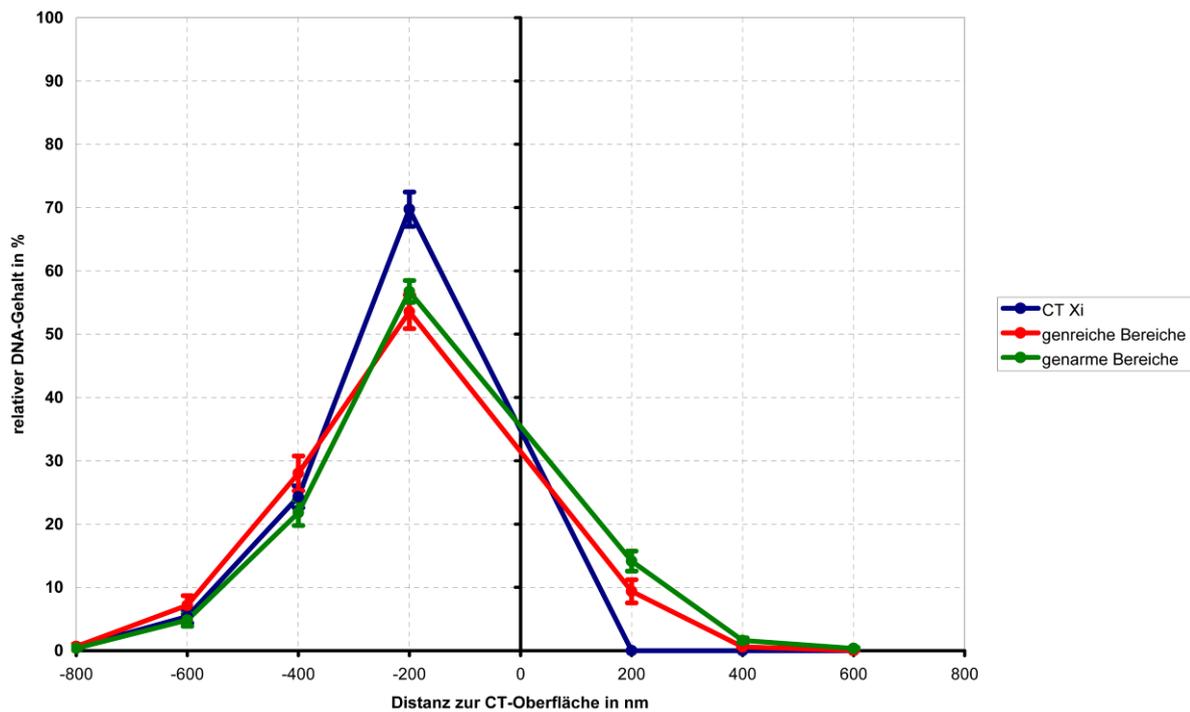


Abbildung 70: radiale Verteilung der genreichen und genarmen Bereiche (2Mb-Gendichtefenster) des inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Chromosomenterritoriums
 genreiche Bereiche: rote Kurve, genarme Bereiche: grüne Kurve, CT Xi: blaue Kurve
 Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Um die jeweiligen Werte auf ihre statistisch signifikante Unterschiedlichkeit zu testen, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test angewandt. Er ergab folgende Ergebnisse:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool genreich 2Mb	25	-50.000	-141.421
Pool genarm 2Mb	25	100.000	-70.711
CT	25	-70.711	-111.803

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
Pool genreich 2Mb – Pool genarm 2Mb	0.985	0.086
Pool genreich 2Mb – CT	0.992	0.662
Pool genarm 2Mb – CT	0.938	0.103

Keiner der ermittelten P-Werte weist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% auf eine nicht zufällige Verteilung der BAC-Pools innerhalb der Chromosomenterritorien hin.

3.9.1.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern

Hier wurde die radiale Verteilung der innerhalb eines 2Mb-Fensters genarmen und genreichen BAC-Pools im Zellkern humaner Fibroblasten untersucht. Dazu wurden die 3D-Bilderstapel, die in Abschnitt 3.9.1 aufgenommen wurden, mit eADS ausgewertet. Diesmal wurde der Zellkern als Referenz verwendet, nicht das Chromosomenterritorium.

Wie man in der Abbildung 71 deutlich erkennen kann, sind die beiden BAC-Pools des inaktiven X-Chromosoms deutlich mehr zur Zellkernmitte orientiert, als die korrespondierenden BAC-Pools des aktiven X-Chromosoms. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (P-Werte siehe unten) und wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das inaktive X-Chromosom mehr im Inneren des Zellkerns lokalisiert ist, als das aktive X-Chromosom (siehe Abschnitt 3.5). Innerhalb des aktiven beziehungsweise des inaktiven X-Chromosoms findet sich kein Unterschied in der radialen Verteilung genreicher und genarmer Bereiche.

Statistische Auswertung:

Die Überprüfung der Werte auf ihre statistische Signifikanz wurde anhand des Mann Whitney Rank Sum-Tests durchgeführt und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool genreich 2Mb	25	-624.820	-800.000
Pool genarm 2Mb	25	-561.160	-884.816

Pools	P-Werte
Pool genreich 2Mb Xa – Pool genarm 2Mb Xa	0.923
Pool genreich 2Mb Xi – Pool genarm 2Mb Xi	0.961
Pool genreich 2Mb Xa – Pool genreich 2Mb Xi	0.020
Pool genreich 2Mb Xa – Pool genarm 2Mb Xi	0.033
Pool genarm 2Mb Xa – Pool genreich 2Mb Xi	0.018
Pool genarm 2Mb Xa – Pool genarm 2Mb Xi	0.017

Die in Rot dargestellten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant und daher nicht zufällig verteilt.

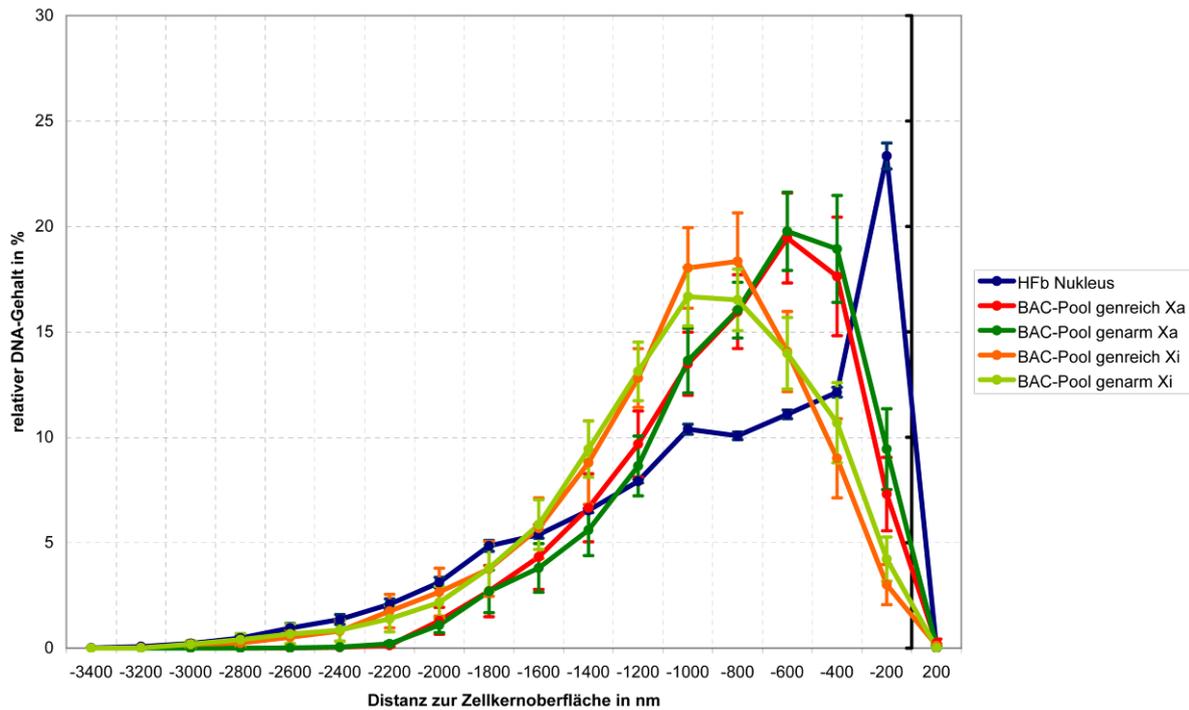


Abbildung 71: radiale Verteilung der genreichen und genarmen Bereiche (2Mb-Gendichtefenster) des aktiven und inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten
 genreiche Bereiche Xa: rote Kurve, genarme Bereiche Xa: grüne Kurve, genreiche Bereiche Xi: orange Kurve, genarme Bereiche Xi: hellgrüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve
 Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

3.9.1.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung genreicher und genarmer Bereiche innerhalb eines 2Mb-Fensters in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern

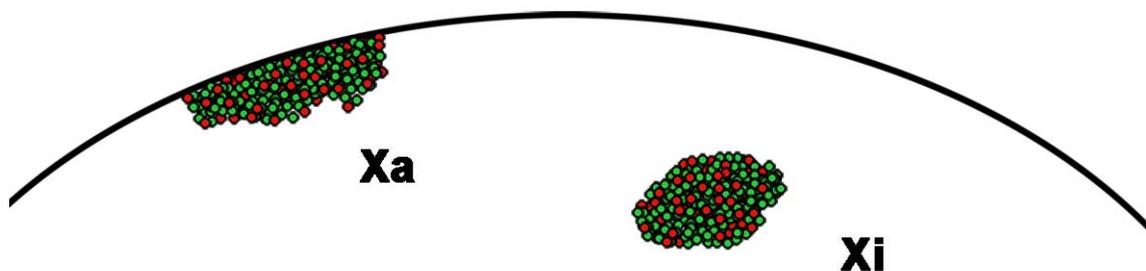


Abbildung 72 Schematische Darstellung der radialen Verteilung genreicher und genarmer Bereiche innerhalb eines 2Mb-Fensters in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern
 grün: genarme Bereiche, rot: genreiche Bereiche, schwarze Linie: Kernhülle

In der Abbildung 72 ist die radiale Verteilung genarmer und genreicher Bereiche innerhalb eines 2Mb-Fensters in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern schematisch dargestellt. Genarme und genreiche Bereiche sind

innerhalb des Chromosomenterritoriums gleichmäßig verteilt. Betrachtet man das aktive und das inaktive X-Chromosom getrennt voneinander, so ist auch kein Unterschied in der Verteilung innerhalb des Fibroblastenzellkerns zu erkennen. Allerdings besteht ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der genarmen und genreichen Bereiche innerhalb des Fibroblastenzellkerns zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom. Genarme und genreiche Bereiche des inaktiven X-Chromosoms liegen signifikant weiter im Inneren des Zellkerns als die korrespondierenden Bereiche des aktiven X-Chromosoms.

3.9.2 Radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des gesamten X-Chromosoms innerhalb eines 10Mb-Fensters

Da es keinen Unterschied in der radialen Verteilung von BACs gab, die innerhalb eines 2Mb-Fensters als genreich beziehungsweise genarm eingestuft wurden, wurde hier nun die Verteilung von BACs, die genreich und genarm innerhalb eines 10Mb-Fensters sind untersucht. Auf eine Auswertung in Bezug auf das Chromosomenterritorium wurde verzichtet, da es bisher nie einen Unterschied in der Verteilung der BACs innerhalb des aktiven oder des inaktiven X-Chromosoms zu sehen gab. Die BACs, die in einem 10Mb-Fenster als genreich eingestuft werden konnten beschränken sich auf die beiden vorhandenen RIDGES auf Xp und Xq. Als genarm zählen alle anderen Bereiche (siehe Abschnitt 3.1.2).

Nach einer erfolgreichen 2D-FISH auf humane Metaphasen (Abb.73A) wurden die beiden BAC-Pools in einer 3D-FISH auf fixierte humane Fibroblasten hybridisiert (Abb.73B). Eine Antikörperdetektion war hier nicht notwendig, da beide Pools direkt mit Fluorochromen markiert waren.

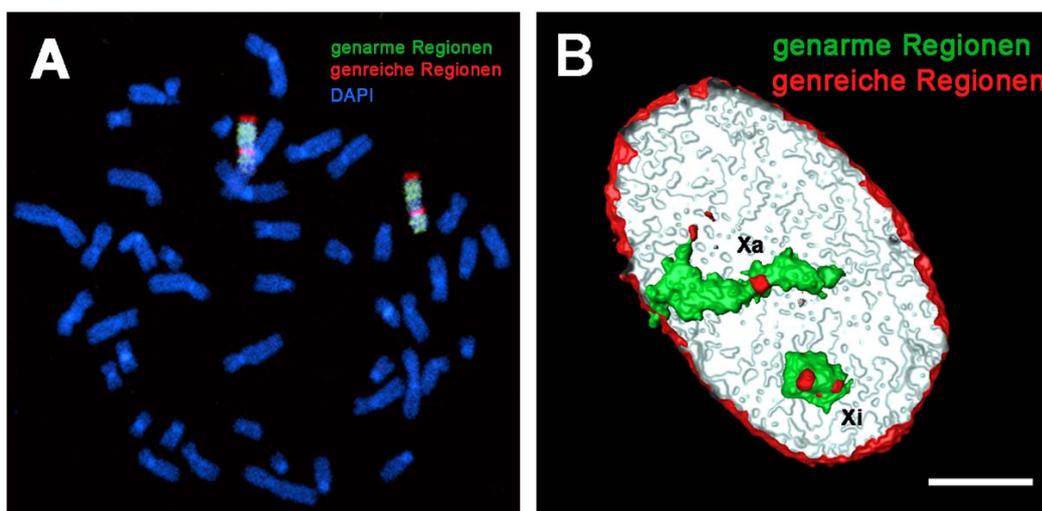


Abbildung 73: Beispiel einer 2D- und 3D-FISH mit DNA-Sonden für genarme und genreiche Bereiche innerhalb des 10Mb-Gendichtefensters

A Metaphase nach einer 2D-FISH

B 3D-Rekonstruktion eines Fibroblasten-Zellkerns nach einer 3D-FISH

Scalebar: 5µm

Nachdem 26 Zellkerne an einem konfokalen Leica SP2 aufgenommen wurden, wurden die 3D-Bilderstapel in ImageJ bearbeitet und mit dem Programm eADS ausgewertet.

Wie man in den Abbildungen 74 und 75 sehen kann, besteht kein Unterschied in der radialen Verteilung von genreichen (RIDGES) und genarmen Bereichen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten. Allerdings ist in Abbildung 74 auch zu erkennen, dass die RIDGES eine Tendenz zeigen, mehr im Zellkerninneren lokalisiert zu sein. Diese Tendenz ist statistisch nicht signifikant.

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Ergebnisse:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool genreich 10Mb	26	-919.399	-1049.443
Pool genarm 10Mb	26	-799.083	-966.467

Pools	P-Wert Xa	P-Wert Xi
Pool genreich 10Mb – Pool genarm 10Mb	0.136	0.608

Die BAC-Pools des aktiven und inaktiven X-Chromosoms sind zufällig im Zellkern der Fibroblasten verteilt.

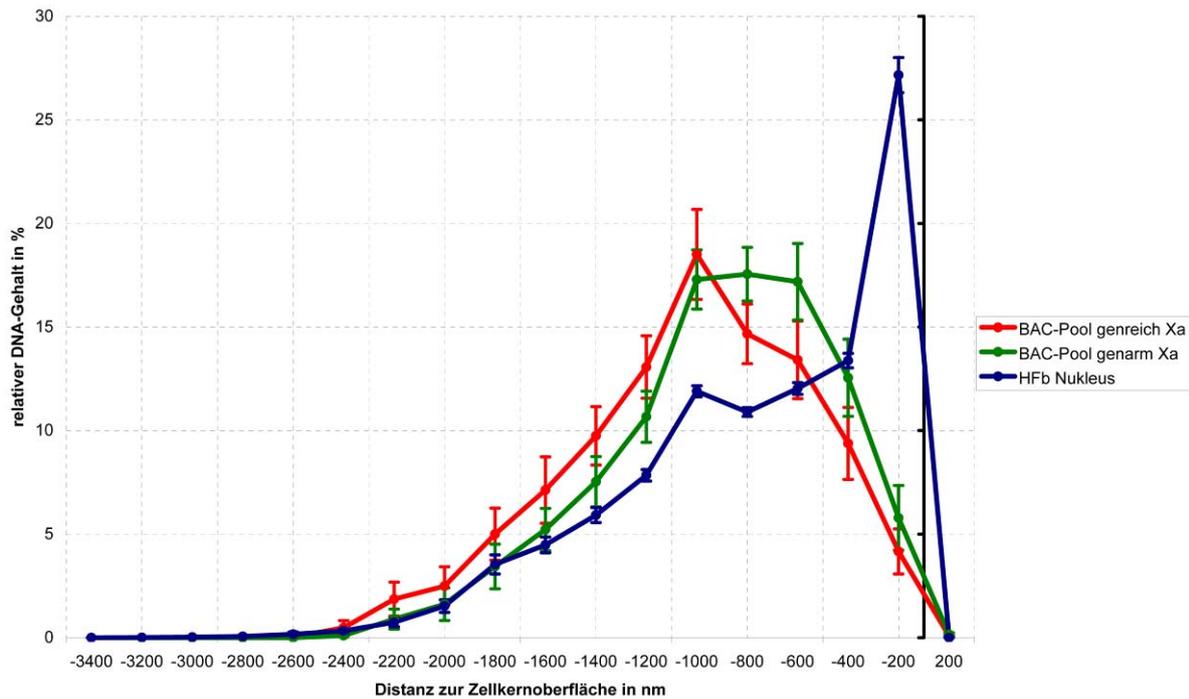


Abbildung 74: radiale Verteilung der genreichen und genarmen Bereiche (10Mb-Gendichtefenster) des aktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

genreiche Bereiche: rote Kurve, genarme Bereiche: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

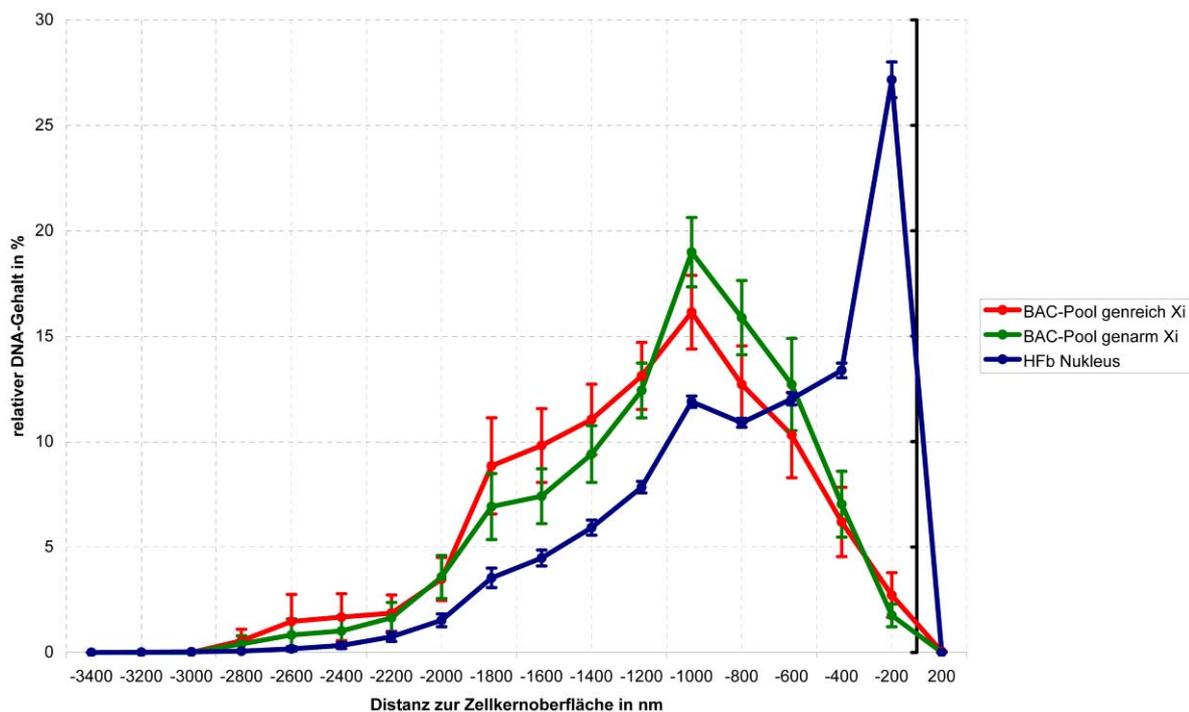


Abbildung 75: radiale Verteilung der genreichen und genarmen Bereiche (10Mb-Gendichtefenster) des inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

genreiche Bereiche: rote Kurve, genarme Bereiche: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

3.9.3 Radiale Verteilung der RIDGEs und genarmen Regionen des X-Chromosoms

Da im vorausgegangenen Versuch eine Tendenz der RIDGES beobachtet werden konnte, mehr im Inneren des Zellkerns lokalisiert zu sein, wurde hier die Lage der einzelnen RIDGES sowie der genarmen Regionen dazwischen und der genarmen Region zwischen den beiden RIDGES genauer untersucht.

3.9.3.1 Radiale Verteilung von RIDGE Xp und RIDGE Xq

Es wurden zwei BAC-Pools erstellt, die sich über jeweils ein RIDGE erstrecken und mit zwei verschiedenen Fluorochromen markiert. Zusätzlich zu den beiden RIDGE-Pools wurde die genarme Region zwischen diesen Pools hinzugezogen (siehe Abb.79A). So konnte die Frage beantwortet werden, ob beide RIDGES ins Zellkerninnere tendieren, oder nur eines und ob der genarme Bereich weiter außen zur Zellkernwand hin orientiert ist.

Nach einer erfolgreichen 2D-FISH wurden die drei BAC-Pools in einer 3D-FISH (Abb.76) auf fixierte humane Fibroblasten hybridisiert und mittels Antikörpern (sofern es nötig war) nachgewiesen.

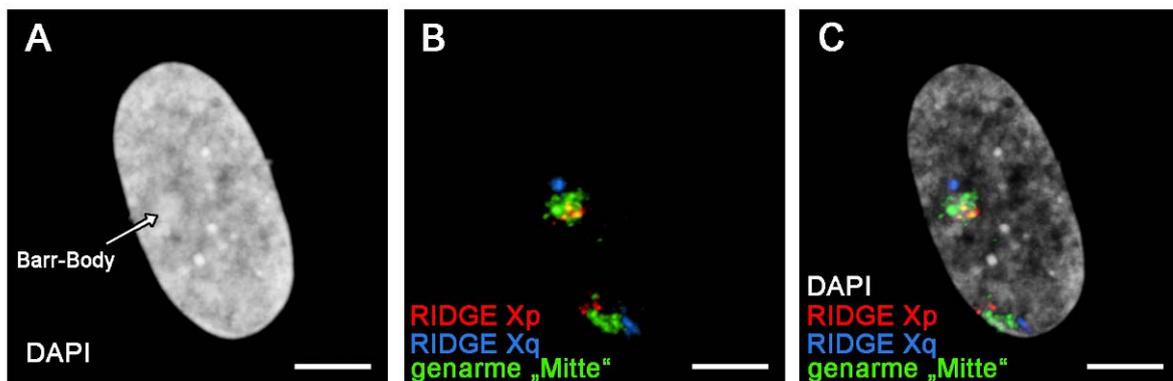


Abbildung 76: Beispiel einer 3D-FISH mit DNA-Sonden für genarme („Mitte“) und genreiche (RIDGEs) Bereiche innerhalb des 10Mb-Gendichtefensters
A Z-Projektion der DAPI-Färbung, Pfeil: Barr-Body
B Z-Projektion der genarmen und genreichen Bereiche
C Z-Projektion overlay der einzelnen Farbkanäle

Anschließend wurden an einem konfokalen Leica SP5 3D-Bilderstapel von 27 Zellkernen aufgenommen, in ImageJ für das Programm eADS vorbereitet und ausgewertet.

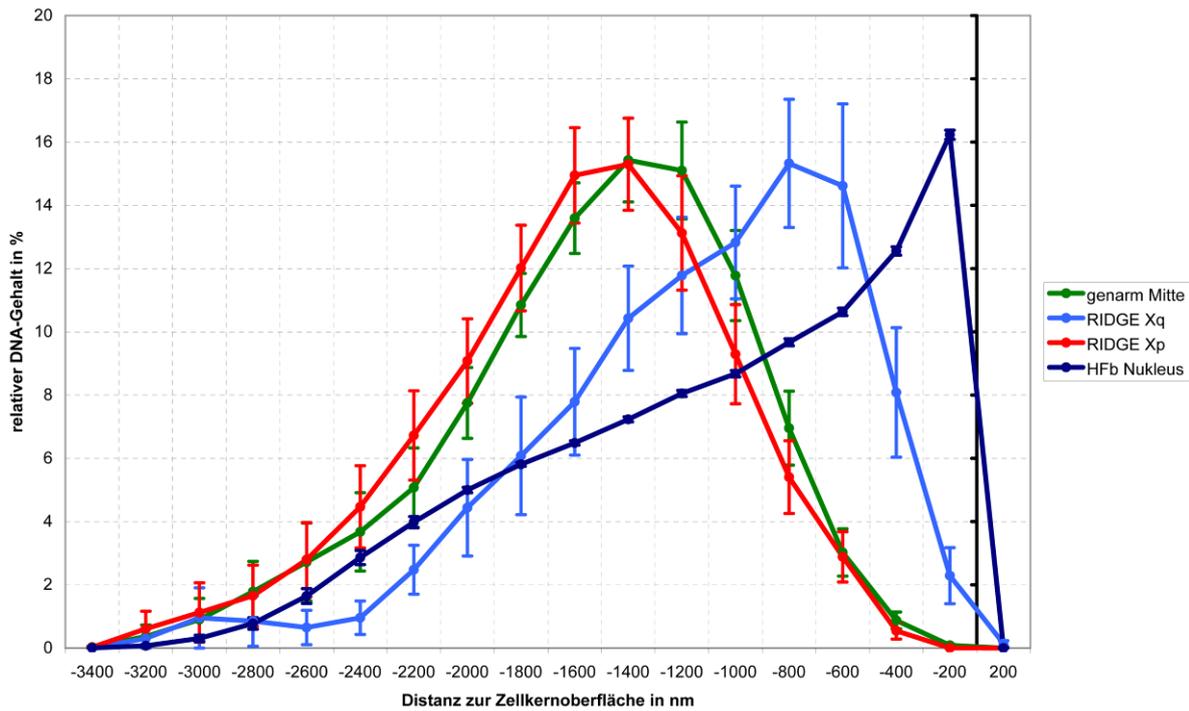


Abbildung 77: radiale Verteilung der beiden RIDGES und der genarmen „Mitte“ des aktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

genarme Mitte: grüne Kurve, RIDGE Xq: hellblaue Kurve, RIDGE Xp: rote Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

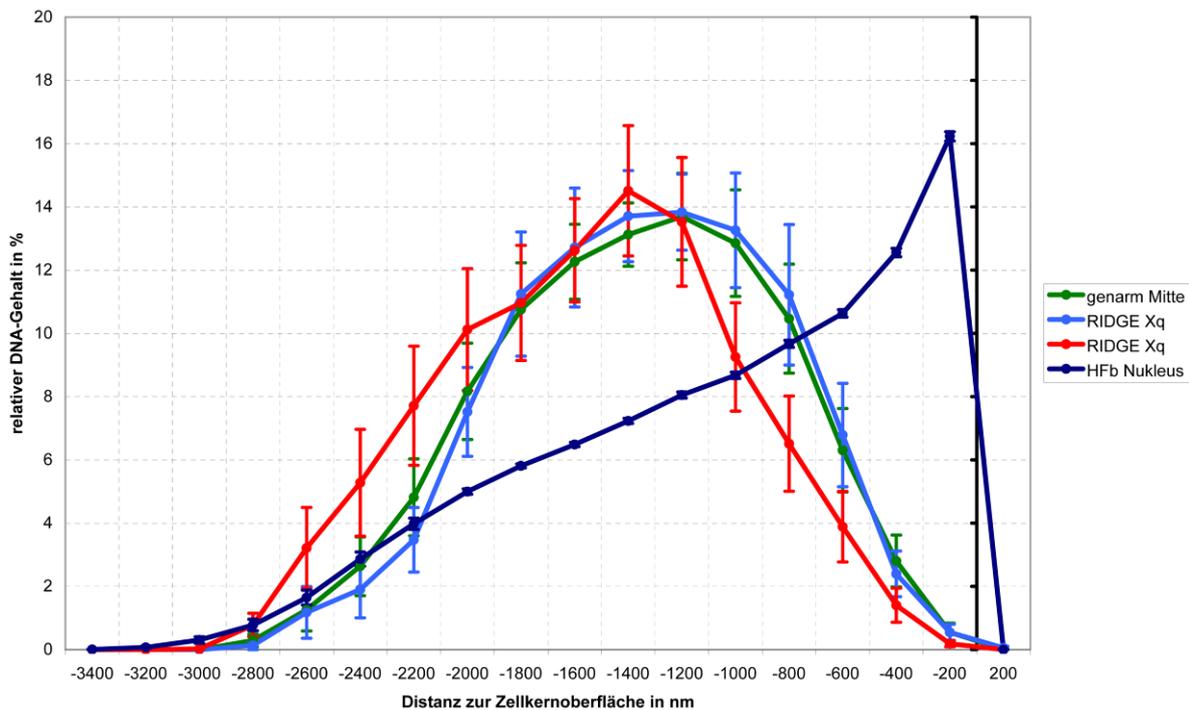


Abbildung 78: radiale Verteilung der beiden RIDGES und der genarmen „Mitte“ des inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

genarme Mitte: grüne Kurve, RIDGE Xq: hellblaue Kurve, RIDGE Xp: rote Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

In den Abbildungen 77 und 78 sind die Ergebnisse der eADS-Auswertung zu sehen. Das RIDGE Xp des aktiven X-Chromosoms liegt deutlich im Inneren des Zellkerns, während das RIDGE Xq eher randständig zu finden ist. Die genarme Mitte hingegen liegt zwischen den beiden RIDGES, jedoch mit der Tendenz nach innen. Die genarme Mitte und das RIDGE Xp liegen statistisch signifikant weiter im Inneren als das RIDGE Xq (P-Werte siehe unten). Die RIDGES und genarmen Bereiche des inaktiven X-Chromosoms liegen alle zufällig verteilt, es ist auch keine Tendenz der RIDGE-Regionen zur Zellkernmitte zu erkennen.

Die Abbildungen 79B und 79C zeigen die schematische Zusammenfassung dieser Ergebnisse. Das RIDGE Xp sowie die genarme Mitte des aktiven X-Chromosoms liegen deutlich weiter innen im Zellkern humaner Fibroblasten als das RIDGE Xq. Dieselben Pools des inaktiven X-Chromosoms liegen alle gleichmäßig verteilt im Zellkern.

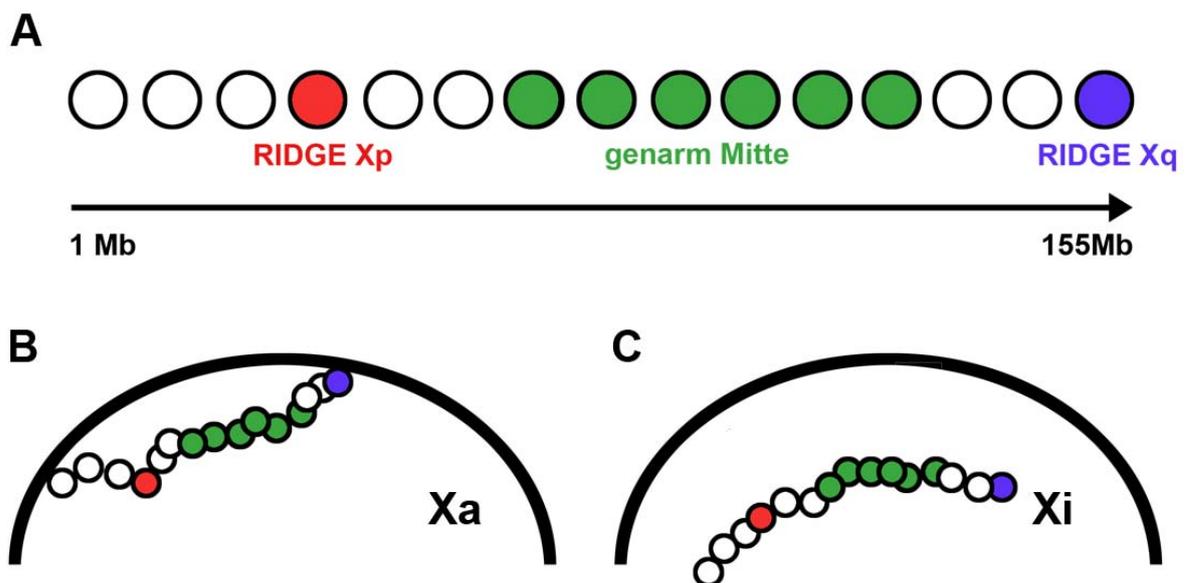


Abbildung 79: Schematische Darstellung der RIDGE-Pools und der genarmen „Mitte“

A Schema der verwendeten Pools

B und **C** Schematische Darstellung der Struktur des aktiven (B) und inaktiven (C) X-Chromosoms nach der Untersuchung der Lage der RIDGES und der genarmen „Mitte“. Der Zellkernrand ist als schwarze Linie dargestellt.

Statistische Auswertung:

Der Mann Whitney Rank Sum-Test ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
genarm Mitte	27	-1282.575	-1200.000
RIDGE Xq	27	-943.398	-1357.387
RIDGE Xp	27	-1467.140	-1386.543

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
genarm Mitte – RIDGE Xp	0.328	0.272
genarm Mitte – RIDGE Xq	0.001	0.665
RIDGE Xp – RIDGE Xq	<0.001	0.128

3.9.3.2 Radiale Verteilung der genarmen Bereiche in Xp22 und der genarmen Mitte im Vergleich zu beiden RIDGES

Nachdem die radiale Verteilung der beiden RIDGES sowie der genarmen Mitte untersucht wurde, wurde nun der Fokus auf den genarmen „tail“ (Abb.83A) gelegt. Dieser befindet sich auf Xp22 und endet direkt bei Beginn des RIDGE Xp.

In einer 2D-FISH wurden der Xp „tail“-Pool, sowie die genarme Mitte und die beiden RIDGES (hier gepoolt) auf humane Metaphasen hybridisiert. Nach erfolgreicher Test-Hybridisierung wurden die Pools in einer 3D-FISH auf humane Fibroblasten hybridisiert (Abb.80) und mit Antikörpern detektiert.

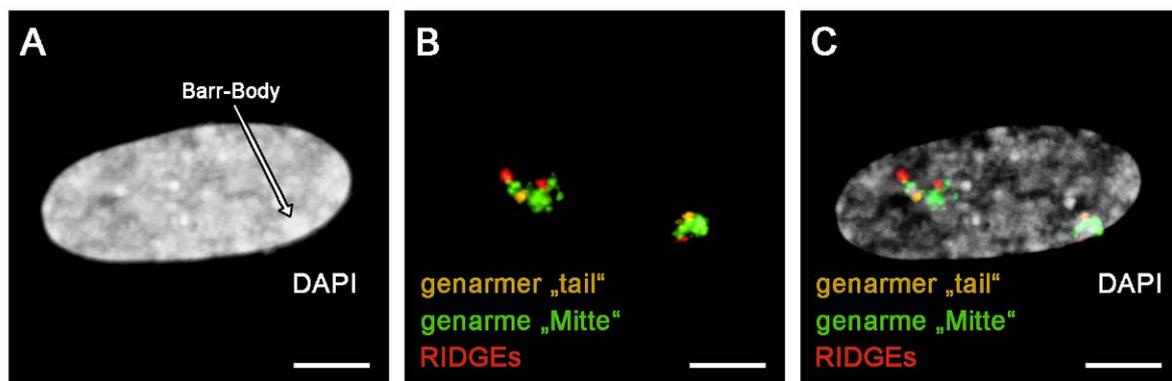


Abbildung 80: Beispiel einer 3D-FISH mit DNA-Sonden für genarme („tail“ und „Mitte“) und genreiche (RIDGES) Bereiche innerhalb des 10Mb-Gendichtefensters

A Z-Projektion der DAPI-Färbung, Pfeil: Barr-Body

B Z-Projektion der genarmen und genreichen Bereiche

C Z-Projektion overlay der einzelnen Farbkanäle

Scalebar: 5µm

Anschließend wurden 3D-Bilderstapel von 25 Zellkernen an einem konfokalen Leica SP5 aufgenommen, in ImageJ für das Programm eADS vorbereitet und ausgewertet.

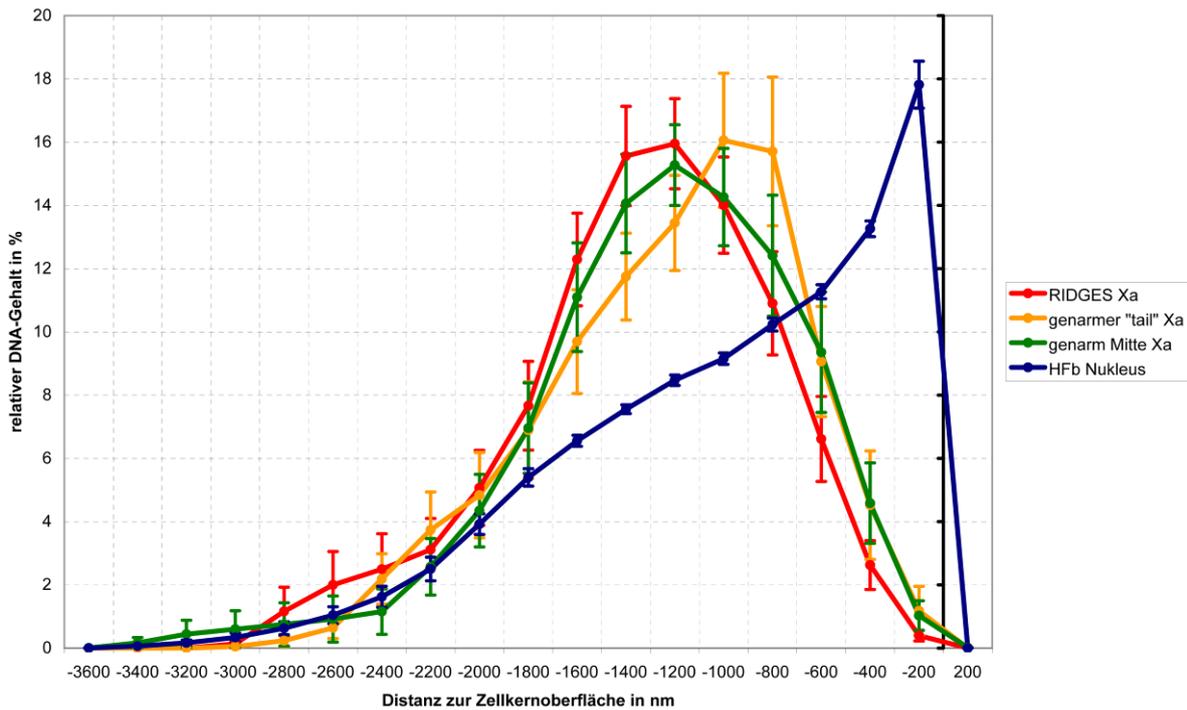


Abbildung 81: radiale Verteilung der RIDGES, sowie verschiedener genarmer Bereiche des aktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

RIDGES Xa: rote Kurve, genarmer „tail“ Xa: orange Kurve, genarme Mitte Xa: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve.

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

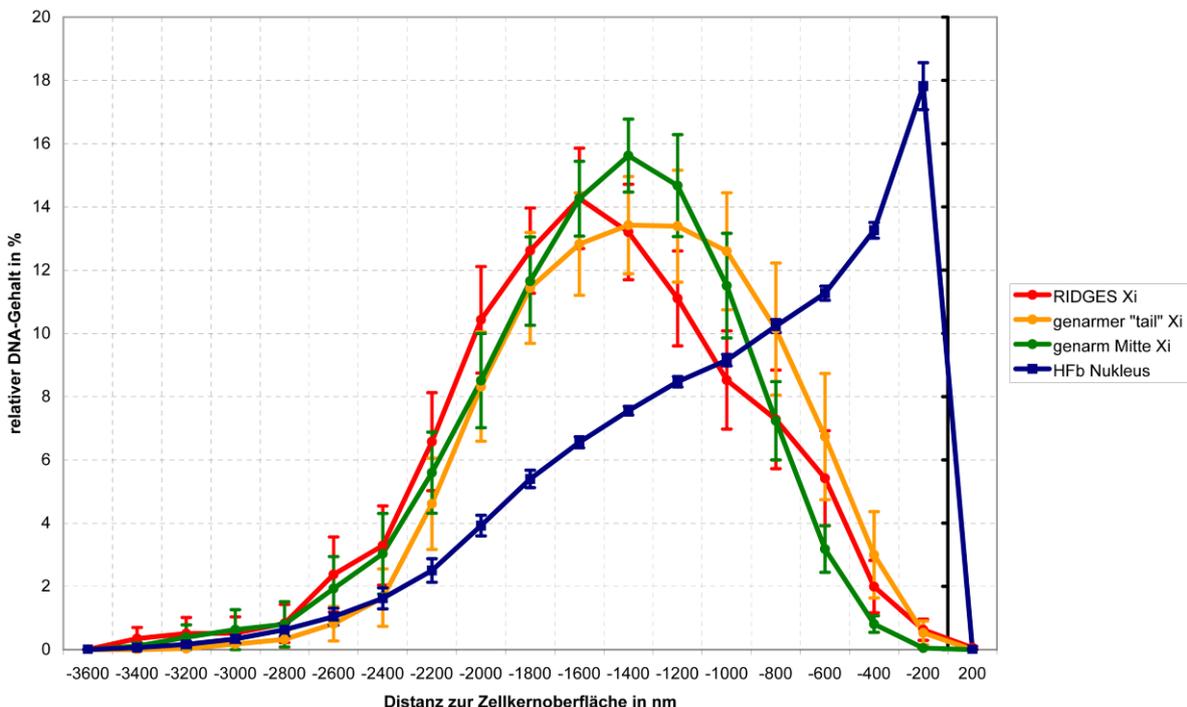


Abbildung 82: radiale Verteilung der RIDGES, sowie verschiedener genarmer Bereiche des inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

RIDGES Xi: rote Kurve, genarmer „tail“ Xi: orange Kurve, genarme Mitte Xi: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve.

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche des (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

In den Abbildungen 81 und 82 sind die Ergebnisse der radialen Auswertung dargestellt. Die RIDGES des aktiven X-Chromosoms liegen wieder weiter in der Mitte des Fibroblastenzellkerns, als die genarmen Bereiche. Der genarme „tail“ lokalisiert im Gegensatz zur genarmen Mitte des X-Chromosoms mehr zum Zellkernrand hin. Die RIDGES und genarmen Bereiche des inaktiven X-Chromosoms zeigen wiederum keinen deutlichen Unterschied in ihrer Verteilung innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten.

Schematisch dargestellt kann man die Ergebnisse dieses Versuchs folgendermaßen zusammenfassen (Abb.83):

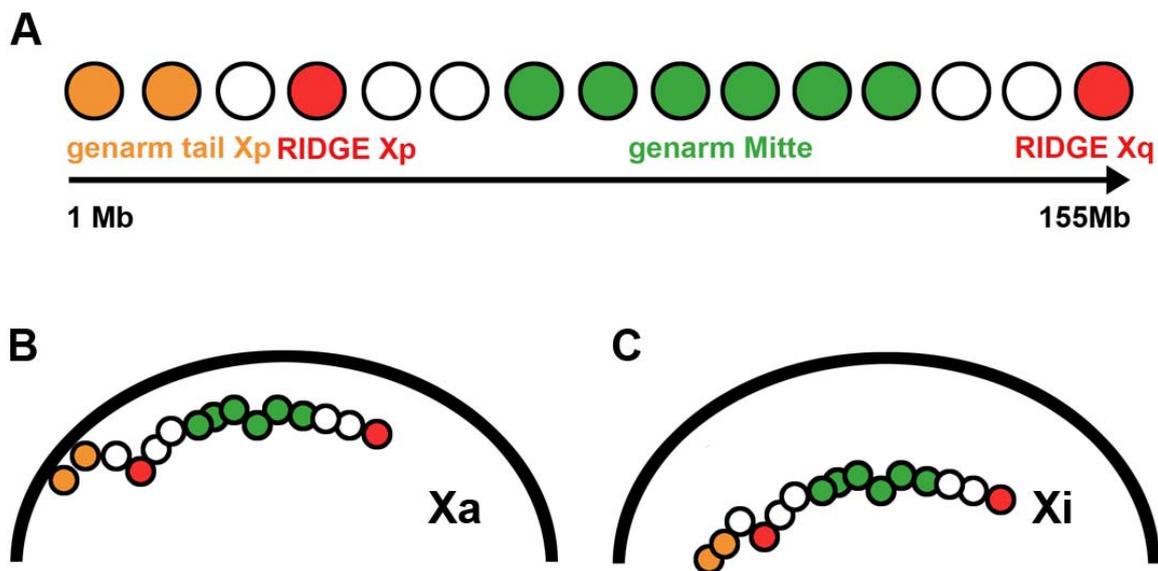


Abbildung 83: Schematische Darstellung der RIDGE-Pools und genarmen Bereiche

A Schema der verwendeten Pools

B und **C** Schematische Darstellung der Struktur des aktiven (B) und inaktiven (C) X-Chromosoms nach der Untersuchung der Lage der RIDGES, sowie mehrerer genarmen Bereiche. Der Zellkernrand ist als schwarze Linie dargestellt

Statistische Auswertung:

Die Überprüfung auf eine zufällige oder statistisch signifikante Verteilung der Werte wurde mittels des Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Ergebnisse:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
genarm „tail“ Xp	25	-982.344	-1208.305
genarm Mitte	25	-1004.988	-1358.308
RIDGES	25	-1119.151	-1400.000

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
genarm „tail“ Xp – genarm Mitte	0.816	0.367
genarm „tail“ Xp – RIDGES	0.233	0.229
genarm Mitte – RIDGES	0.410	0.567

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind diese Werte nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

3.9.3.3 Schematische Zusammenfassung der radialen Verteilung von RIDGES und genarmen Bereichen des X-Chromosoms

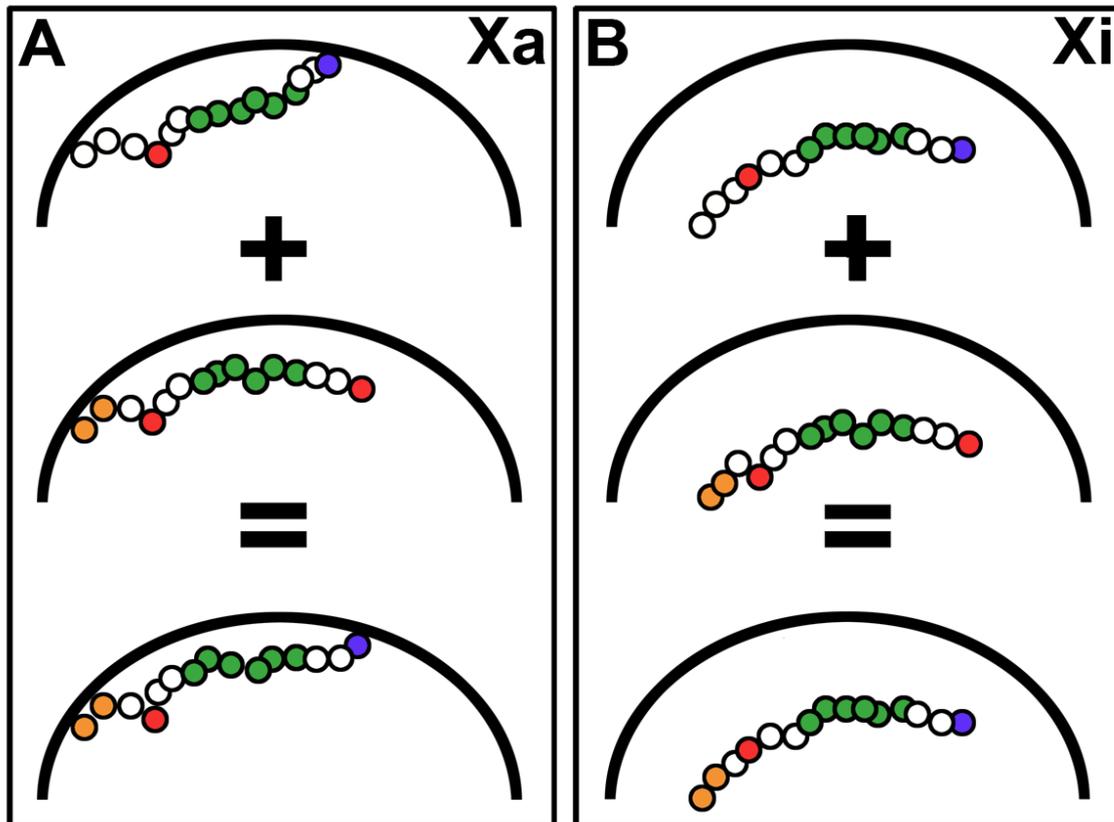


Abbildung 84: Zusammenfassende schematische Darstellung der Lage der RIDGES und genarmen Regionen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten
A: Xa, B: Xi

Die zusammenfassende schematische Darstellung der letzten beiden Versuche zeigt einen groben Überblick über die Verteilung genarmer und genreicher Regionen des X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten. Links sind die RIDGES und genarmen Regionen des aktiven X-Chromosoms zu sehen (Abb.84A), rechts dieselben Bereiche des inaktiven X-Chromosoms (Abb.84B). In A ist deutlich zu erkennen, dass das RIDGE auf Xp (rot) mehr zur Zellkernmitte orientiert ist als der Rest des X-Chromosoms. Das RIDGE auf Xq (blau) liegt randständig, wie auch der genarme „tail“ (orange). Die genarme Mitte (grün) liegt zwischen dem RIDGE auf Xp und dem RIDGE auf Xq. In B hingegen kann kein deutlicher Unterschied zwischen genarmen und genreichen Regionen hinsichtlich ihrer radialen Verteilung im Zellkern humaner Fibroblasten erkannt werden. Hier sind sämtliche Bereiche gleich und zufällig verteilt. Das inaktive X-Chromosom liegt allgemein deutlich weiter im Inneren des Fibroblastenzellkerns.

3.9.4 Radiale Verteilung einer extrem genreichen Region vs. einer extrem genarmen Region

Da die vorangegangenen Experimente gezeigt haben, dass genreiche Sequenzen zumindest eine Tendenz zeigen sich mehr im Inneren des Zellkerns humaner Fibroblasten zu lokalisieren als genarme Sequenzen, wurde der Fokus auf zwei kleine Regionen gelegt, die sich hinsichtlich ihrer Gendichte extrem unterscheiden. Die genreiche Region befindet sich innerhalb des RIDGE auf Xp11 und umfasst 8 BACs auf einer Länge von 4.4 Mb. Die Gendichte in dieser Region beträgt 30.6 Gene /Mb. Die genarme Region befindet sich auf Xq25 und umfasst 4.6 Mb, die ebenfalls von 8 BACs abgedeckt werden. Die Gendichte in dieser Region beträgt 3.5 Gene / Mb. Die transkriptionelle Aktivität der auf den ausgewählten BACs enthaltenen Gene wurde hier nicht berücksichtigt.

Nach einer erfolgreichen 2D-FISH auf humane Metaphasen (Abb.85A) mit den beiden Pools wurde eine 3D-FISH auf fixierte humane Fibroblasten durchgeführt (Abb.B,C). Zusätzlich zu den beiden Pools wurde eine paint-Sonde für das humane X-Chromosom verwendet. Nach der Hybridisierung der DNA-Sonden und anschließender Antikörperdetektion wurden 25 Zellkerne an einem konfokalen Leica SP2 als 3D-Bilderstapel aufgenommen und mittels ImageJ für das Programm eADS vorbereitet und in Bezug zum jeweiligen Chromosomenterritorium und zum Fibroblastenzellkern ausgewertet.

Dieser Versuch und die nachfolgenden Auswertungen wurden von Doris Illner im Rahmen ihrer von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt.

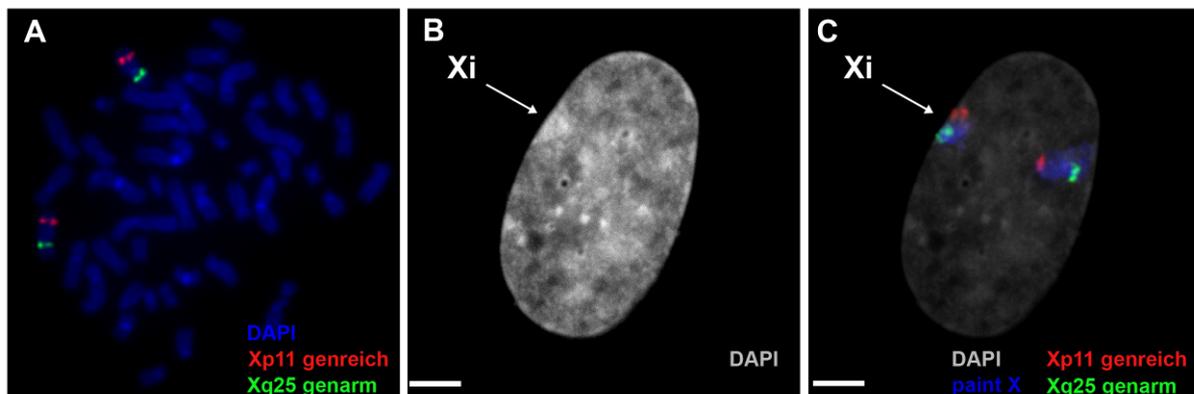


Abbildung 85: Beispiel einer 2D- und 3D-FISH mit DNA-Sonden für ein RIDGE auf Xp und eine extrem genarme Region auf Xq25

A Metaphase nach einer 2D-FISH

B Z-Projektion der DAPI-Färbung nach der 3D-FISH

C Z-Projektion der DAPI-Färbung + paint #X (blau) + RIDGE (rot) + Xq25 (grün)

Scalebar: 5µm

3.9.4.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

In der Abbildung 86 ist das Ergebnis der radialen Auswertung mit eADS für die beiden Pools im Bezug zum aktiven X-Chromosom dargestellt. Beide BAC-Pools sind nahezu gleich verteilt und befinden sich sowohl innerhalb als auch außerhalb des X-Chromosomterritoriums. Im inaktiven X-Chromosom (Abb.87) besteht ebenfalls kein Unterschied zwischen dem genreichen und dem genarmen BAC-Pool, allerdings zeigt der genreiche BAC-Pool eine leichte Tendenz, weiter im Inneren des inaktiven X-Chromosoms zu lokalisieren. Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant (siehe unten).

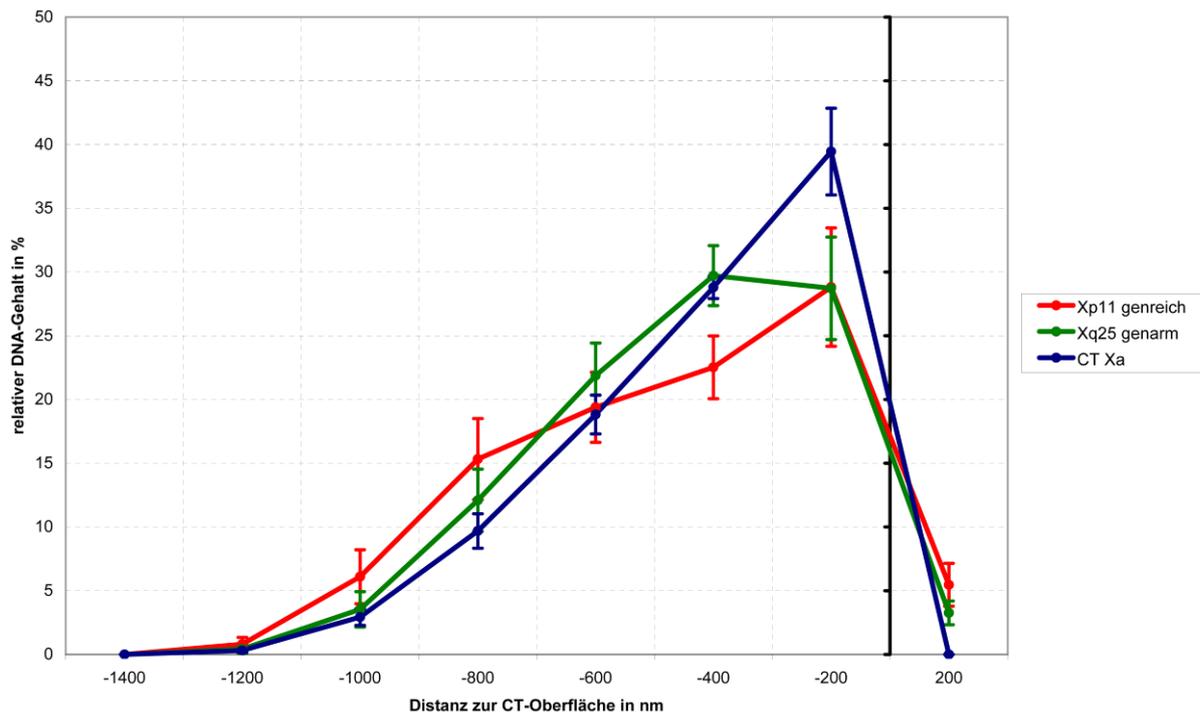


Abbildung 86: radiale Verteilung des RIDGE innerhalb Xp11 und der genarmen Region innerhalb Xq25 des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Xp11 genreich: rote Kurve, Xq25 genarm: grüne Kurve, CT Xa: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

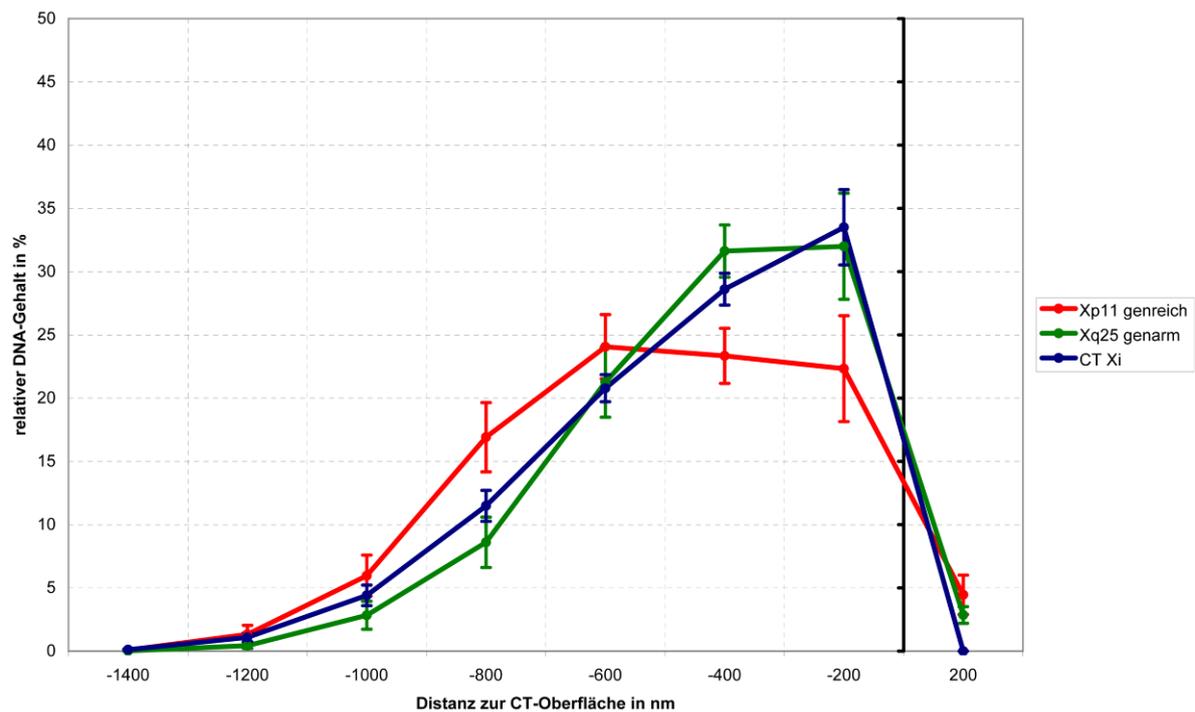


Abbildung 87: radiale Verteilung des RIDGE innerhalb Xp11 und der genarmen Region innerhalb Xq25 des inaktiven X-Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Xp11 genreich: rote Kurve, Xq25 genarm: grüne Kurve, CT Xi: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests durchgeführt und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Xp11 genreich	27	-282.843	-427.083
Xq25 genarm	27	-304.138	-256.125
CT	27	-274.955	-340.000

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
Xp11 genreich – Xq25 genarm	0.986	0.161
Xp11 genreich – CT	0.416	0.166
Xq25 genarm – CT	0.197	0.431

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung zwischen der genreichen Region Xp11 und der genarmen Region Xq25 innerhalb des aktiven und des inaktiven X-Chromosomenterritoriums.

3.9.4.2 In Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

In den beiden Abbildungen 88 und 89 sind die Ergebnisse der eADS-Auswertung der beiden BAC-Pools innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten dargestellt. Die genreiche Sequenz Xp11 des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms liegt deutlich weiter im Inneren des Zellkerns als die genarme Sequenz Xq25. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (P-Werte siehe unten).

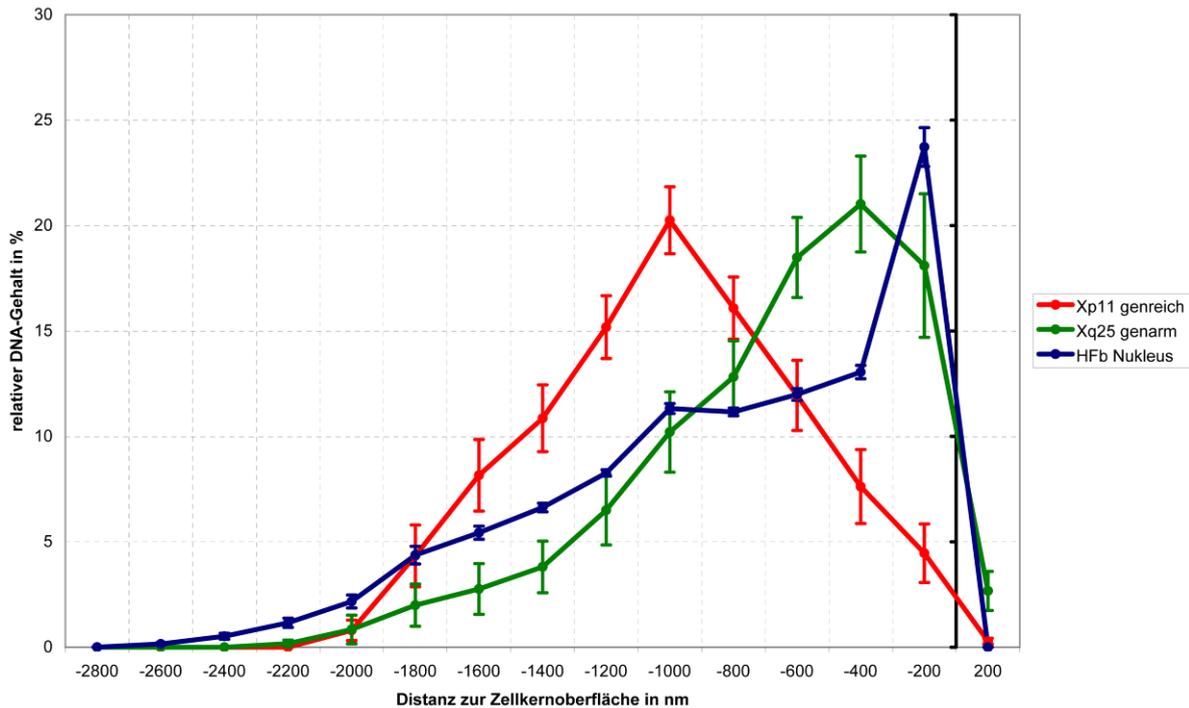


Abbildung 89: radiale Verteilung des RIDGE innerhalb Xp11 und der genarmen Region innerhalb Xq25 des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten
 Xp11 genreich: rote Kurve, Xq25 genarm: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve
 Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Um eine zufällige Verteilung der Werte hier ausschließen zu können, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Xp11 genreich	27	-901.610	-965.195
Xq25 genarm	27	-460.977	-335.410

Pools	P-Wert Xa	P-Wert Xi
Xp11 genreich – Xq25 genarm	<0.001	<0.001

Sowohl die genreichen BAC-Pools des aktiven, als auch des inaktiven X-Chromosoms unterscheiden sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% stark signifikant von den genarmen BAC-Pools. Sie sind also nicht zufällig verteilt, sondern liegen weiter im Inneren des Zellkerns humaner Fibroblasten.

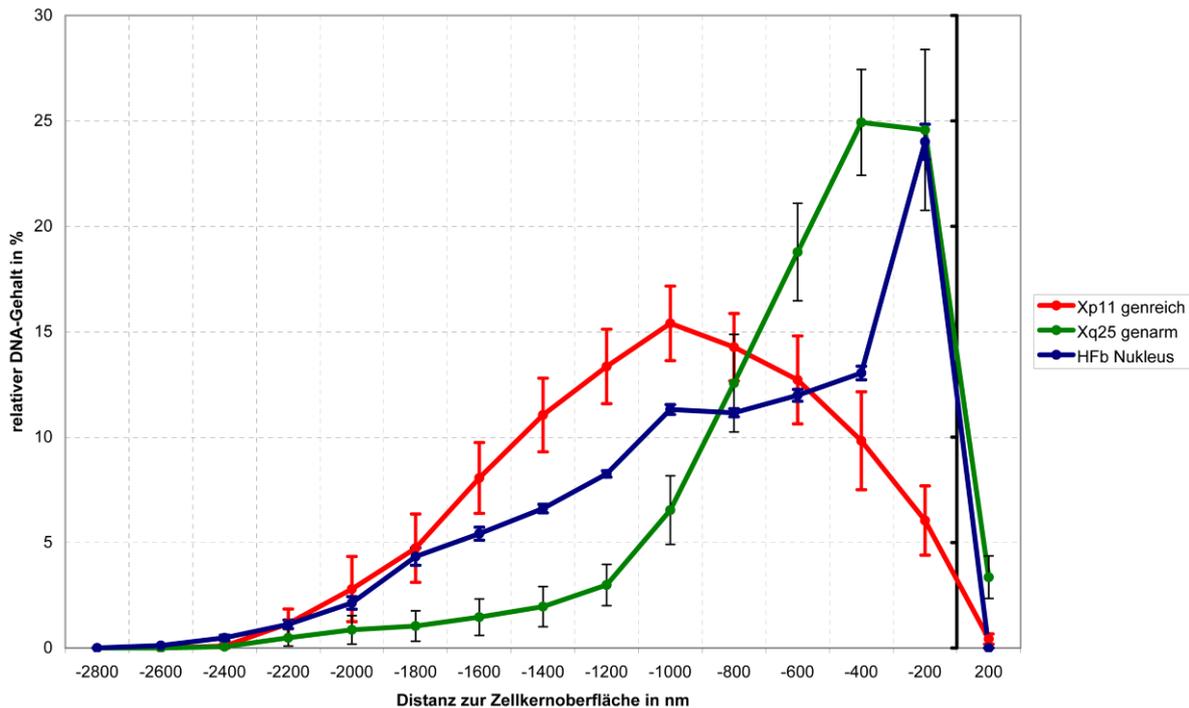


Abbildung 88: radiale Verteilung des RIDGE innerhalb Xp11 und der genarmen Region innerhalb Xq25 des inaktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

Xp11 genreich: rote Kurve, Xq25 genarm: grüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

3.9.4.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse der radialen Verteilung der genreichen Region Xp11 und der genarmen Region Xq25

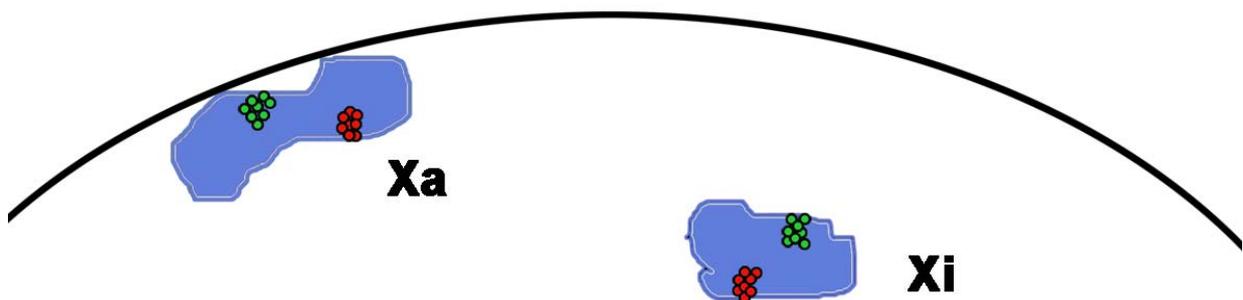


Abbildung 90: Schematische Darstellung der radialen Verteilung der genreichen Region Xp11 und der genarmen Region Xq25 in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern

rot: genreiche Region Xp11, grün: genarme Region Xq25, blau: CT, schwarze Linie: Kernhülle

In der schematischen Abbildung 90 ist die radiale Verteilung einer genreichen Region auf Xp11 im Gegensatz zu einer genarmen Region auf Xq25 in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Zellkern humaner Fibroblasten dargestellt. Die

genreiche Region liegt in beiden Territorien mehr zur Zellkernmitte hin orientiert. In Bezug auf das Chromosomenterritorium ist allerdings kein Unterschied zu finden.

3.10 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des X-Chromosoms

3.10.1 Radiale Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des gesamten X-Chromosoms

Der nächste Schritt war, herauszufinden, ob die Expression von Genen einen Einfluss auf die Lokalisation innerhalb eines Chromosomenterritoriums und innerhalb des Fibroblastenzellkerns hat. Hier wurden zunächst 2 BAC-Pools erstellt, die möglichst das gesamte X-Chromosom abdecken. Dafür wurden alle vorhandenen BACs verwendet, die hoch exprimierte Gene enthalten (n=35), sowie ausgewählte niedrig exprimierte BACs über das ganze Chromosom verteilt (n=100). Die Gendichteumgebung der BACs wurde hier nicht mit einbezogen.

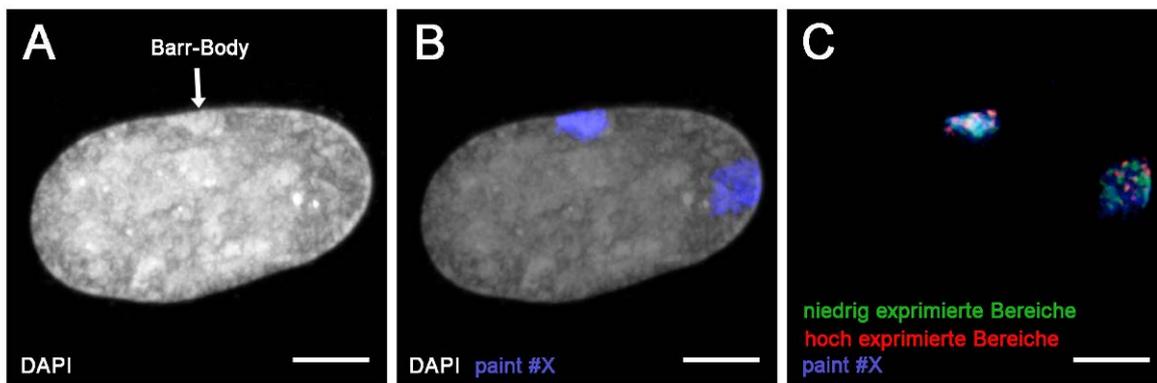


Abbildung 91: Beispiel einer 3D-FISH mit DNA-Sonden für hoch und niedrig exprimierte Bereiche verteilt über das gesamte X-Chromosom

A Z-Projektion der DAPI-Färbung, Pfeil: Barr-Body

B Z-Projektion der DAPI-Färbung + paint #X (blau)

C Z-Projektion der hoch (rot) und niedrig (grün) exprimierten Bereiche + paint #X (blau)

Scalebar: 5µm

3.10.1.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

Nach dem erfolgreichen Testen der BAC-Pools mittels einer 2D-FISH auf humanen Metaphasen, wurden die Pools zusammen mit einer paint-Sonde für das X-Chromosom in einer 3D-FISH auf humane Fibroblasten hybridisiert (Abb.91). Nach der Antikörperdetektion wurden an einem konfokalen Leica SP2 von 27 Zellkernen 3D-Bilderstapel aufgenommen und für das Programm eADS vorbereitet.

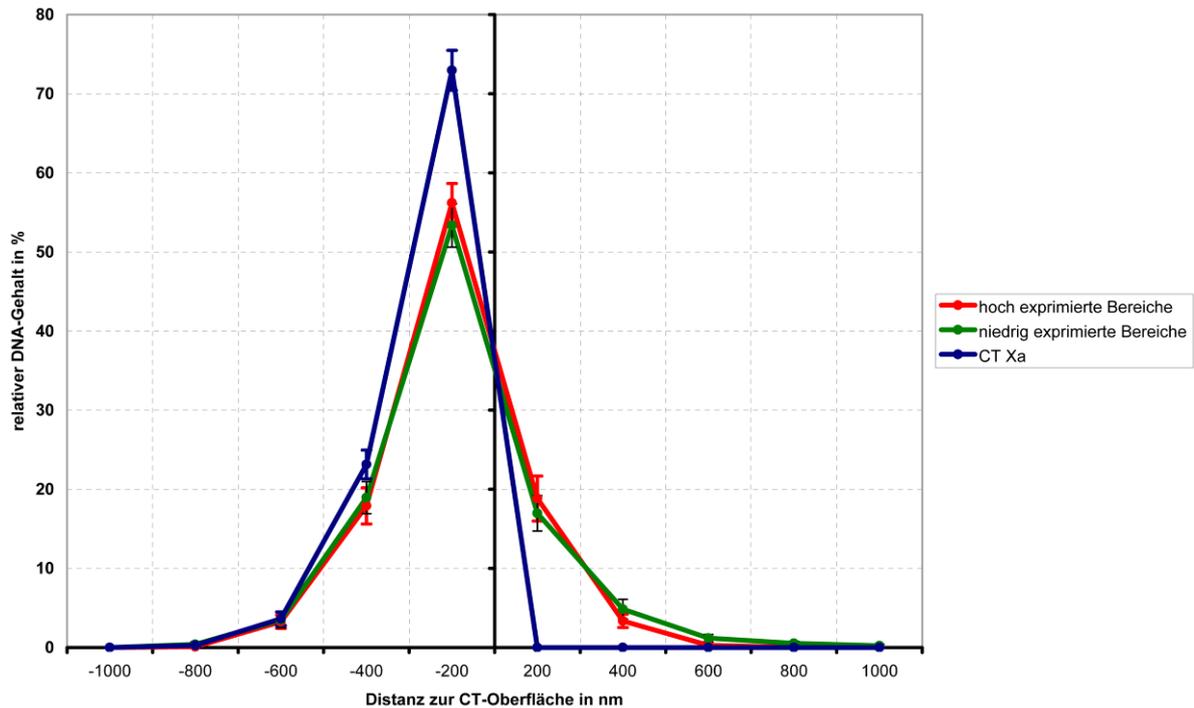


Abbildung 92: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche des gesamten aktiven X-Chromosoms innerhalb des Chromosomenterritoriums

hoch exprimierte Bereiche: rote Kurve, niedrig exprimierte Bereiche: grüne Kurve, CT Xa: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

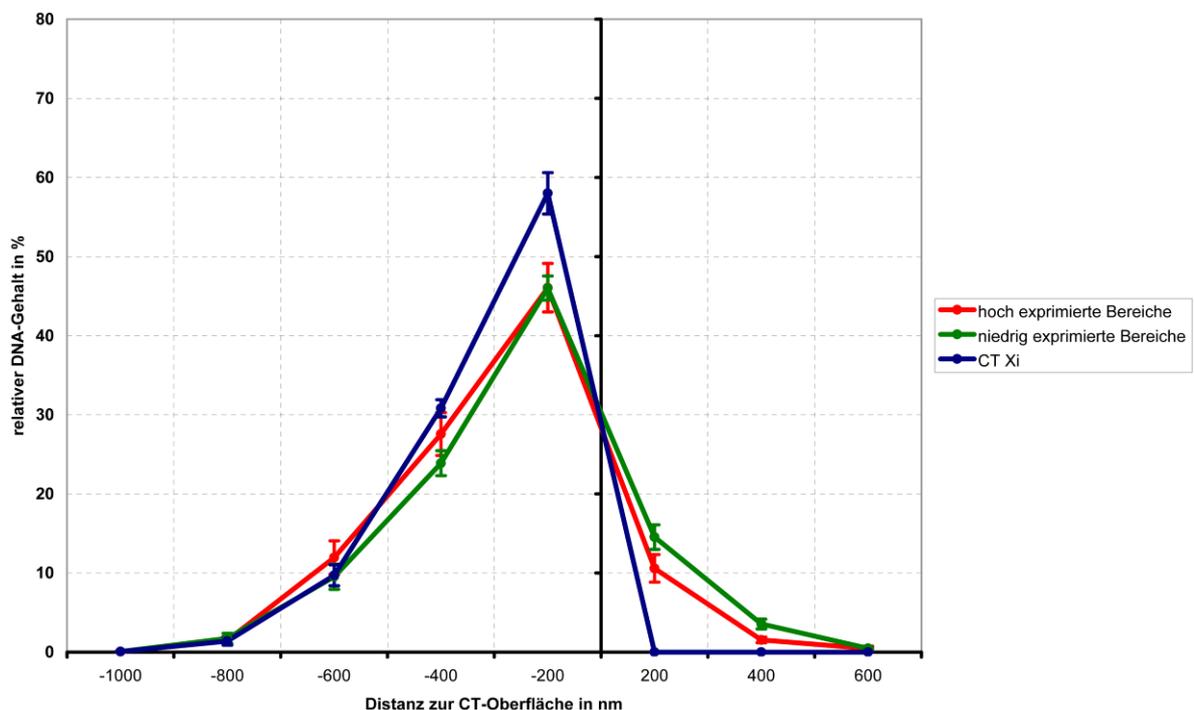


Abbildung 93: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche des gesamten inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Chromosomenterritoriums

hoch exprimierte Bereiche: rote Kurve, niedrig exprimierte Bereiche: grüne Kurve, CT Xi: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Wie deutlich in den Abbildungen 92 und 93 zu sehen ist, besteht weder im aktiven noch im inaktiven X-Chromosom ein Unterschied in der Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche. Beide Pools sind annähernd gleichmäßig im Chromosomenterritorium verteilt. Allerdings sind die beiden BAC-Pools im aktiven X-Chromosom statistisch signifikant unterschiedlich zur Verteilung des Chromosomenterritoriums (hoch exprimiert: $P=0.015$, niedrig exprimiert: $P=0.043$).

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann Whitney Rank Sum-Tests und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool hoch exprimiert	27	-50.000	-160.000
Pool niedrig exprimiert	27	-100.000	-141.421
CT	27	-111.803	-167.631

Es ergaben sich folgende P-Werte:

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
Pool hoch exprimiert – Pool niedrig exprimiert	0.801	0.314
Pool hoch exprimiert – CT	0.015	0.841
Pool niedrig exprimiert – CT	0.043	0.080

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind die in Rot dargestellten P-Werte statistisch signifikant.

3.10.1.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern

Um die Frage zu klären, ob exprimierte Bereiche innerhalb des Zellkerns anders angeordnet sind als nicht oder niedrig exprimierte Bereiche, wurden die Bilderserien des vorausgegangenen Versuchs mit dem Fibroblastenzellkern als Referenzkanal mit dem Programm eADS ausgewertet.

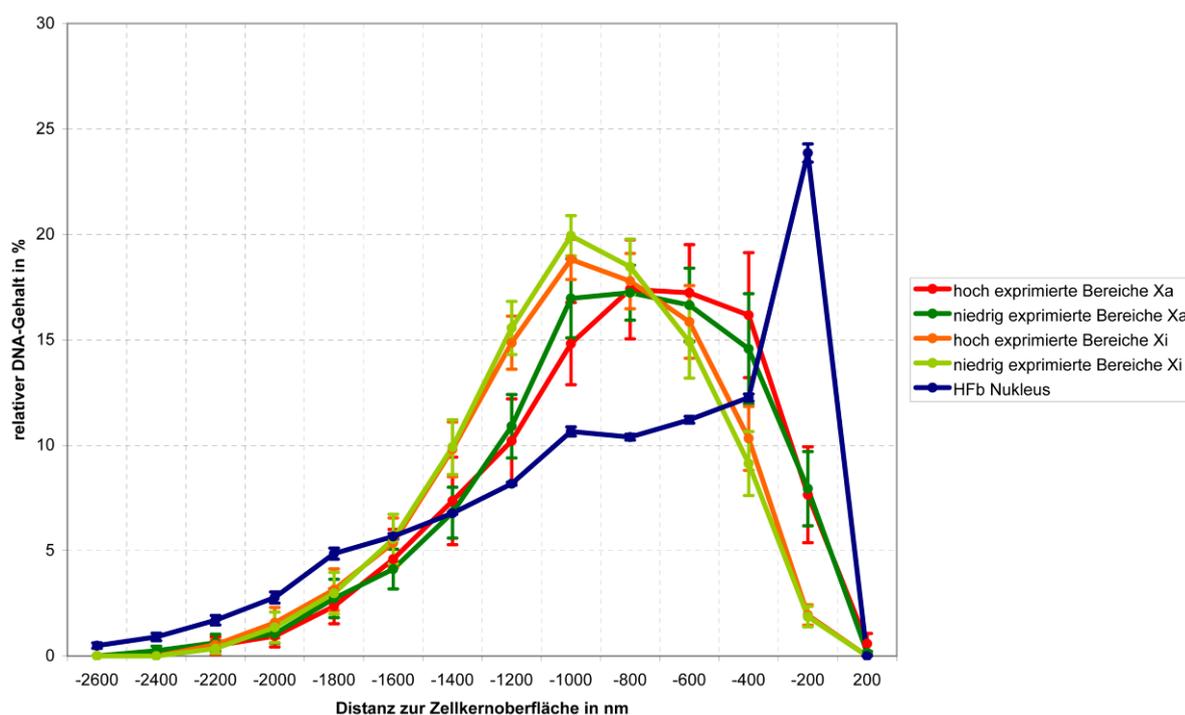


Abbildung 94: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche des gesamten aktiven und inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

hoch exprimierte Bereiche Xa: rote Kurve, niedrig exprimierte Bereiche Xa: grüne Kurve, hoch exprimierte Bereiche Xi: orange Kurve, niedrig exprimierte Bereiche Xi: hellgrüne Kurve, HFb Nucleus: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Wie in der Abbildung 94 zu erkennen ist, sind die hoch und niedrig exprimierten Pools des aktiven X-Chromosoms, sowie auch die beiden Pools des inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Fibroblastenzellkerns relativ gleich verteilt, wobei die beiden Pools des inaktiven X-Chromosoms die Tendenz zeigen, mehr innerhalb des Zellkerns zu liegen. Diese Tendenz geht wahrscheinlich mit dem Ergebnis, dass das inaktive X-Chromosom mehr zur Zellkernmitte orientiert ist als das aktive X-Chromosom (siehe Abschnitt 3.5), einher.

Statistische Auswertung:

Um die Werte auf ihre statistische Signifikanz zu prüfen wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool hoch exprimiert	27	-653.758	-796.618
Pool niedrig exprimiert	27	-729.452	-843.860

Pools	P-Werte
Pool hoch exprimiert Xa – Pool hoch exprimiert Xi	0.063
Pool hoch exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xa	0.734
Pool hoch exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xi	0.078
Pool hoch exprimiert Xi – Pool niedrig exprimiert Xi	0.880
Pool hoch exprimiert Xi – Pool niedrig exprimiert Xa	0.166
Pool niedrig exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xi	0.138

Keiner der hier errechneten P-Werte zeigt eine statistische Signifikanz auf.

3.10.1.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche des gesamten X-Chromosoms

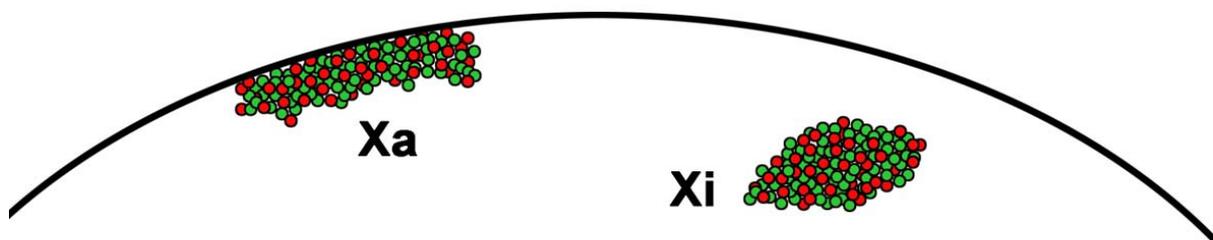


Abbildung 95: Schematische Darstellung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche des gesamten X-Chromosoms

rot: hoch exprimierte Bereiche. grün: niedrig exprimierte Bereiche. schwarzer Balken: Kernhülle

In der Abbildung 95 ist das Ergebnis der radialen Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche verteilt über das gesamte X-Chromosom schematisch dargestellt. Es besteht weder in Bezug auf das Chromosomenterritorium noch in Bezug auf den Fibroblastenzellkern ein Unterschied in der Verteilung. Die hochexprimierten Bereiche sind auf dem inaktiven X-Chromosoms nicht exprimiert, sind hier jedoch auch in rot dargestellt, da sie auch getrennt voneinander ausgewertet wurden.

3.10.2 Radiale Position hoch und niedrig exprimierter Bereiche auf Xp

3.10.2.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

Da kein Unterschied zwischen hoch und niedrig exprimierten Bereichen verteilt über das ganze X-Chromosom beobachtet werden konnte, wurden nun zwei kleine Bereiche auf Xp ausgewählt, die sich in ihrem Expressionsstatus deutlicher unterscheiden (siehe Abschnitt 3.1.2.6.7). Der hoch exprimierte Pool erstreckt sich

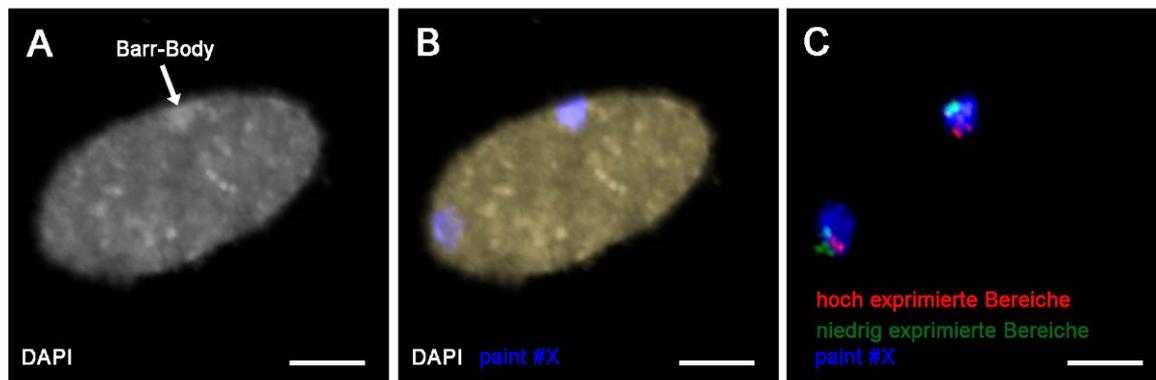


Abbildung 96: Beispiel einer 3D-FISH mit DNA-Sonden für hoch und niedrig exprimierte Bereiche auf Xp

A Z-Projektion der DAPI-Färbung, Pfeil: Barr-Body

B Z-Projektion der DAPI-Färbung + paint #X (blau)

C Z-Projektion der hoch (rot) und niedrig (grün) exprimierten Bereiche + paint #X (blau)

Scalebar: 5µm

über das RIDGE auf Xp. Nach erfolgreicher 2D-FISH wurden die BAC-Pools zusammen mit einer paint-Sonde für das X-Chromosom in einer 3D-FISH auf humane Fibroblasten hybridisiert (Abb.96) und anschließend mit Antikörpern detektiert (siehe Abschnitt 3.4). Nach der Aufnahme von 25 3D-Bilderserien an einem konfokalen Leica SP2 wurden diese in ImageJ prozessiert und anschließend mit eADS ausgewertet.

Wie in der Abbildung 97 zu erkennen ist, liegen die hochexprimierten Bereiche des aktiven X-Chromosoms deutlich weiter innerhalb des Chromosomenterritoriums als die niedrig exprimierten Bereiche. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0.001$). Die verschiedenen exprimierten BAC-Pools im inaktiven X-Chromosom unterscheiden sich nicht in ihrer Verteilung im Chromosomenterritorium (Abb.98).

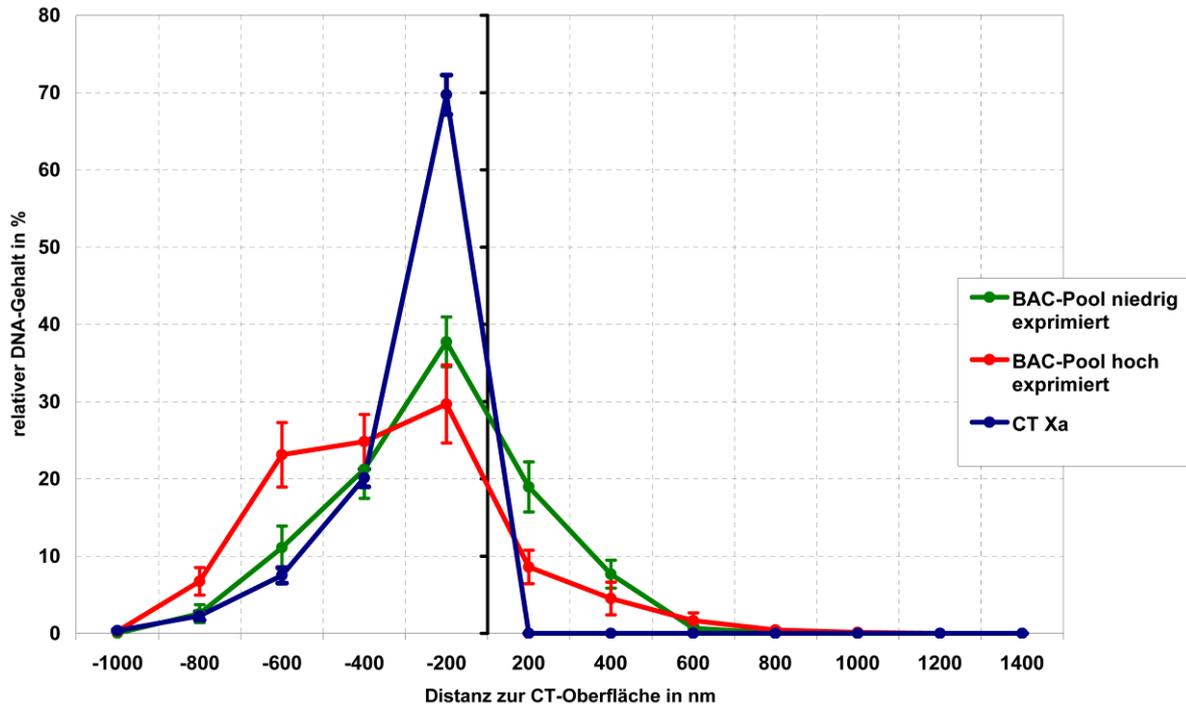


Abbildung 97: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf Xp aktiv innerhalb des Chromosomenterritoriums

hoch exprimierter BAC-Pool: rote Kurve, niedrig exprimierter BAC-Pool: grüne Kurve, CT Xa: blaue Kurve
 Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

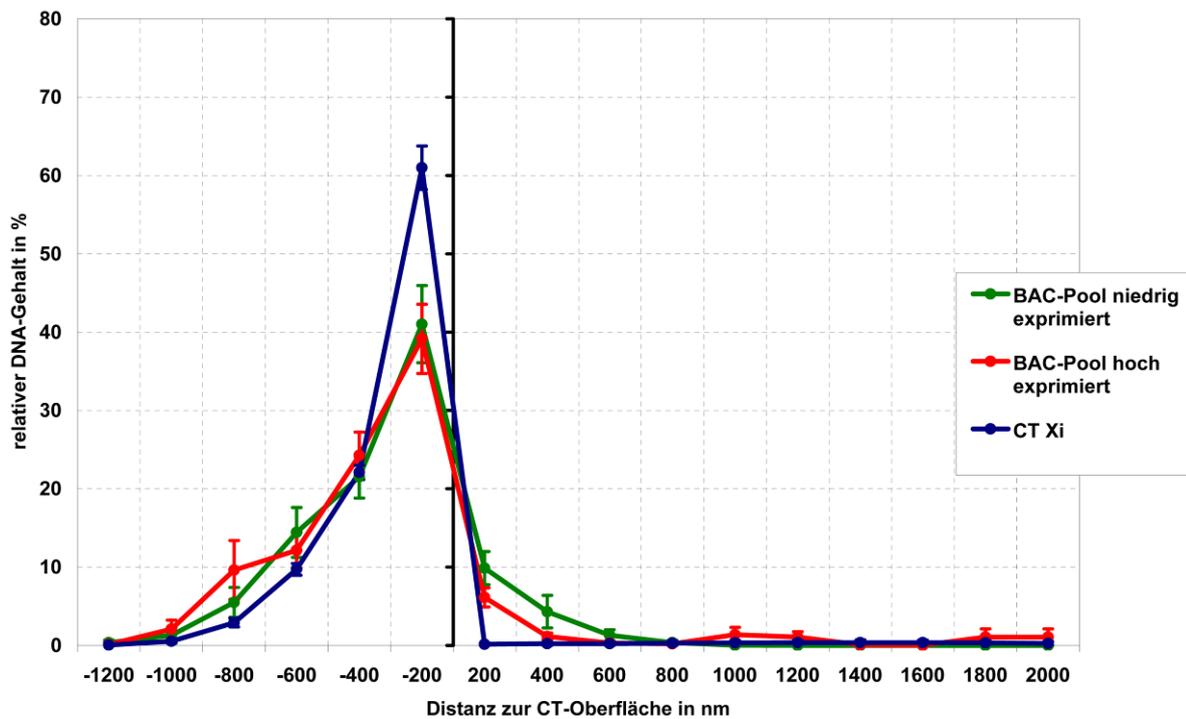


Abbildung 98: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf Xp inaktiv innerhalb des Chromosomenterritoriums

hoch exprimierter BAC-Pool: rote Kurve, niedrig exprimierter BAC-Pool: grüne Kurve, CT Xi: blaue Kurve
 Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung anhand des Mann Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool hoch exprimiert	25	-232.689	-162.599
Pool niedrig exprimiert	25	-118.931	-183.291
CT	25	-105.960	-77.139

Daraus ergeben sich folgende P-Werte:

Pools	P-Wert Xa	P-Wert Xi
Pool hoch exprimiert – Pool niedrig exprimiert	0.001	0.331

Der in Rot dargestellte P-Wert ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch signifikant.

3.10.2.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern

Nachdem ein Unterschied in der Position der hoch und niedrig exprimierten Bereiche innerhalb des aktiven X-Chromosoms gefunden wurde, wurden die gleichen Bilderstapel nun mit dem Zellkern als Referenz in eADS ausgewertet und somit die Lage dieser hoch und niedrig exprimierten Bereiche innerhalb des Nukleus untersucht.

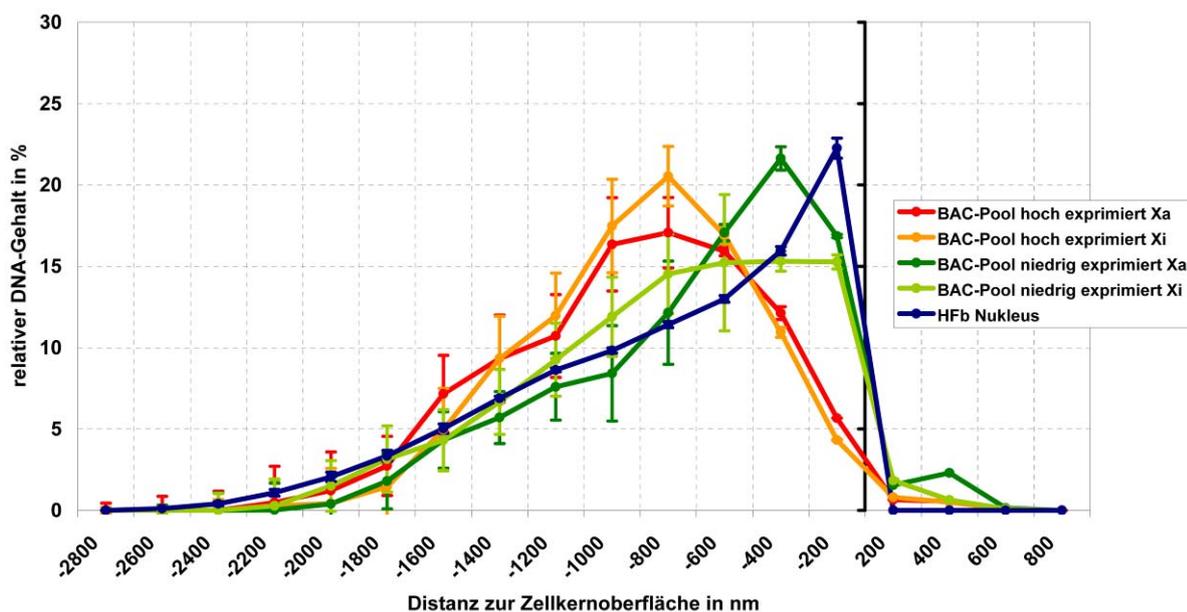


Abbildung 99: radiale Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf Xp des aktiven und inaktiven X-Chromosoms innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten

hoch exprimierte Bereiche Xa: rote Kurve, niedrig exprimierte Bereiche Xa: grüne Kurve, hoch exprimierte Bereiche Xi: orange Kurve, niedrig exprimierte Bereiche Xi: hellgrüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve
Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Wie man in Abbildung 99 deutlich erkennen kann, sind sowohl die hochexprimierten Bereiche des aktiven X-Chromosoms, als auch die korrespondierenden Bereiche auf dem inaktiven X-Chromosom weiter im Inneren des Zellkerns lokalisiert. Im inaktiven X-Chromosom enthalten diese Bereiche allerdings keine exprimierten Gene, sondern nur inaktivierte. Die Bereiche, die keine oder sehr niedrig exprimierte Gene enthalten liegen bei beiden Chromosomen mehr am Zellkernrand. Der Unterschied zwischen den Pools, die die hochexprimierten Gene abdecken und den Pools mit den niedrig exprimierten Bereichen auf dem aktiven X-Chromosom ist statistisch signifikant, während der Unterschied zu den niedrig exprimierten Bereichen auf dem inaktiven X-Chromosom nicht signifikant ist.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung anhand des Mann Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool hoch exprimiert	25	-764.682	-745.015
Pool niedrig exprimiert	25	-513.579	-637.074

Daraus ergeben sich folgende p-Werte:

Pools	P-Werte
Pool hoch exprimiert Xa – Pool hoch exprimiert Xi	0.789
Pool hoch exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xa	0.002
Pool hoch exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xi	0.539
Pool hoch exprimiert Xi – Pool niedrig exprimiert Xi	0.152
Pool hoch exprimiert Xi – Pool niedrig exprimiert Xa	0.016
Pool niedrig exprimiert Xa – Pool niedrig exprimiert Xi	0.174

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind die in Rot dargestellten P-Werte statistisch signifikant.

3.10.2.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung hoch und niedrig exprimierter Bereiche auf Xp

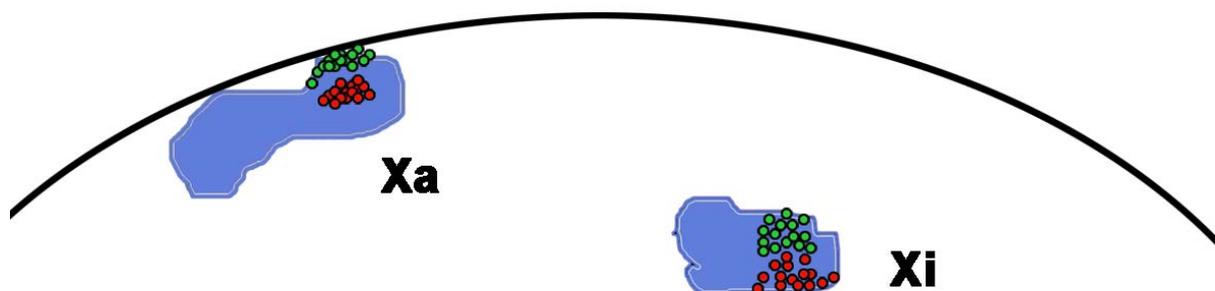


Abbildung 100: Schematische Darstellung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf Xp

rot: hoch exprimierte Bereiche, grün: niedrig exprimierte Bereiche, blau: Chromosomenterritorium, schwarzer Balken: Kernhülle

In der Abbildung 100 ist die Verteilung der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf Xp in Bezug zum Chromosomenterritorium und zum Zellkern humaner Fibroblasten schematisch dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass die exprimierten Bereiche des aktiven X-Chromosoms weiter im Inneren des CTs liegen als die niedrig exprimierten Bereiche. Im Chromosomenterritorium des inaktiven X-Chromosoms sind hoch und niedrig exprimierte Bereiche gleich verteilt. Es ist auch hier wieder zu beachten, dass die hochexprimierten Bereiche auf dem inaktiven X-Chromosom nicht exprimiert sind und nur zur Veranschaulichung der eADS-Kurven anders gefärbt sind. In Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten kann man beobachten, dass beide hochexprimierten BAC-Pools mehr zur Zellkernmitte tendieren, als die niedrig exprimierten Bereiche.

3.11 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb des RIDGEs auf Xp11

In diesem Versuch wurde die radiale Verteilung von BACs, die innerhalb des RIDGEs auf Xp11 liegen und sich in ihrer transkriptionellen Aktivität unterscheiden untersucht, um den Unterschied zwischen sehr hoch und sehr niedrig exprimierten Genen innerhalb einer sehr genreichen, aber räumlich sehr beschränkten Region hinsichtlich ihrer Lage im Chromosomenterritorium und im Zellkern zu definieren. Hierfür wurden ein in Fibroblasten sehr hoch exprimierter BAC, der Pool RIDGE Xp genreich, niedrig exprimiert (bestehend aus 4 BACs) und der Pool RIDGE Xp Rand genarm, niedrig exprimiert (bestehend aus 7 BACs) (siehe Abschnitt 3.1.2.6.3) in einer 2D-FISH auf humane Metaphasen hybridisiert. Nach erfolgreicher 2D-FISH wurden diese Pools zusammen mit einer paint-Sonde für das humane X-Chromosom in einer 3D-FISH auf fixierte humane Fibroblasten hybridisiert (Abb.101) und die DNA-Sonden mittels einer Antikörperdetektion nachgewiesen. An einem konfokalen Leica SP2 wurden 26 Zellkerne als 3D-Bilderstapel aufgenommen, mittels ImageJ bearbeitet und mit dem Programm eADS ausgewertet.

3.11.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

Die Abbildung 102 zeigt die Verteilung der verschiedenen hoch exprimierten Bereiche innerhalb des Chromosomenterritoriums des aktiven X-Chromosoms. Der BAC hochexprimiert/genreich, sowie auch die anderen beiden Pools liegen jeweils gleich verteilt im Chromosomenterritorium. Im inaktiven X-Chromosom (Abb.103) kann ebenfalls nur eine Gleichverteilung aller Kurven beobachtet werden. Es besteht also weder im aktiven, noch im inaktiven X-Chromosom ein Unterschied zwischen transkriptionell aktiven und inaktiven Genen innerhalb einer genreichen Region und zwischen transkriptionell inaktiven genarmen Bereichen in deren Lokalisation innerhalb des Chromosomenterritoriums (P-Werte siehe unten).

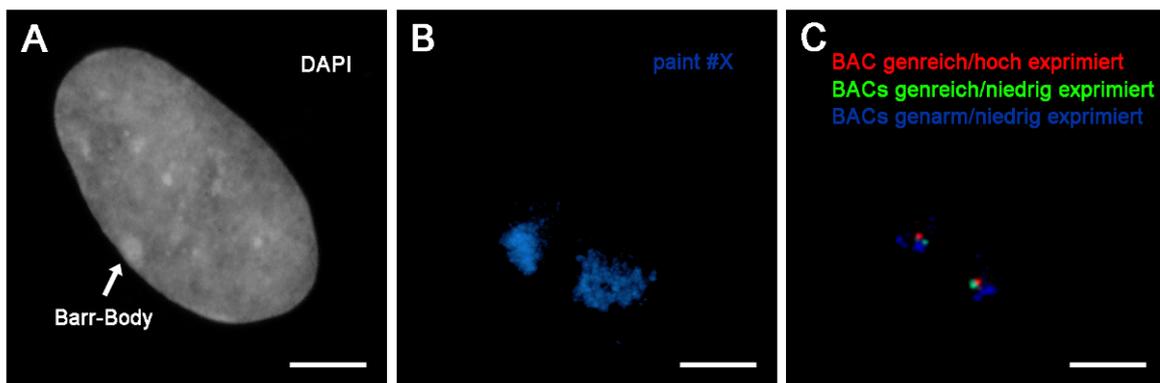


Abbildung 101: Beispiel einer 3D-FISH mit verschieden exprimierten BACs innerhalb des RIDGE Xp
A Z-Projektion der DAPI-Färbung nach der 3D-FISH, Pfeil: Barr-Body
B Z-Projektion des paint #X nach der 3D-FISH
C Z-Projektion verschieden exprimierter BACs nach der 3D-FISH
Scalebar: 5µm

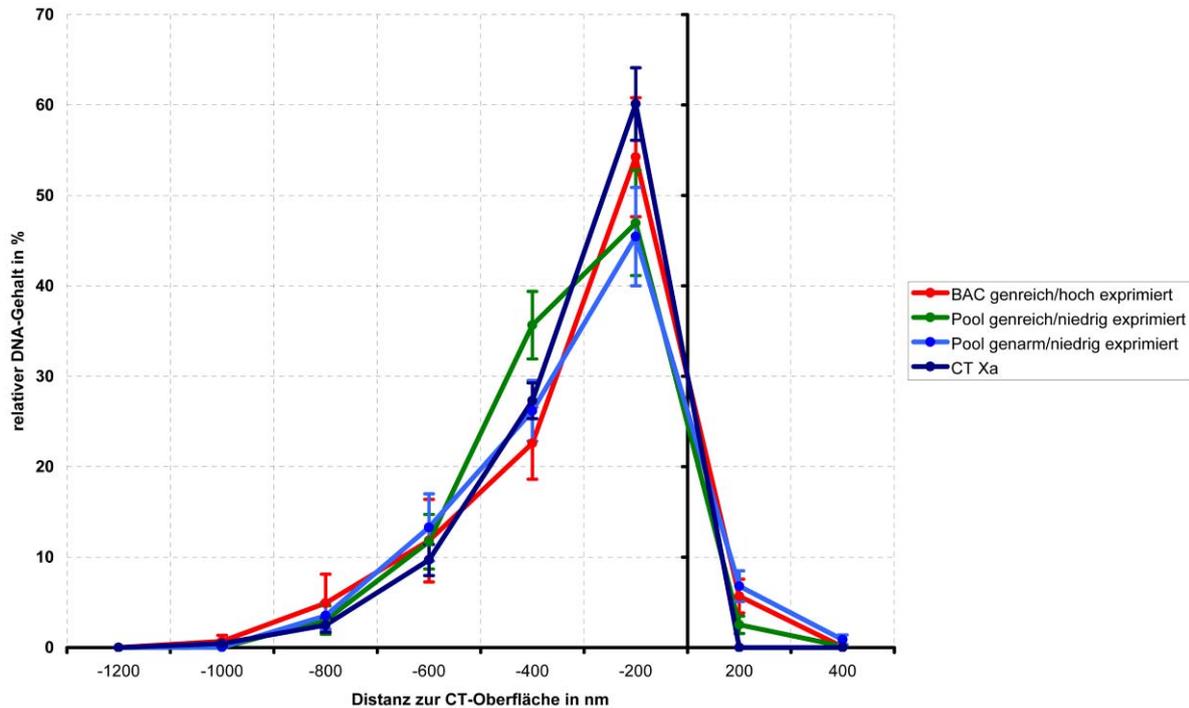


Abbildung 102: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs innerhalb des RIDGE Xp des inaktiven X-Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium

BAC genreich/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool genreich/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool genarm/niedrig exprimiert: hellblaue Kurve, CT Xi: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

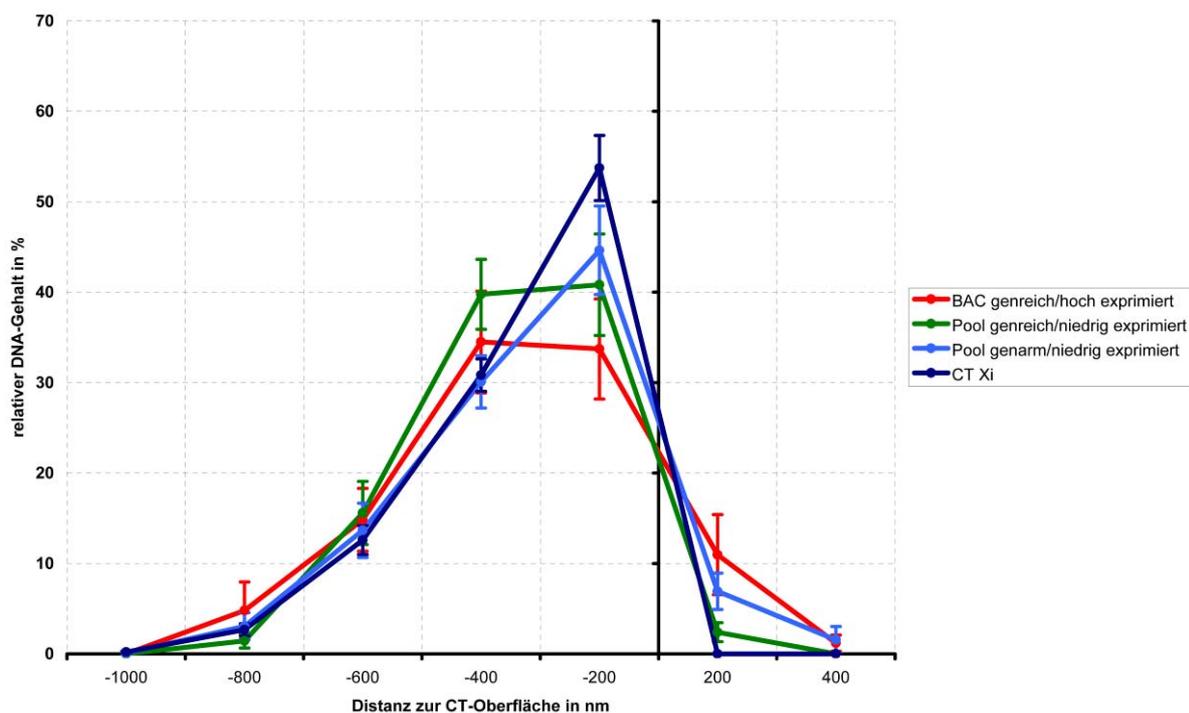


Abbildung 103: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs innerhalb des RIDGE Xp des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf Chromosomenterritorium

BAC genreich/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool genreich/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool genarm/niedrig exprimiert: hellblaue Kurve, CT Xa: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung

Um festzustellen, ob die Werte der einzelnen Kurven zufällig verteilt sind, oder ob sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergibt, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test angewendet. Es ergaben sich folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
BAC genreich/hoch exprimiert	26	-154.057	-260.960
Pool genreich/niedrig exprimiert	26	-187.464	-245.520
Pool genarm/niedrig exprimiert	26	-163.815	-194.235
CT	26	-162.872	-197.418

Pools	P-Werte Xa	p-Werte Xi
BAC genreich/hoch exprimiert - Pool genreich/niedrig exprimiert	0.351	0.927
BAC genreich/hoch exprimiert - Pool genarm/niedrig exprimiert	0.993	0.540
Pool genreich/niedrig exprimiert - Pool genarm/niedrig exprimiert	0.323	0.337
BAC genreich/hoch exprimiert – CT	0.674	0.332
Pool genreich/niedrig exprimiert – CT	0.249	0.249
Pool genarm/niedrig exprimiert – CT	0.862	0.913

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind die errechneten P-Werte statistisch nicht signifikant.

3.11.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern

In den Abbildungen 104 und 105 sind die Ergebnisse der eADS-Auswertung in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten dargestellt. Sowohl die verschiedenen Pools des aktiven X-Chromosoms, als auch die des inaktiven X-Chromosoms unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander (P-Werte siehe unten). Allerdings ist eine Tendenz des BACs genreich/hochexprimiert sich weiter zur Zellkernmitte hin zu orientieren, vorhanden. Diese Tendenz ist sowohl bei dem BAC des aktiven, als auch bei dem BAC des inaktiven X-Chromosoms zu erkennen. Im inaktiven X-Chromosom ist das Gen, das auf dem verwendeten BAC liegt inaktiviert.

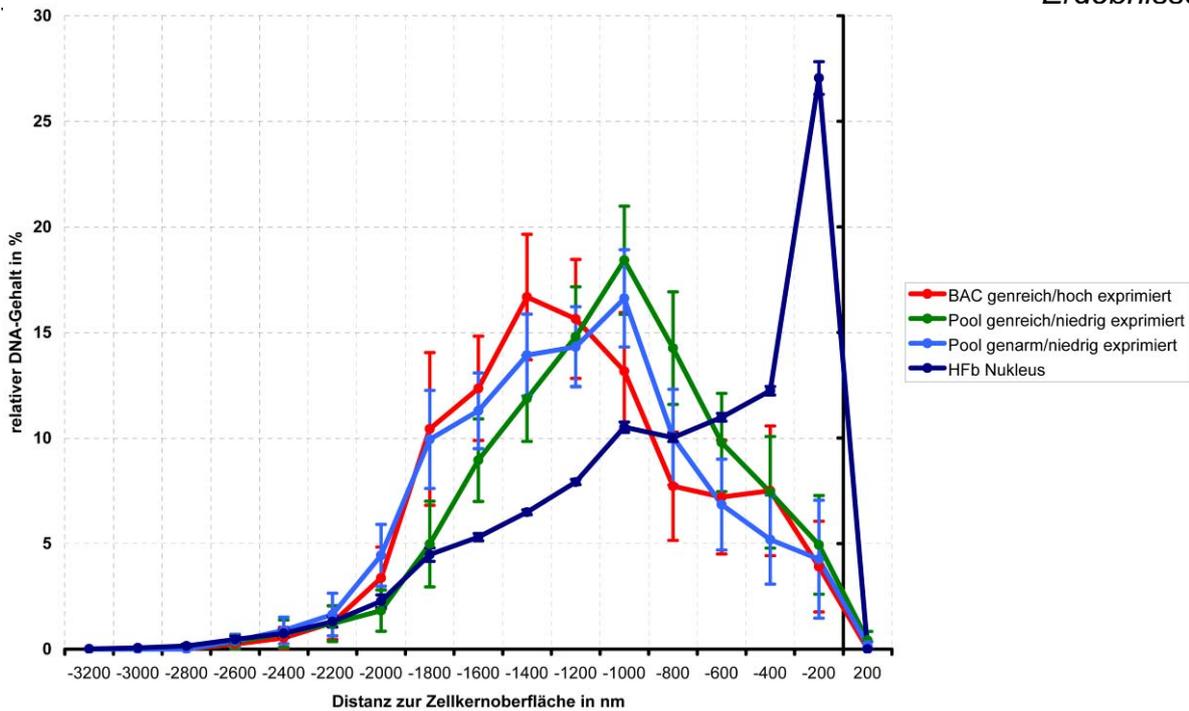


Abbildung 104: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs innerhalb des RIDGE Xp des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

BAC genreich/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool genreich/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool genarm/niedrig exprimiert: hellblaue Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

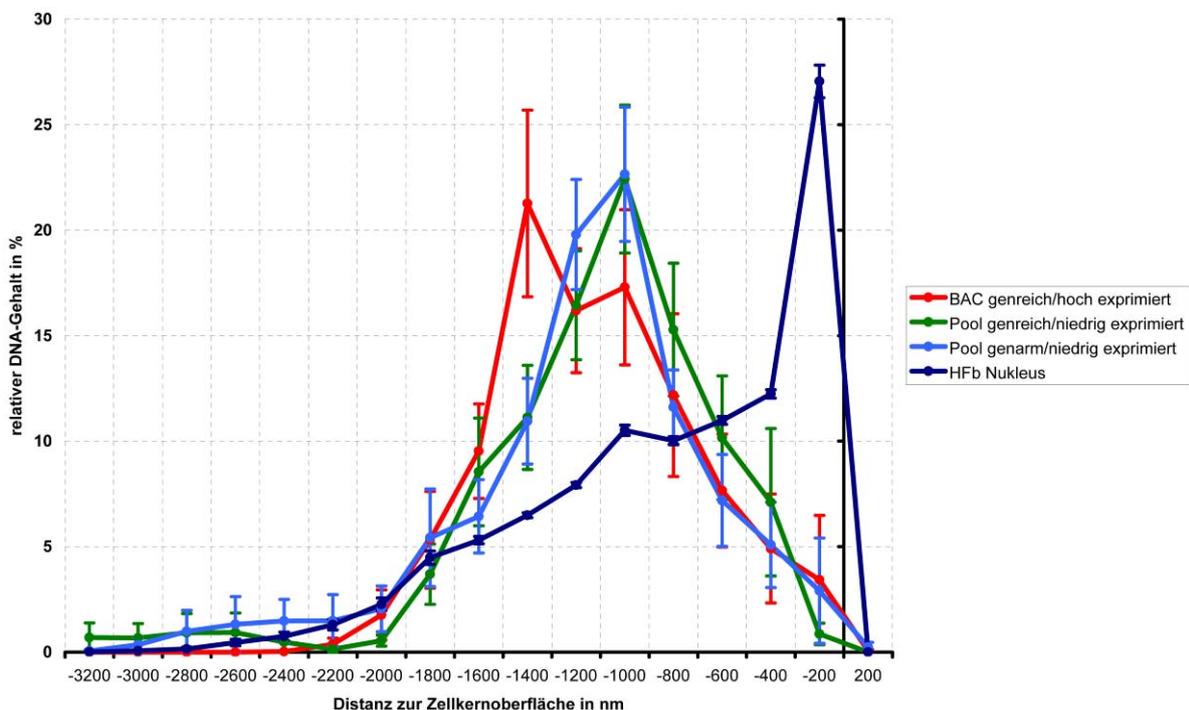


Abbildung 105: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs innerhalb des RIDGE Xp des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

BAC genreich/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool genreich/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool genarm/niedrig exprimiert: hellblaue Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung wurde mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests durchgeführt und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
BAC genreich/hoch exprimiert	26	-1160.061	-1161.724
Pool genreich/niedrig exprimiert	26	-978.672	-952.805
Pool genarm/niedrig exprimiert	26	-1129.973	-974.857

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
BAC genreich/hoch exprimiert - Pool genreich/niedrig exprimiert	0.210	0.552
BAC genreich/hoch exprimiert - Pool genarm/niedrig exprimiert	0.552	0.862
Pool genreich/niedrig exprimiert - Pool genarm/niedrig exprimiert	0.162	0.552

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% sind die errechneten P-Werte statistisch nicht signifikant.

3.11.3 Schematische Darstellung der Ergebnisse der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb eines RIDGEs

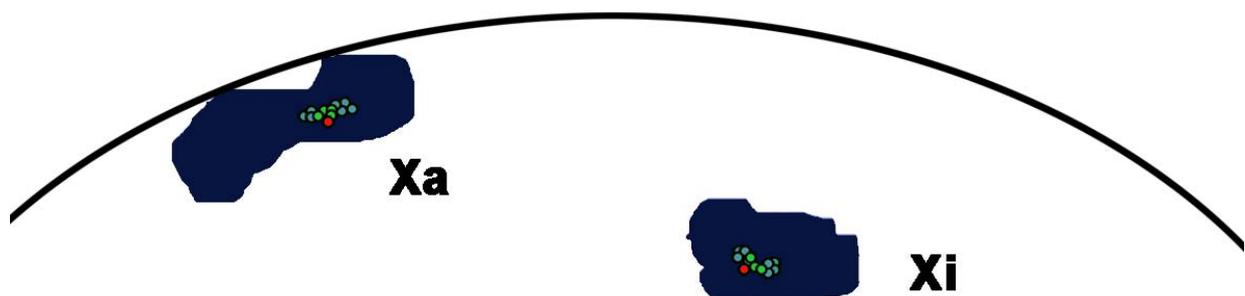


Abbildung 106: Schematische Darstellung der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb eines RIDGEs in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern

rot: hoch exprimierter BAC, grün: Pool genreich, niedrig exprimiert, hellblau: Pool genarm, niedrig exprimiert, blau: CT, schwarze Linie: Kernhülle

In der schematischen Abbildung 106 ist die radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb eines RIDGEs in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Zellkern humaner Fibroblasten dargestellt. Der hochexprimierte genreiche BAC (rot) tendiert in beiden Territorien mehr zur Zellkernmitte hin. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch nicht.

3.12 Radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq25

Da die verschiedenen Pools in der sehr genreichen Region keinen Unterschied in der Lokalisation innerhalb des Chromosomenterritoriums und des Zellkerns zeigten, wurde diesmal eine sehr genarme Region auf Xq25 ausgewählt. Untersucht wurden wieder BAC-Pools mit unterschiedlicher transkriptioneller Aktivität. Pool 1 genarm/niedrig exprimiert und Pool 3 genarm/niedrig exprimiert bestehen aus jeweils 3 BACs, die innerhalb dieser genarmen Region liegen und entweder keine Gene oder nur sehr niedrig exprimierte Gene enthalten. Pool 2 genarm/hoch exprimiert liegt zwischen Pool 1 und Pool 3 und besteht aus 2 BACs, die Gene mit hoher transkriptioneller Aktivität enthalten (siehe Abschnitt 3.1.2.6.4). Zusätzlich zu den 3 BAC-Pools wurde eine paint-Sonde für das humane X-Chromosom verwendet. Nach einer erfolgreichen 2D-FISH auf humane Metaphasen wurden die DNA-Sonden in einer 3D-FISH auf fixierte Fibroblasten hybridisiert (Abb.107) und mittels Antikörpern detektiert. Anschließend wurden 28 Zellkerne als 3D-Bilderstapel an einem konfokalen Leica SP2 aufgenommen und mit ImageJ für das Programm eADS vorbereitet. Als Referenz wurden hier das Chromosomenterritorium und der Fibroblastenzellkern verwendet.

Dieser Versuch und die nachfolgende Auswertung wurden von Doris Illner im Rahmen ihrer Diplomarbeit unter meiner Betreuung durchgeführt.

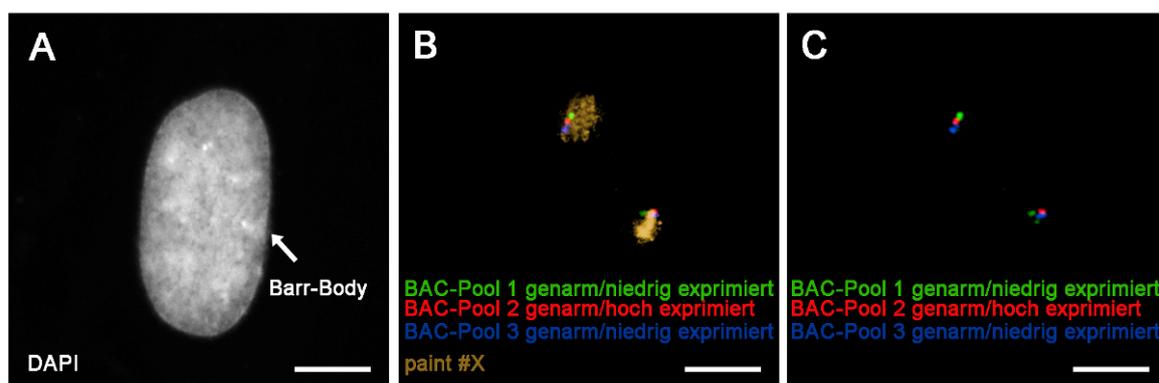


Abbildung 107: Beispiel einer 3D-FISH mit verschiedenen exprimierten BACs innerhalb der genarmen Region auf Xq25

A Z-Projektion der DAPI-Färbung nach der 3D-FISH, Pfeil: Barr-Body

B Z-Projektion des paint #X + BACs nach der 3D-FISH

C Z-Projektion verschieden exprimierter BACs nach der 3D-FISH

Scalebar: 5µm

3.12.1 In Bezug auf das Chromosomenterritorium

In der Abbildung 108 ist die radiale Verteilung der 3 BAC-Pools innerhalb des aktiven X-Chromosomenterritoriums dargestellt. Die BAC-Pools unterscheiden sich untereinander nicht in ihrer Position innerhalb des Territoriums (P-Werte siehe unten). Allerdings sind die BAC-Pools 2 und 3 statistisch signifikant unterschiedlich

zur Verteilung des Chromosomenterritoriums, wobei BAC-Pool 1 hier keine Differenz aufweist.

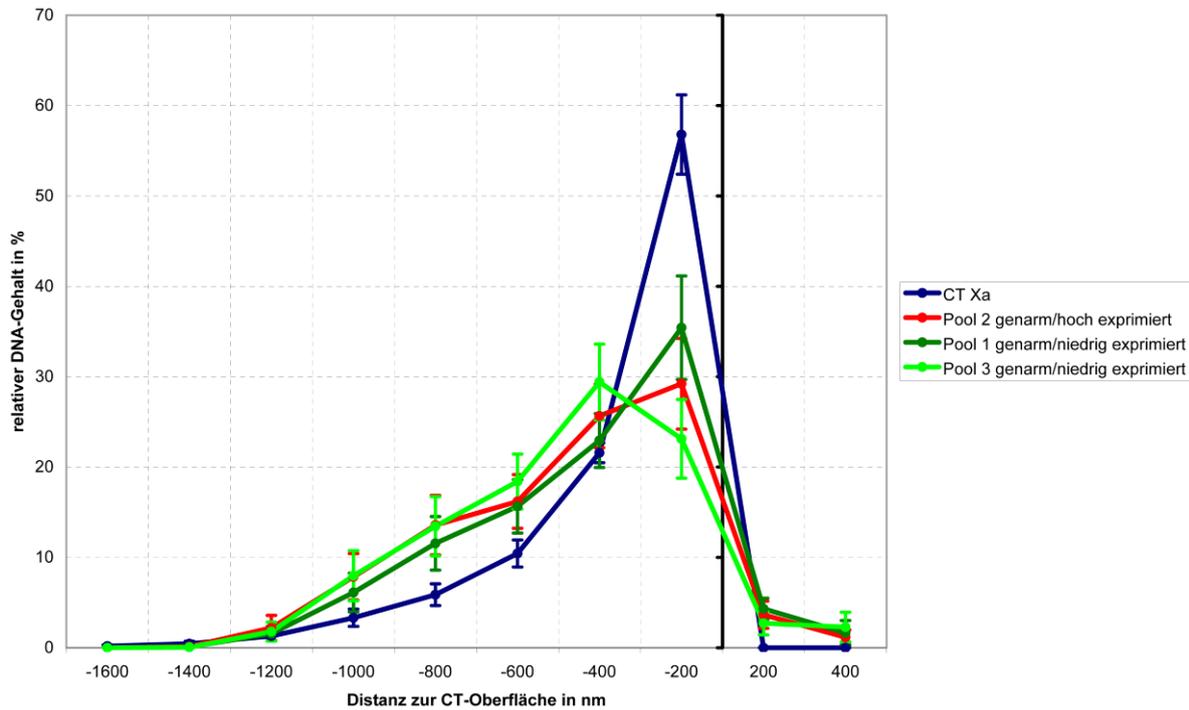


Abbildung 108: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs in der genarmen Region Xq25 des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Pool 1 genarm/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool 2 genarm/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool 3 genarm/niedrig exprimiert: hellgrüne Kurve, CT Xa: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Im inaktiven X-Chromosom sieht die radiale Verteilung der BAC-Pools ähnlich aus. Auch hier ist kein Unterschied zwischen den 3 Pools erkennbar (siehe Abb.109) und lediglich BAC-Pool 3 ist statistisch signifikant unterschiedlich verteilt als das Chromosomenterritorium (P-Werte siehe unten).

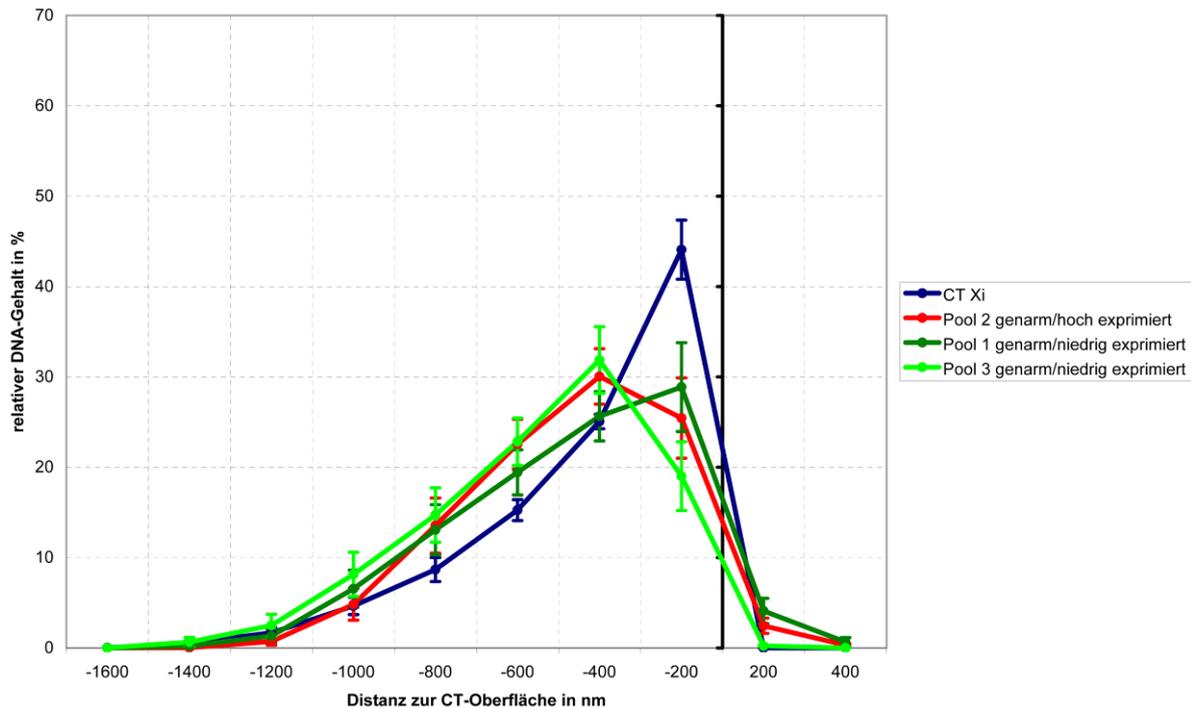


Abbildung 109: radiale Verteilung der verschieden exprimierten BACs in der genarmen Region Xq25 des inaktiven X-Chromosoms in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Pool 1 genarm/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool 2 genarm/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool 3 genarm/niedrig exprimiert: hellgrüne Kurve, CT Xi: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Oberfläche des CTs (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung wurde mittels des Mann Whitney Rank Sum-Tests durchgeführt und ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert	27	-241.039	-335.261
Pool 2 genarm/hoch exprimiert	27	-320.000	-304.138
Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	27	-350.000	-350.000
CT	27	-180.278	-254.951

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert – Pool 2 genarm/hoch exprimiert	0.406	0.736
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert – Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	0.246	0.189
Pool 2 genarm/hoch exprimiert – Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	0.640	0.307
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert – CT	0.169	0.431
Pool 2 genarm/hoch exprimiert – CT	0.019	0.095
Pool 3 genarm/niedrig exprimiert – CT	0.005	0.005

Die in Rot dargestellten P-Werte weisen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% auf eine nicht zufällige Verteilung der Werte hin.

3.12.2 In Bezug auf den Fibroblastenzellkern

In den Abbildungen 110 und 111 sind die Ergebnisse der radialen Verteilung der 3 BAC-Pools innerhalb des Fibroblastenzellkerns dargestellt. Die beiden genarmen, niedrig exprimierten BAC-Pools des aktiven X-Chromosoms liegen etwas weiter am Rand des Zellkerns, als der genarme, hoch exprimierte BAC-Pool. Allerdings ist dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (siehe unten). Die verschiedenen BAC-Pools des inaktiven X-Chromosoms zeigen keinen erkennbaren Unterschied in ihrer Verteilung innerhalb des Zellkerns humaner Fibroblasten.

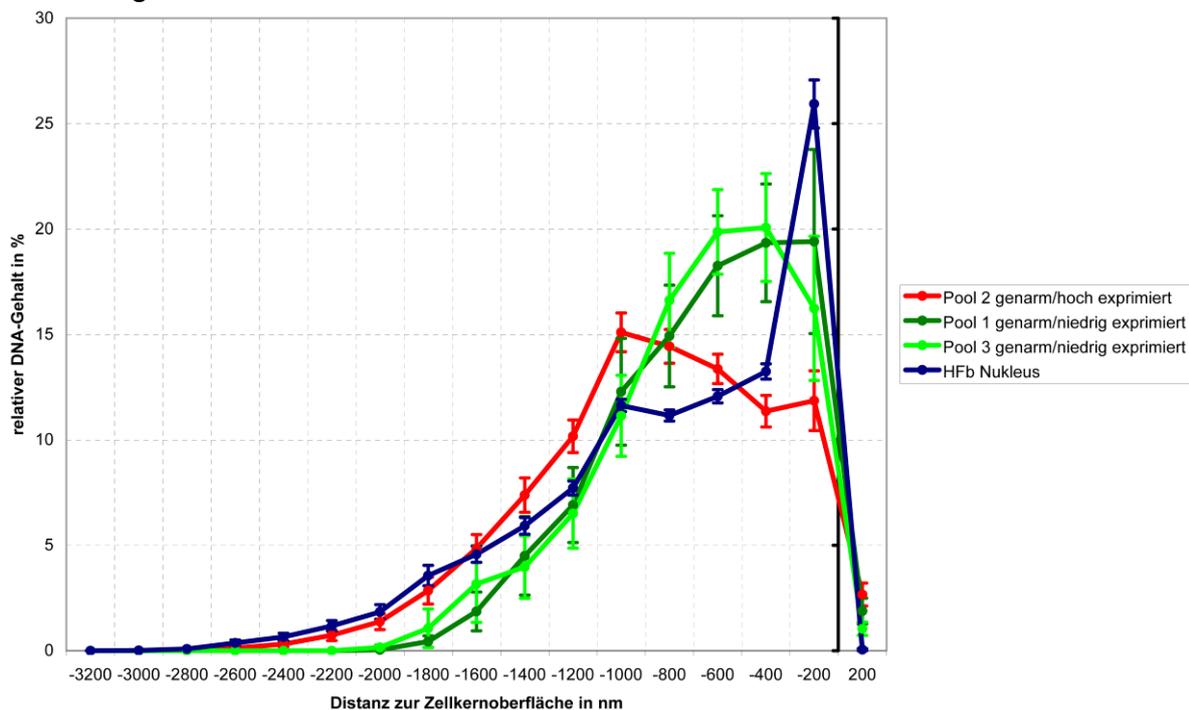


Abbildung 110: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs in der genarmen Region Xq25 des aktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

Pool 1 genarm/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool 2 genarm/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool 3 genarm/niedrig exprimiert: hellgrüne Kurve, HFb Nukleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

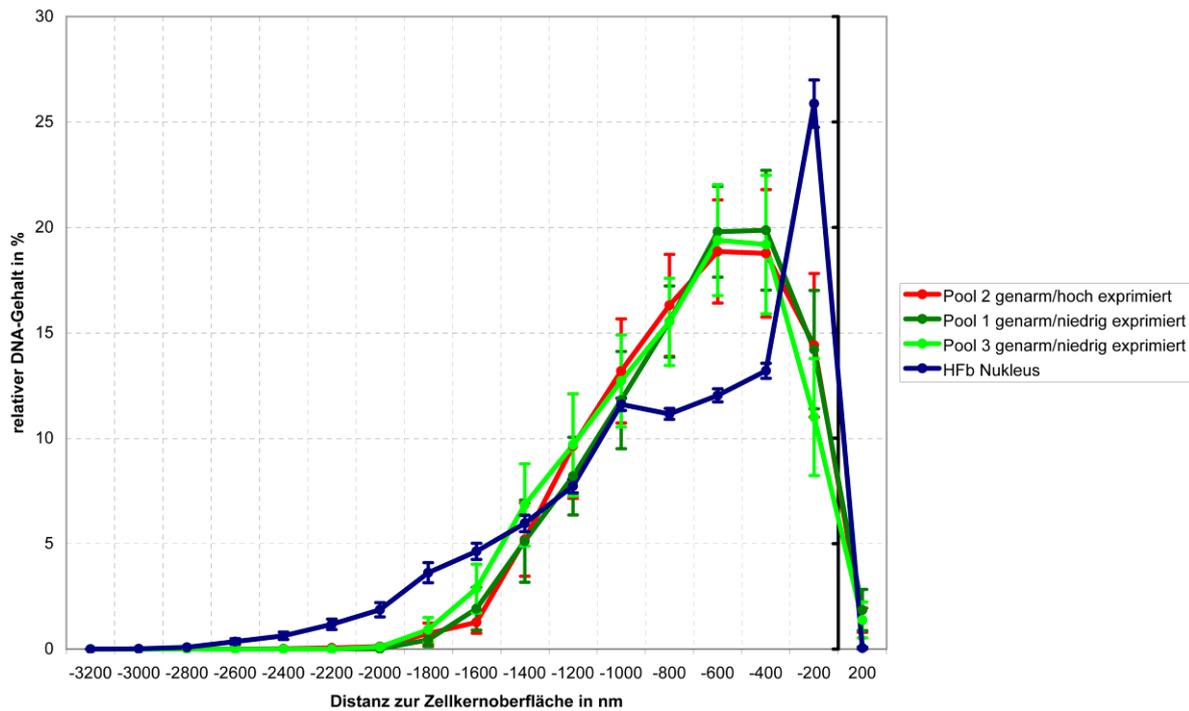


Abbildung 111: radiale Verteilung der verschiedenen exprimierten BACs in der genarmen Region Xq25 des inaktiven X-Chromosoms in Bezug auf den Zellkern humaner Fibroblasten

Pool 1 genarm/niedrig exprimiert: grüne Kurve, Pool 2 genarm/hoch exprimiert: rote Kurve, Pool 3 genarm/niedrig exprimiert: hellgrüne Kurve, HFb Nucleus: blaue Kurve

Die Ordinate zeigt den relativen DNA-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche (bei 0nm, schwarze senkrechte Linie).

Statistische Auswertung:

Um festzustellen, ob die BAC-Pools innerhalb des Fibroblastenzellkerns zufällig verteilt sind, wurde der Mann Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab folgende Werte:

Pools	n	Median Xa	Median Xi
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert	27	-517.061	-445.702
Pool 2 genarm/hoch exprimiert	27	-680.964	-481.160
Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	27	-560.088	-518.178

Pools	P-Werte Xa	P-Werte Xi
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert – Pool 2 genarm/hoch exprimiert	0.066	0.964
Pool 1 genarm/niedrig exprimiert – Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	0.628	0.510
Pool 2 genarm/hoch exprimiert – Pool 3 genarm/niedrig exprimiert	0.087	0.641

3.12.3 Schematische Darstellung der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq25

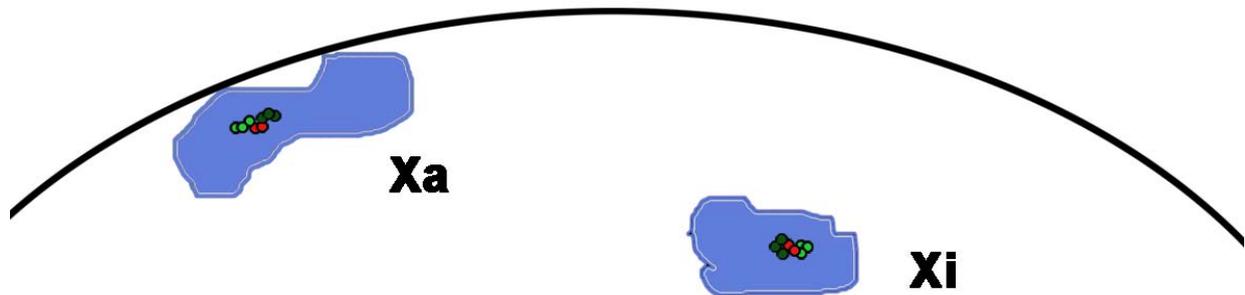


Abbildung 112: Schematische Darstellung der radialen Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq25 in Bezug auf das Chromosomenterritorium und den Fibroblastenzellkern

rot: genarm/hoch exprimiert, hellgrün und dunkelgrün: genarm/niedrig exprimiert, hellblau: Ct, schwarze Linie: Kernhülle

In der Abbildung 112 ist die radiale Verteilung von BACs mit unterschiedlichen Eigenschaften innerhalb einer genarmen Region auf Xq15 dargestellt. Die genarmen/hochexprimierten BACs des aktiven X-Chromosoms tendieren dazu, etwas weiter im Inneren des Fibroblastenzellkerns zu lokalisieren. Jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

3.13 Zusammenfassende Tabelle der Ergebnisse

3.13.1 Radiale Verteilung in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Experiment	Lage im CT #Xa	Lage im CT #Xi
Gendichte 2Mb ganzes X genreich Gendichte 2Mb ganzes X genarm	kein Unterschied	kein Unterschied
RIDGE Xp vs. genarme Region Xq	kein Unterschied	kein Unterschied
Expression ganzes X hoch Expression ganzes X niedrig	kein Unterschied	kein Unterschied
Expression Xp hoch Expression Xp niedrig	hoch exprimierte Bereiche weiter innen	kein Unterschied
RIDGE Xp BAC hoch exprimiert RIDGE Xp BACs niedrig exprimiert	kein Unterschied	kein Unterschied
genarme Region Xq BACs hoch exprimiert genarme Region Xq BACs niedrig exprimiert	kein Unterschied	kein Unterschied

3.13.2 Radiale Verteilung in Bezug auf den Fibroblastenzellkern

Experiment	Lage im HFb Nukleus #Xa	Lage im HFb Nukleus #Xi
ganzes X-Chromosom	weiter außen als Xi	weiter innen als Xa
Xp Xq	Xp tendiert nach innen	kein Unterschied
Xp1, Xp2, Xq1, Xq2	Xp1, Xp2 und Xq3 tendieren weiter nach innen als Xq2	kein Unterschied
1-40Mb, 30-70Mb, 60-100Mb, 90-130Mb, 120-155Mb	alle Pools nahezu gleich verteilt	alle Pools nahezu gleich verteilt
Gendichte 2Mb ganzes X genreich Gendichte 2Mb ganzes X genarm	kein Unterschied	kein Unterschied
Gendichte 10Mb ganzes X genreich Gendichte 10Mb ganzes X genarm	Tendenz des genreichen Pools nach innen	kein Unterschied
RIDGE Xp vs. RIDGE Xq genarme Bereiche Mitte und "tail"	RIDGE Xp und der genarme Mittelbereich liegen deutlich weiter innen	kein Unterschied
RIDGE Xp vs. genarme Region Xq	RIDGE Xp liegt deutlich weiter im Inneren	RIDGE Xp liegt deutlich weiter im Inneren

Experiment	Lage im HFb Nukleus #Xa	Lage im HFb Nukleus #Xi
Expression ganzes X hoch Expression ganzes X niedrig	kein Unterschied	kein Unterschied
Expression Xp hoch Expression Xp niedrig	hoch exprimierte Bereiche weiter innen	Tendenz der hoch exprimierten Bereiche nach innen
RIDGE Xp BAC hoch exprimiert RIDGE Xp BACs niedrig exprimiert	Tendenz des hochexprimierten BAC nach innen	Tendenz des hochexprimierten BAC nach innen
genarme Region Xq BACs hoch exprimiert genarme Region Xq BACs niedrig exprimiert	kein Unterschied	kein Unterschied

3.13.3 Strukturanalysen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms

Experiment	Ergebnis
Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten von Xp1, Xp2, Xq1, Xq2	Distanzen im aktiven X-Chromosom deutlich größer als im inaktiven X-Chromosom
Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten der 10 Mb-Pools	Inaktives X-Chromosom enger gefaltet als aktives X-Chromosom
Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten von Xp1, Xp2, Xq1, Xq2	Distanzen im aktiven X-Chromosom größer als im inaktiven X-Chromosom
Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der 10 Mb-Pools	Inaktives X-Chromosom enger gefaltet als aktives X-Chromosom

4 Diskussion

Bereits im Lichtmikroskop kann man deutliche Unterschiede zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom beobachten. Während das aktive X-Chromosom eine unregelmäßige, unklare Form zeigt, ist das inaktive X-Chromosom als meist ebenmäßiger, rundlicher Barr-Body zu erkennen. Wo aber liegen diese Unterschiede, die sich so deutlich in der Form erkennbar machen? In dieser Arbeit wurde das X-Chromosom auf verschiedenen Ebenen untersucht, und versucht, einige dieser Unterschiede zu finden.

4.1 Anordnung von Chromosomenterritorien im Zellkern

Höhere Ordnungsstrukturen des Chromatins im Zellkern sind in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Man geht davon aus, dass sie eine große Rolle in der funktionellen Aktivität eines Zellkerns spielt. Eine Ebene dieser Ordnung stellt die Positionierung von Chromosomenterritorien an sich dar. Hierzu gibt es kontroverse Auffassungen. In frühen Studien konnte man zeigen, dass sich Nucleolus Organizing Region (NOR)-tragende Chromosomen präferentiell an den Nucleoli im Zellkern anordnen (Manuelidis 1990), und dass das inaktive X-Chromosom in humanen Fibroblastenzellkernen am Zellkernrand lokalisiert und mit der Zellkernwand in Berührung steht (Bourgeois, Laquerriere et al. 1985). Dies konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Beide X-Chromosomen liegen zwar randständig, jedoch nimmt das inaktive X-Chromosom eine mehr nach Innen gerichtete Position im Zellkern humaner Fibroblasten ein, als das aktive X-Chromosom. In humanen Fibroblasten-Prometaphaserosetten wurden homologe Chromosomen jeweils gegenüberliegend gefunden, was zu der Annahme führt, dass sie in zwei haploide Sets aufgeteilt sind, die von jeweils einem Elternteil stammen und eine nicht-zufällige Anordnung zeigen (Nagele, Freeman et al. 1995; Nagele, Freeman et al. 1998). Auch in ruhenden humanen Fibroblasten (G₀-Phase) sowie in ausdifferenzierten humanen Bronchialzellen zeigten bestimmte Chromosomenpaare ein nicht-zufälliges Muster im Zellkern (Koss 1998; Nagele, Freeman et al. 1999). Bolzer et al haben in einer Studie in humanen Fibroblasten sowie in Zellkernen von amniotischen Zellen eine größenabhängige Anordnung der Chromosomenterritorien im Zellkern beobachtet. Kleine Chromosomen liegen, unabhängig von ihrer Gendichte, weiter im Inneren des Zellkerns als große Chromosomen (Bolzer, Kreth et al. 2005). Dieses Ergebnis läuft konform zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der beide X-Chromosomen, die mit 155 Megabasen zu den eher größeren Chromosomen zählen, in Zellkernen ruhender humaner Fibroblasten randständig orientiert sind.

Andere Untersuchungen in humanen Lymphozyten bestätigen eine Gendichte-, aber nicht größenabhängige Anordnung der Chromosomen im Zellkern. So wurde für die Chromosomen 18 und 19, die eine ähnliche Größe aufweisen (CT #18: 76Mb, CT #19: 64Mb) eine eindeutige Positionierung nachgewiesen. Chromosom 18, das mit

5.6 Genen/Mb das genärmste Chromosom im menschlichen Genom ist, liegt hier eher an der nukleären Peripherie, während Chromosom 19, das mit 26.5 Genen/Mb das reichste menschliche Chromosom ist, im Inneren des Zellkerns verschiedener Zelltypen liegt (Croft, Bridger et al. 1999; Boyle, Gilchrist et al. 2001; Cremer and Cremer 2001a; Cremer, Küpper et al. 2003). Eine Studie zu Translokationshäufigkeiten zwischen verschiedenen Chromosomen bestätigt diese Gendichte-abhängige Verteilung. Man fand heraus, dass es mehr Translokationen zwischen den humanen Chromosomen #17, #19 und #21 gibt, die aufgrund ihrer Gendichte im Inneren des Zellkerns positioniert sind und somit eine räumliche Nähe zueinander aufweisen, als zwischen anderen Chromosomen (Bickmore and Teague 2002). Das humane X-Chromosom ist mit 8.6 Genen/Mb ein genarmes Chromosom und liegt in den Versuchen dieser Arbeit randständig im Zellkern humaner Fibroblasten. Somit kann diese Gendichte-abhängige radiale Verteilung ganzer Chromosomen bestätigt werden. Möglicherweise kann man somit in flachen Zellkernen, wie denen der Fibroblasten, von einer größenabhängigen Verteilung der Chromosomen ausgehen, während in kugeligen Zellkernen, wie denen der Lymphozyten die Gendichte eine große Rolle bei der Anordnung der Chromosomen spielt. Neusser et al untersuchten die Gendichte- und Größen-abhängige Verteilung von Chromosomen im Fibroblastenzellkern von Wolf-Meerkatzen, deren Chromosomen alle mehr oder weniger gleich groß sind, und fanden hier auch in flachen, ellipsoiden Zellkernen eine eindeutige Gendichte-abhängige Anordnung des Chromatins (Neusser, Schubel et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass die Anordnung der großen Chromosomen am „Äquator“ des Zellkerns die Folge einer geometrischen Notwendigkeit ist.

Diese Untersuchungen und Ergebnisse lassen auf eine nicht-zufällige höhere Ordnung schließen, die eine besondere Wichtigkeit für die Funktionen im Zellkern innehat. Jedoch sind die Muster, die Chromosomen in ihrer Positionierung aufzeigen statistische Repräsentationen von Chromosomenpositionen, die keinerlei Informationen über genaue Koordinaten eines bestimmten Chromosoms in einem bestimmten Zellkern geben, sondern es ist wichtig zu erkennen, dass, obwohl signifikante nicht-zufällige Chromosomenanordnungen gefunden werden, diese Muster ein gewisses signifikantes Maß an Unsicherheit mit sich bringen und lediglich eine präferierte, probabilistische Position eines bestimmten Chromosoms im Zellkern darstellen (Parada, Roix et al. 2003).

4.2 Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern

4.2.1 Einfluß der Gendichte auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern

Wie bereits in Abschnitt 4.1 für ganze Chromosomenterritorien beschrieben, hat die Gendichte einen wichtigen Einfluss auf die Lokalisation von Chromatin im Zellkern. Auch für subchromosomale Bereiche kann eine Gendichte-abhängige Verteilung im

Zellkern beobachtet werden. Translozierte Domänen derivativer Chromosomen nehmen fast die gleiche radiale Position im Zellkern ein wie die entsprechenden nicht rearrangierten, normalen Chromosomen (Croft, Bridger et al. 1999; Cremer, Küpper et al. 2003). Dieses Muster ist sogar in verschiedenen Spezies hochkonserviert. So konnte gezeigt werden, dass Regionen rearrangierter Chromosomen, die sich in ihrer Gendichte unterscheiden, sich polar anordnen, wobei genreiches Chromatin wiederum mehr im Inneren des Zellkerns lokalisiert als genarmes Material (Tanabe, Muller et al. 2002b; Neusser, Schubel et al. 2007).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass centromerisches Heterochromatin weiter am Zellkernrand lokalisiert, als die Gene des korrespondierenden Chromosomenterritoriums (Salníková, Kozubek et al. 2000). Auch in der Maus konnte dies anhand eines 4.3 Mb großen Genabschnitts auf MMU #14 beobachtet werden. In diesem Abschnitt befinden sich 4 Cluster mit transkriptionell aktiven Genen, die durch sogenannte „deserts“, Bereiche ohne Gene, voneinander getrennt sind. Diese „deserts“ fand man weiter zur Zellkernperipherie hin orientiert als die Gencluster, die sich zur Zellkernmitte hin orientierten (Shopland, Lynch et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse fand man bei einzelnen Genen, die sich mehr im Inneren des Zellkerns befanden als die intergenischen Sequenzen des korrespondierenden Chromosomenterritoriums (Scheuermann, Tajbakhsh et al. 2004). Bisher wurde diese Gendichte-abhängige Verteilung chromosomaler Subabschnitte hauptsächlich in runden cyclierenden Zellkernen, wie der der Lymphozyten beschrieben (Bridger, Boyle et al. 2000). In flachen, ellipsoiden, ruhenden Zellkernen (G₀-Phase), wie der der Fibroblasten wurde für Chromosomen eher eine größen-abhängige Verteilung gesehen (Croft, Bridger et al. 1999; Cremer and Cremer 2001a; Bolzer, Kreth et al. 2005). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass genreiche subchromosomale Abschnitte der Chromosomen # 11, #12, #18 und #19 sowohl in runden Zellkernen, als auch in flachen ellipsoiden Zellkernen ruhenden Fibroblasten eine Gendichte-abhängige radiale Verteilung vorherrscht. Gendichte Chromatinabschnitte wurden auch hier wieder mehr zentral im Zellkern gefunden als genarme Chromatinbereiche, die weiter am Zellkernrand lokalisieren (Küpper, Kölbl et al. 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden mehrere verschiedene subchromosomale Bereiche des humanen X-Chromosoms hinsichtlich ihrer Gendichte-abhängigen Verteilung innerhalb des Zellkerns ruhender Fibroblasten untersucht.

Das humane X-Chromosom ist mit 8.6 Genen/Mb ein eher genarmes Chromosom. Dennoch besitzt es zwei Regionen, sogenannte RIDGEs (siehe Abschnitt 1.3.1), die außer einer überdurchschnittlichen Expression von Genen auch gleichzeitig sehr genreich sind (>15 Gene/Mb). Ein RIDGE befindet sich auf dem p-Arm in der Region Xp11, das andere lokalisiert auf dem q-Arm in der subtelomerischen Region Xq28. Eine besonders genarme Region (3.5 Gene/Mb) findet man in der Region Xq25 auf dem q-Arm. Das restliche X-Chromosom weist keine besonderen Schwankungen in der Gendichte auf.

Um die radiale Verteilung genreicher und genarmer Chromatinabschnitte des humanen X-Chromosoms zu untersuchen, wurde schrittweise vorgegangen und dabei die Positionierung von großen Abschnitten, wie ganzen Chromosomenarmen bis hin zu einzelnen Genen im Zellkern humaner Fibroblasten untersucht.

Ganze Chromosomenarme

Die radiale Verteilung der Chromosomenarme p und q zeigte weder im aktiven X-Chromosom, als auch im inaktiven X-Chromosom signifikante Unterschiede. Jedoch kann eine Tendenz des p-Arms des aktiven X-Chromosoms sich etwas mehr zur Zellkernmitte zu orientieren, beobachtet werden. Auf dem p-Arm befindet sich das RIDGE Xp11, welches in der Nähe des Centromers liegt und sehr genreich ist. Centromere clustern meist an der Zellkernperipherie (Weierich, Brero et al. 2003). Daher war zu erwarten, dass das RIDGE auf Xp11 zur Zellkernmitte hin tendiert, während das Centromer zur Zellkernperipherie zieht. Somit kann nur ein geringer Effekt beobachtet werden. Das RIDGE auf Xq28 befindet sich in der subtelomerischen Region Xq28. Da sich Telomere normalerweise weiter im Inneren des Zellkerns befinden als Centromere (Weierich, Brero et al. 2003) ist dieser Effekt hier nicht zu erklären.

Unterteilte Chromosomenarme

Unterteilt man den p- und den q-Arm in jeweils zwei gleich große Teile, sieht man wieder deutlich eine internere Position der p-Arm-Teile im Vergleich zu den q-Arm-Teilen im aktiven X-Chromosom. Hier gibt es sogar signifikante Unterschiede. Beide Teile des p-Arms, sowie der erste Teil des q-Arms liegen signifikant weiter im Inneren des Zellkerns als der zweite Teil des q-Arms. Also ist hier auch wieder der Teil des Chromosoms, auf dem das RIDGE Xp11 liegt intern lokalisiert als das RIDGE Xq28. Im inaktiven X-Chromosom hingegen finden sich keine Unterschiede.

Das X-Chromosom in 10Mb-Abschnitten

Verfeinert man nun die Abschnitte des X-Chromosoms hin zu 10Mb großen Teilen und untersucht deren radiale Verteilung einzeln im Zellkern humaner Fibroblasten, so ist auf das gesamte aktive und inaktive X-Chromosom gesehen kein signifikanter Unterschied vorhanden. Genreiche und genarme Bereiche sind hier gleich verteilt. Im aktiven X-Chromosom kann man wieder eine Tendenz des RIDGE Xp11, sich weiter im Inneren des Zellkerns zu positionieren, erkennen. Dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant. Somit kann eine eindeutige Gendichteorientierte Anordnung innerhalb von 10Mb großen Stücken entlang des humanen X-Chromosoms im Fibroblastenzellkern nicht bestätigt werden. Dies könnte allerdings an der allgemeinen Genarmut dieses Chromosoms liegen, sowie an der meist gleichmäßigen Verteilung von Genen über das gesamte Chromosom.

Gendichte-abhängige Verteilung innerhalb eines 2Mb-Fensters

Murmann et al haben die Hypothese aufgestellt, dass die Gendichte innerhalb eines 2Mb großen Fensters den größten Einfluss auf die Positionierung von Genen innerhalb des Zellkerns hat (Murmann, Gao et al. 2005). In dieser Arbeit wurden deshalb sämtliche innerhalb eines 2Mb großen Fensters als genreich deklarierten Bereiche des gesamten X-Chromosoms in BAC-Pools zusammengefasst und ihre radiale Verteilung im Vergleich zu den genarmen Bereichen im Fibroblastenzellkern untersucht. Allerdings ergaben sich zwischen den genreichen und genarmen Bereichen des jeweiligen X-Chromosoms keine Unterschiede in der Anordnung im Zellkern. Lediglich ergab diese Auswertung, dass sowohl die genreichen, als auch die genarmen Bereiche des inaktiven X-Chromosoms signifikant weiter im Inneren des Zellkerns lokalisieren als die korrespondierenden Bereiche des aktiven X-Chromosoms. Dieser Unterschied kann aber wohl mit der Tatsache erklärt werden, dass das inaktive X-Chromosom in dieser Arbeit signifikant mehr im Inneren des Fibroblastenzellkerns gefunden wird, als das aktive X-Chromosom. Wahrscheinlich spielt es hier auch eine Rolle, dass die als genreich eingestuft Bereiche über das gesamte X-Chromosom verteilt sind und sich eventuelle Gendichte-abhängige Effekte nivellieren, da sie aufgrund der allgemein geringen Gendichte des X-Chromosoms nicht stark genug sind, eine Veränderung in der radialen Verteilung hervorzurufen.

Gendichte-abhängige Verteilung innerhalb eines 10Mb-Fensters

Küpper et al haben, im Gegensatz zu Murmann et al ein 10Mb-Gendichte-Fenster postuliert, welches am Besten mit der Lokalisation im Zellkern korreliert (Murmann, Gao et al. 2005; Küpper, Kölbl et al. 2007). So wurde hier nun im nächsten Schritt dieses Kriterium auf die Zusammenstellung der Gendichte-BAC-Pools angewendet. Gendichte Bereiche innerhalb eines 10Mb-Fensters des aktiven X-Chromosoms zeigen dagegen deutlich eine Tendenz weiter im Inneren des Zellkerns zu lokalisieren als die genarmen Bereiche. Allerdings ist auch dieser Unterschied nicht signifikant. Im genreichen BAC-Pool wurden hier die BACs der beiden RIDGES vereint. Wie man in den vorangegangenen Versuchen gesehen hat, zeigt der Bereich des X-Chromosoms (nur Xa) eine Tendenz zur Mitte des Zellkerns hin, in dem das RIDGE Xp11 liegt, während der Bereich der das RIDGE Xq28 umspannt eher randständig organisiert ist. Hier könnte es demnach sein, dass diese Tendenz der genreichen Bereiche mehr im Inneren des Zellkerns lokalisiert zu sein eine Folge ist aus der mehr internen Position des RIDGE Xp11 und der peripheren Position des RIDGE Xq28. Es kann hier zwar keine absolute Gendichte-abhängige radiale Verteilung genreicher und genarmer Chromatinabschnitte beobachtet werden, aber eine leichte Orientierung der genreichen Bereiche zur Mitte hin kann auch hier gezeigt werden. Im inaktiven X-Chromosom ist wiederum kein Unterschied in der radialen Anordnung genreicher und genarmer Bereiche zu finden.

Um die Lage der beiden RIDGEs im Zellkern genauer definieren zu können, wurden die innerhalb des 10Mb-Fensters sehr genreichen Bereiche mit verschiedenen Flourochromen markiert und somit unterschieden. Als Vergleich wurde der genarme Bereich zwischen den beiden RIDGEs sowie der genarme Bereiche in Xp22 mit in die Untersuchung einbezogen. Hier kann nun deutlich eine signifikante Verlagerung im aktiven X-Chromosom des RIDGE Xp11 zur Zellkernmitte im Gegensatz zum RIDGE Xq28 beobachtet werden. Somit ist erklärt, warum innerhalb eines 10Mb-Fensters nur eine Tendenz, aber kein signifikanter Unterschied in der radialen Verteilung genreicher Bereiche im Vergleich zu genarmen Bereichen gezeigt werden konnte. Der genarme Mittelbereich liegt auch weiter im Inneren des Zellkerns als das RIDGE Xq28, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass das X-Chromosom vom p- zum q-Arm eine Verschiebung zur Peripherie des Zellkerns zeigt. Der genarme Bereich Xp22 ist im Gegensatz zum RIDGE Xp11 und dem genarmen Mittelbereich peripher Richtung Zellkernrand lokalisiert. Im inaktiven X-Chromosom sind sowohl beide RIDGEs als auch die genarmen Bereiche gleich verteilt.

Um eine noch mehr abgestufte Darstellung genreicher und genarmer Bereiche des X-Chromosoms zu bekommen, wurden zwei in Bezug auf die Gendichte extrem gegensätzliche Bereiche miteinander verglichen, das RIDGE Xp11 mit mehr als 15 Genen/Mb und die genarme Region Xq25 mit 3.5 Genen/Mb. Hier wurde eine deutliche höhere Chromatinanordnung gefunden. In beiden Chromosomen liegt das RIDGE Xp signifikant weiter innen im Zellkern als die genarme Region Xq25. Somit kann zumindest für einzelne distinkte extrem unterschiedlich genreiche Bereiche eine Gendichte-abhängige radiale Anordnung im Zellkern humaner Fibroblasten bestätigt werden.

Verteilung einzelner Gene innerhalb einer genreichen und genarmen Region

Für einzelne Gene innerhalb genreicher oder genarmer Regionen auf dem X-Chromosom konnte in Bezug auf den Fibroblastenzellkern keine unterschiedliche radiale Verteilung gezeigt werden.

Die bisher vorgeschlagene Gendichte-abhängige Anordnung subchromosomaler Bereiche in Zellkernen humaner Fibroblasten (Küpper, Kölbl et al. 2007) kann somit zum großen Teil bestätigt werden. Die teilweise nur schwache Tendenz genreicher Bereiche des X-Chromosoms mehr im Inneren des Zellkerns zu lokalisieren als die genarmen Bereiche ist wohl auf die geringen Unterschiede in der Gendichte zwischen genreichen und genarmen Bereichen dieses Chromosoms zurückzuführen.

4.2.2 Einfluß der Genexpression auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Zellkern

Nachdem der Gendichte eine große Rolle bei der Positionierung von Chromatinabschnitten im Zellkern zugesprochen wird (Bridger 2000, Küpper 2007), kommt die Frage auf, welche Rolle die Genexpression spielt. Dieses Thema wird bis

dato kontrovers diskutiert (Reviews: (van Driel, Fransz et al. 2003; Kosak and Groudine 2004; Parada, McQueen et al. 2004; Bartova and Kozubek 2006; Lanctot, Cheutin et al. 2007)). Einige Studien belegen, dass Gene, die transkriptionell aktiv sind weiter im Zellkerninneren liegen, als Gene, die nicht exprimiert werden (Lukášová, Kozubek et al. 2002; Scheuermann, Tajbakhsh et al. 2004). Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass Gene, die nicht aktiv sind, nach ihrer Aktivierung ihre Position verändern und eine internere Position im Zellkern einnehmen als vor ihrer Aktivierung (Kim, McQueen et al. 2004; Zink, Amaral et al. 2004). Allerdings wurde die Umgebung der Gene, wie die Gendichte in diesen Arbeiten nicht in die Untersuchungen mit einbezogen, so dass man nicht auf eine alleinige Rolle der Expression der Gene schließen kann. Wie man anhand der RIDGEs sehen kann, gibt es einen engen Zusammenhang zwischen der Gendichte und der Expression von Genen (Caron, Schaik et al. 2001; Versteeg, van Schaik et al. 2003). So kann man sich also nicht sicher sein, ob exprimierte Gene, die in genreichen Regionen liegen aufgrund ihrer Expression oder aufgrund ihrer Gendichte distinkte Bereiche im Zellkern einnehmen. In einer Studie, in der sowohl die Gendichte, als auch die transkriptionelle Aktivität von Genen berücksichtigt wurde, konnte kein Zusammenhang zwischen der Positionierung von Genen im Zellkern und ihrem Transkriptionsstatus beobachtet (Küpper, Kölbl et al. 2007).

In dieser Arbeit wurden RIDGEs, hochexprimierte Bereiche verteilt über das gesamte X-Chromosom, hochexprimierte Bereiche auf dem p-Arm und einzelne hochexprimierte BACs hinsichtlich ihrer Lage im Zellkern humaner Fibroblasten untersucht. Die RIDGEs, die gleichzeitig die beiden genreichen Bereiche des X-Chromosoms darstellen wurden bereits in Abschnitt 4.2.1 diskutiert. Das RIDGE Xp11 liegt weiter im Inneren des Zellkerns als das RIDGE Xq28 und auch im Gegensatz zu einer extrem genarmen und somit auch wenig exprimierten Region auf Xq25. Hier kann man allerdings nicht sagen, ob dieses Ergebnis den Einfluss der Gendichte oder den Einfluss der Transkription auf die radiale Anordnung im Zellkern darstellt.

In einem weiteren Experiment wurden alle BACs, die mindestens ein in dieser Zelllinie hochexprimiertes Gen enthalten zu einem Pool zusammengefasst und ihre radiale Verteilung im Zellkern mit der der niedrig exprimierten BACs verglichen. Hier kann kein Unterschied zwischen hoch und niedrig exprimierten BAC-Pools hinsichtlich ihrer Lage im Chromosomenterritorium beobachtet werden. Allerdings kommt auch hier wieder die Frage auf, ob sich die Effekte nicht nivellieren, wenn BAC-Pools über ein ganzes Chromosom hinweg zusammengefasst werden. Deswegen wurde eine Teilregion auf dem p-Arm des X-Chromosoms ausgewählt und anhand zweier kleiner BAC-Pools (je n=15), der Versuch wiederholt. Hier sieht man nun deutlich eine Verschiebung der hochexprimierten Bereiche beider Chromosomen zur Zellkernmitte hin. Der Einfluss der Gendichte auf diese Anordnung kann nahezu ausgeschlossen werden, da in beiden Pools BACs verwendet wurden, die nur zum Teil innerhalb des RIDGE Xp11 liegen. Außerdem

liegen sowohl hoch als auch niedrig exprimierte BACs innerhalb des RIDGE Xp11. Alle hier verwendeten BACs enthalten nur Gene, die auf dem inaktiven X-Chromosom inaktiviert sind. Auch bei der Untersuchung einzelner hoch und niedrig exprimierter Gene in genreicher (Xp11) und genarmer (Xq25) Umgebung kann kein Unterschied in der Position innerhalb des Fibroblastenzellkerns beobachtet werden. Deshalb kann hier nicht gefolgert werden, dass die Transkription einen wirklichen alleinigen Einfluss auf die Anordnung von Chromatinbereichen im Zellkern hat.

4.3 Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium

4.3.1 Einfluß der Gendichte auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium

Während die Struktur eines Metaphasechromosoms hinsichtlich der DNA-Sequenz, des Bandenmusters und seiner Form eindeutig beschrieben wurde (Review: (Craig and Bickmore 1993)), ist dies bei Chromosomen in der Interphase bis dato nicht möglich. Chromosomen in der Interphase nehmen meist unregelmäßige, unstrukturierte Formen an, die in der Literatur kontrovers diskutiert werden (Reviews: (Williams and Fisher 2003; Cremer, Cremer et al. 2006)).

Nichts desto trotz gibt es einige Studien, die einen Hinweis darauf geben, dass auch hier die Gendichte wieder eine Rolle in der Organisation eines Chromosomenterritoriums spielt. Zum einen konnte mittels einer doppelten Replikationsmarkierung der humanen Chromosomen #13 und #15 gezeigt werden, dass sich der Teil der Chromosomen, der früh replizierendes Chromatin enthält zur Mitte des Zellkerns hin orientiert, während der Teil, der spät replizierendes Chromatin enthält, eher zum Zellkernrand hin lokalisiert (Zink, Bornfleth et al. 1999). Diese Polarität von Chromosomenterritorien konnte auch für Bereiche mit hohem GC-Gehalt und Bereiche mit niedrigem GC-Gehalt gezeigt werden. Chromosomenbereiche mit einem hohen GC-Gehalt sind mehr zur Zellkernmitte orientiert als Chromosomenbereiche mit einem niedrigen GC-Gehalt (Saccone, Federico et al. 2002). Ein hoher GC-Gehalt, sowie auch früh replizierendes Chromatin gehen mit einer hohen Gendichte einher (Caron, Schaik et al. 2001; Versteeg, van Schaik et al. 2003; Woodfine, Fiegler et al. 2004), was den Schluß mit sich bringt, dass auch innerhalb von Interphasechromosomen eine durch die Gendichte bedingte Anordnung von Chromatin vorhanden ist.

In dieser Arbeit wurden BACs, die innerhalb eines 2Mb-Fensters als genreich klassifiziert werden konnten zu einem, das gesamte X-Chromosom überspannenden Pool zusammengefasst und ihre Verteilung im Vergleich zu genarmen Bereichen innerhalb des Chromosomenterritoriums untersucht. Wie schon zu vor in Bezug auf den Fibroblastenzellkern konnte kein Unterschied in der Anordnung genreicher und genarmer Bereiche festgestellt werden. Beide BAC-Pools sind innerhalb des X-

Chromosoms gleichmässig verteilt. Auch der nächste Versuch, in dem eine extrem genreiche Region in Xp11 (>15 Gene/Mb) mit einer sehr genarmen Region in Xq25 (3.5 Gene/Mb) hinsichtlich ihrer Positionierung im Chromosomenterritorium verglichen wurde bringt kein anderes Ergebnis. Eine Polarisierung innerhalb des Territoriums des humanen X-Chromosoms aufgrund Chromatinbereichen unterschiedlicher Gendichte kann hier nicht bestätigt werden.

4.3.2 Einfluß der Genexpression auf die Anordnung subchromosomaler Bereiche im Chromosomenterritorium

Spezifische Gentranskripte und splicing snRNPs, die dafür bekannt sind, mit Transkriptionsorten zu colokalisieren, wurden präferentiell an der Oberfläche von Chromosomenterritorien gefunden (Zirbel, Mathieu et al. 1993) und formten damit die Basis der Vorstellung des ICD-Modells (Interchromosome Domain Modell, siehe Abschnitt 1.1.2.5.1), in dem Transkription und RNA-Prozessierung an der Oberfläche von Chromosomenterritorien stattfinden, an Kanälen, die, ausgehend von den Kernporen, an die Grenzen der Territorien anschließen (Cremer, Kurz et al. 1993; Zirbel, Mathieu et al. 1993). Diese Kanäle sollen die macromolekulare Maschinerie enthalten, die für alle essentiellen Vorgänge wie Transkription, RNA splicing und RNA-Transport notwendig ist. Außerdem beschreibt dieses Modell eine Zelltyp-spezifische Positionierung von Genen innerhalb eines Territoriums, wobei sich aktive Gene an der Oberfläche des Territoriums aufhalten, um Zugang zur Transkriptionsmaschinerie zu erhalten. Inaktive Gene dagegen, lokalisieren im Inneren des Territoriums, ohne Zugang zu dieser Maschinerie und werden somit reprimiert (Cremer, Kurz et al. 1993). Einhergehend mit diesem Modell fand man in einer Studie heraus, dass verschiedene codierende Gene, unabhängig von ihrem Expressionprofil, meist an der Oberfläche von Chromosomenterritorien gefunden werden, wohingegen nicht-codierende Sequenzen im Inneren des Territoriums lokalisieren (Kurz, Lampel et al. 1996). Untersuchungen zur Lage von Genen am humanen X-Chromosom ergaben eine Korrelation zwischen der Lage der Gene und ihrer transkriptionellen Aktivität (Dietzel, Schiebel et al. 1999). Die zwei homologen *ANT3*-Gene, die nicht der X-Inaktivierung unterliegen, fand man an der Oberfläche der beiden X-Chromosomenterritorien, wohingegen das *ANT2*-Gen, welches auf dem inaktiven X-Chromosom inaktiviert ist, nur auf dem aktiven X-Chromosom an der Oberfläche positioniert war und im inaktiven X-Chromosom im Inneren des Territoriums lag (Dietzel, Schiebel et al. 1999). Volpi et al untersuchten mehrere große genomische Regionen auf Chromosom #6, die unter anderem den Major Histocompatibility Complex (MHC-Komplex) beinhalteten und fanden heraus, dass alle untersuchten Regionen, unabhängig ihres Expressionsstatus, an der Oberfläche des Chromosomenterritoriums lagen. Der MHC-Komplex wurde in Zellen, in denen er transkriptionell aktiv ist, sogar mehrere μm außerhalb des Territoriums auf einem sogenannten „Chromatinloop“ beobachtet, wohingegen genarme Regionen und Centromere nie auf solch einem „Loop“ gesehen wurden (Volpi, Chevret et al. 2000).

Auch das hochexprimierte *ERBB2*-Gen auf Chromosom #17 wurde in Krebszelllinien aus dem Territorium herausragend gefunden (Park and De Boni 1998). Clemson und ihre Mitarbeiter untersuchten Gene auf dem inaktiven X-Chromosom und fanden heraus, dass alle Gene, unabhängig ob sie der X-Inaktivierung unterliegen, an der Oberfläche des Barr-Bodies lokalisieren, während das Innere des Barr-Bodies sogenannte „junk-DNA“, wie Cot1-DNA enthält (Clemson, Hall et al. 2006). All diese Studien gehen konform mit dem angenommenen ICD-Modell.

1999 fanden Verschure et al, indem sie BrUTP in neutranskribierte RNA inkorporierten heraus, dass Transkription an der Oberfläche Chromatin-reicher Subdomänen über das gesamte Chromosomenterritorium verteilt, stattfindet (Verschure, van der Kraan et al. 1999). Zusätzlich wurde in einer Studie anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt, dass sich das Interchromatin-Kompartiment nicht nur zwischen den Chromosomenterritorien erstreckt, sondern auch Kanäle durch die CTs hindurch laufen (Visser, Jaunin et al. 2000).

Wie können nun die Beobachtungen, dass aktive Gene präferentiell an der Oberfläche eines Chromosomenterritoriums gefunden werden (Kurz, Lampel et al. 1996; Dietzel, Schiebel et al. 1999; Volpi, Chevret et al. 2000) mit der Beobachtung, dass Transkription über das gesamte Chromosomenterritorium hinweg stattfindet (Verschure, van der Kraan et al. 1999; Mahy, Perry et al. 2002b) überein gebracht werden?

Mit der Einführung des „chromosome territory – interchromatin compartment“-Modell (CT-IC-Modell), welches eine Weiterentwicklung des ICD-Modells (siehe Abschnitt 1.2.5.1) ist, werden beide Aspekte miteinander vereint (Cremer and Cremer 2001a; Cremer, Küpper et al. 2004). Nun durchziehen die Kanäle des Interchromatin-Kompartiments auch die Chromosomenterritorien, die eine Schwamm-ähnliche Struktur besitzen und somit zugänglich für die Proteine des Interchromatin-Kompartiment sind (siehe Abschnitt 1.1.2.5.2). Nun ist die Positionierung aktiver Gene nicht mehr auf die Oberfläche von Chromosomenterritorien beschränkt (Review: (Cremer and Cremer 2001a; Cremer, Küpper et al. 2004)).

In dieser Arbeit wurden BAC-Pools hoch und niedrig exprimierter Bereiche erstellt, die das gesamte X-Chromosom umspannen und deren radiale Verteilung innerhalb des Chromosomenterritoriums untersucht. Hierbei wurde keine Polarisierung innerhalb des aktiven und des inaktiven X-Chromosoms gefunden, was mit dem CT-IC-Modell konform geht, nach dem Transkription über das gesamte Chromosomenterritorium hinweg stattfinden kann. Betrachtet man nur einen Teil der hoch und niedrig exprimierten Bereiche auf dem p-Arm des X-Chromosoms, so findet man, dass hochexprimierte Bereiche des p-Arms mehr innerhalb des aktiven X-Chromosoms lokalisieren, als niedrig exprimierte Bereiche, die zufällig über das gesamte Chromosom verteilt sind. Dies könnte allerdings auch eine Folge der Markierung des X-Chromosoms mit einer paint-Sonde sein, die eventuell nicht das gesamte X-Chromosom gleichmäßig abdeckt. Im inaktiven X-Chromosom sind sowohl die hoch als auch die niedrig exprimierten Bereiche gleich verteilt, wobei die hoch exprimierten

Bereiche am inaktiven X-Chromosom inaktiviert sind. Somit ist von vornherein kein Unterschied zu erwarten. Die von Clemson et al beobachtete Verteilung der Gene am Rand des Barr-Bodies (Clemson, Hall et al. 2006) (siehe Abbildung 10) kann hier nicht bestätigt werden. Vermutlich liegt es nicht daran, dass sie sehr viele Gene untersucht haben, die nicht der X-Inaktivierung unterliegen, da in der hier vorliegenden Arbeit Gene untersucht wurden, die das gesamte X-Chromosom umspannen. Warum es diese enormen Diskrepanzen in den Ergebnissen gibt, liegt vielleicht an der Auswertungsmethode. Während Clemson und ihre Mitarbeiter eine Auswertung an 2D-Bildern vorgenommen haben, wurde hier die radiale Verteilung in 3D ausgewertet. Auch die Verwendung unterschiedlicher Mikroskope könnte eine Erklärung bieten. Während Clemson et al ein normales inverses Fluoreszenzmikroskop verwendet haben, wurde hier ein konfokales Laserscanningmikroskop benutzt.

Betrachtet man also die Ebene einzelner Gene, so ist, unabhängig von deren Gendichteumgebung kein Unterschied in der Lokalisation im Chromosomenterritorium zu erkennen. Sowohl hoch-, als auch niedrig exprimierte Gene positionieren sich in genreichen, wie auch genarmen Regionen des X-Chromosoms gleich. Diese Beobachtungen gehen ebenfalls konform mit der Annahme, dass Transkription über das gesamte Chromosomenterritorium hinweg stattfinden kann.

4.4 Funktionelle Bedeutung einer höheren Ordnung im Zellkern

Nachdem in vielen Arbeiten der lokalen Gendichte der größte Einfluss auf die radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern zugesprochen wird (Murmans, Gao et al. 2005; Küpper, Kölbl et al. 2007), wurde dies in dieser Arbeit für das X-Chromosom in Zellkernen humaner Fibroblasten untersucht und bestätigt. Die Gendichte-abhängige radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert und wird in vielen verschiedenen Zelltypen gesehen (Tanabe, Muller et al. 2002b; Cremer, Küpper et al. 2003; Küpper, Kölbl et al. 2007). Dies lässt die Frage nach der biologischen Bedeutung aufkommen. Hierzu gibt es mehrere Ansichten.

Eine Hypothese, die sogenannte „Bodyguard-Hypothese“ (Hsu 1975; Gazave, Gautier et al. 2005), besagt, dass genreiches Material im Zellkerninneren vor Schädigungen von außen geschützt ist, da diese von dicht gepacktem genarmen Material, das an der Peripherie des Zellkerns lokalisiert, abgehalten werden. Schädigungen im Sinne der „Bodyguard-Hypothese“ wären freie Radikale, die bei der Atmung in den Mitochondrien, die um den Nukleus angeordnet sind, entstehen, oder andere DNA schädigende Reagenzien wie Chemikalien oder Strahlung. Allerdings konnte in einer Studie nach UV-Bestrahlung von Zellkernen kein signifikanter Unterschied in der Empfänglichkeit von DNA-Schäden zwischen

genreichem und genarmen Chromatin nachgewiesen werden (Gazave, Gautier et al. 2005).

Alternative Hypothesen sehen das dicht gepackte genarme Material in der Zellkernperipherie als Puffer für Schwankungen in der Spannkraft (Vinogradov 1998; Vinogradov 2005) oder als Puffer für externe mechanische Einwirkungen (Maniotis, Chen et al. 1997; Caille, Thoumine et al. 2002; Gladilin, Micoulet et al. 2007). Allerdings müssen beide Hypothesen erst experimentell bestätigt werden.

Auch könnte durch die Anhäufung vieler transkriptionell aktiver Gene im Inneren des Zellkerns eine gemeinsame Regulierung durch Teilen von Transkriptionsmaschinerien, Splicingfaktoren etc eine Rolle spielen. So wurden zum Beispiel bestimmte Transkriptionsfaktoren beschrieben, die im Inneren des Zellkerns ihre Gene in unmittelbarer Nachbarschaft finden und dadurch die Expression einfacher reguliert werden kann (Shopland, Johnson et al. 2003; Osborne, Chakalova et al. 2004; Spilianakis, Lalioti et al. 2005). So kann eventuell eine effizientere Expression dieser Gene entstehen.

Desweiteren stellt sich natürlich die Frage nach dem Mechanismus, der diese spezielle Anordnung von Chromatin im Zellkern bewerkstelligt. Eine Erklärung wäre das sogenannte biophysikalische Konzept des „Macromolecular crowding“ (Zimmerman and Minton 1993), welches kürzlich an die Zellkernarchitektur angepasst wurde (Cook 2002; Hancock 2004a; Hancock 2004b; Hancock 2007). Dieses Konzept besagt eine Veränderung der molekularen Interaktionen als Antwort auf eine Veränderung der Crowding-Konditionen. Crowding ist definiert als das Vorkommen von Makromolekülen, die ein bestimmtes Volumen einnehmen und deshalb das tatsächliche Volumen für andere Moleküle verkleinern. Eine konzentrationsabhängige Antwort molekularer Interaktionen auf Veränderungen in diesem makromolekularen Crowding soll die Bildung bzw. Auflösung von nuklearen Kompartimenten, die aus den interagierenden Molekülen aufgebaut sind, hervorrufen. Die ursprünglich weit verteilten Moleküle formen kompakte Kompartimente in einem von Molekülen überfüllten System (Cook 2002; Hancock 2004b), da eine dichtere Kompaktierung zu weniger ausgeschlossenen Volumen führt, in dem die Moleküle wandern können. Dadurch wird ein höheres Level an Entropie des gesamten Systems gewährleistet. Dieses Modell wurde erstmals von Ronald Hancock auf die Bildung nuklearer Kompartimente übertragen, indem er Effekte des makromolekularen Crowdings an nuklearen Kompartimenten wie PML-Bodies und Nucleoli testete (Hancock 2004b). Isolierte Zellkerne wurden mit einem hypotonen Medium behandelt, was dazu führte, dass die Zellkerne Wasser aufnahmen und sich das Kernvolumen enorm vergrößerte und sich die PML-Bodies und Nucleoli auflösten. Nach der Zugabe von normalem Medium schrumpften die Zellkerne wieder auf ihre normale Größe, die ursprüngliche Konzentration an Makromolekülen wurde wieder hergestellt und die PML-Bodies und Nucleoli bildeten sich neu (Hancock 2004b). In der gleichen Art und Weise kann auch das Chromatin an sich durch makromolekulares Crowding beeinflusst und gebildet werden (Hancock

2007). Aufgrund der hohen Konzentration an Makromolekülen innerhalb eines Zellkerns könnte dichter gepacktes Heterochromatin entstehen und sich mit speziellen Interaktionspartnern (z.B. der Lamina) am Zellkernrand anordnen. Für das weniger dicht gepackte Euchromatin bleibt dann nur das Innere des Zellkerns als Aufenthaltsort übrig.

Auch die bereits bekannte Assoziation von Heterochromatin mit der Lamina des Zellkerns könnte eine Rolle bei der Anordnung von Chromatin im Zellkern spielen, da diese, wenn dieser Mechanismus gestört ist, zu gravierenden Krankheiten, sogenannten Laminopathien führt. Dazu gehören zum Beispiel die Progerie (Hutchinson Gilford) und die Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (Maraldi, Squarzoni et al. 2005).

Die Dichte-abhängige radiale Verteilung, wie sie hier beschrieben wurde, darf man allerdings nicht als ein allgemein gültiges Prinzip ansehen, auch wenn sie bei Säugern hochkonserviert ist und in vielen verschiedenen Zelltypen gefunden wurde. So konnte zum Beispiel in Zellkernen von Photorezeptoren nachtaktiver Säuger gezeigt werden, dass genreiches Chromatin an der Zellkernperipherie lokalisiert, während genarmes Chromatin im Inneren des Zellkerns zu finden ist (Solovei, Lanctot et al. 2008).

4.5 Strukturanalysen

Eukaryotische Genome kondensieren DNA, die ungefähr einen Meter in der Länge misst um ungefähr das 20.000 fache, damit sie in das begrenzte Volumen des Zellkerns passt, während sie aber immer noch den Zugang für DNA-bindende Faktoren, die Prozesse wie Replikation, Transkription, DNA-Reparatur und Rekombination, zulassen müssen. Eukaryotische DNA ist mit Nucleosomen verbunden, wobei 164 Basenpaare in 1.75 Windungen um ein Oktamer, bestehend aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gewickelt sind. Anhand der linker-DNA sind jeweils zwei Nucleosomen miteinander verbunden. Eine kurze linker-DNA geht mit einer Kompaktierung des Chromatins einher, während man eine lange linker-DNA im Gegenzug bei dekontensiertem Chromatin findet (Horn and Peterson 2002). Die resultierende „beads on a string“-Konfiguration oder 10nm-Fiber stellt somit die erste Ebene der Chromatinstruktur dar (Woodcock and Dimitrov 2001). Die zweite Ebene entsteht aus Nucleosomen-Interaktionen, wobei die wichtigste hier wohl die 30nm-Fiber darstellt, die eine Kompaktierung der DNA um das 40-50fache mit sich bringt (Woodcock and Dimitrov 2001). Wahrscheinlich besteht diese aus einer Nucleosomen-Helix, deren genaue Struktur aber noch unklar ist (Dorigo, Schalch et al. 2004), jedoch entstehen höhere Level der Chromatinstruktur aus weitreichenden Interaktionen der 30nm-Fiber. Ein klassisches Modell solch einer höheren Struktur ist das sogenannte Chromonema-Modell, in dem dünnere Fibern gefaltet sind, um dickere Strukturen mit einem Durchmesser von 100-130 nm und eine DNA-

Kompaktierung um den Faktor 500 zu erhalten (Belmont and Bruce 1994). Andere Modelle schlagen vor, dass radiale verschieden große 30nm-Fiber-Loops an einem Proteingerüst befestigt sind (Cremer and Cremer 2001a) oder verzichten gar auf 30nm-Fibern, wie in dem sogenannten „nucleosome affinity, random chain“-Modell, in dem zufällige Nucleosomketten einen vorgegebenen Raum einnehmen (Müller, Rieder et al. 2004). Bis dato konnte jedoch keines dieser Modelle bewiesen werden. Chromatin im Interphasezellkern ist dynamisch. Sind Gene aktiviert, ist das Chromatin dekondensiert, sind Gene inaktiviert, ist das Chromatin kondensiert (Wegel and Shaw 2005). Ist aktives Chromatin also anders gefaltet als inaktives Chromatin? Wenn ja, auf welchem Level lässt sich das zeigen?

Inaktives Chromatin, oder auch Heterochromatin genannt, ist durch eine Reihe von Histon-Modifikationen gekennzeichnet und besitzt eine kompaktere Struktur als aktives Euchromatin (Heitz 1928; Craig 2005). Besonders deutlich sichtbar ist das am Beispiel des X-Chromosoms. Während das aktive X-Chromosom eine unregelmäßige offenere Struktur zeigt, ist das inaktive X-Chromosom eher rundlich und kompakter und somit als Barr-Body schon in der DAPI-Färbung sichtbar (Eils, Dietzel et al. 1996) (siehe Abschnitt 3.2). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Komplexe aktiver Gene, wie zum Beispiel der MHC-Komplex auf Chromosom #6 häufig auf sogenannten „Chromatin-Loops“ zu finden sind, die weit aus dem Chromosomenterritorium herausragen und somit für eine offene, dekondensierte Chromatinstruktur sprechen (Park and De Boni 1998; Volpi, Chevret et al. 2000). Auch für RIDGEs, die sehr viele Gene enthalten, die hoch exprimiert werden, konnte diese dekondensierte Chromatinstruktur gezeigt werden, während Anti-RIDGEs, die nur wenige exprimierte Gene enthalten eher kondensiert sind (Goetze, Mateos-Langerak et al. 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit wurden Unterschiede in der Kondensation des Chromatins zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom untersucht. Dieses Chromosom eignet sich besonders gut zur Untersuchung aktiver und inaktiver Chromatinstrukturen, da das inaktive X-Chromosom aus fakultativem Heterochromatin besteht und zum großen Teil nur inaktive Gene besitzt. Somit ist ein sehr guter Vergleich möglich.

Zum einen wurden die Intensitätsschwerpunkte von vier BAC-Pools, die je eine Hälfte der Arme des X-Chromosoms umspannen mit dem Programm Distangles (siehe Abschnitt 2.11.2) bestimmt. Aus diesen berechnet das Programm anschließend sowohl Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten, als auch Winkel. So sollte eine Grobuntersuchung der Kompaktierung untersucht werden. Geht man von einer linearen Struktur des X-Chromosoms aus, so ergibt die Berechnung der Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten, dass das aktive X-Chromosom um 47% länger ist, als das inaktive X-Chromosom. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Somit kann, auch auf einem sehr groben Level, bestätigt werden, dass aktive Sequenzen im humanen Genom weniger kondensiert sind, als inaktive Sequenzen.

Betrachtet man die Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der unterteilten Arme des X-Chromosoms, so kann ebenfalls ein Unterschied zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom festgestellt werden. Das inaktive X-Chromosom ist zwischen dem zweiten Teil des p-Arms und dem ersten Teil des q-Arms deutlich mehr zusammengefaltet als die korrespondierenden Bereiche des aktiven X-Chromosoms. Dies geht auch konform mit dem Ergebnis der Manders-Colokalisation der beiden Arme des X-Chromosoms. Hier wurde herausgefunden, dass die beiden Arme des inaktiven X-Chromosoms deutlich mehr Überschneidungen aufweisen als die Arme des aktiven X-Chromosoms. Dies weist auf eine offenere, linearere Struktur des aktiven X-Chromosoms hin.

Untersuchungen haben ergeben dass das inaktive X-Chromosom eine Art „Loop“ bildet, indem sich die beiden Telomere aneinanderlagern, während dies im aktiven X-Chromosom nicht der Fall ist (Walker, Cargile et al. 1991). Diese Telomerassoziation konnte von Dietzel et al allerdings nicht bestätigt werden (Dietzel, Eils et al. 1998). In unserer Arbeit wurden die Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten der geteilten Arme des X-Chromosoms auch auf diese Fragestellung hin untersucht, in dem die Distanzen zwischen p1 und q2 miteinander verglichen wurden. Es kam heraus, dass die Distanzen zwischen p1 und q2 des aktiven X-Chromosoms statistisch signifikant größer sind als die korrespondierenden Distanzen des inaktiven X-Chromosoms. Dies weist darauf hin, dass die beiden Telomere des inaktiven X-Chromosoms näher zusammenliegen als die beiden Telomere des aktiven X-Chromosoms. Jedoch kann dies auch an der größeren Kondensation des Chromatins des inaktiven X-Chromosoms liegen und muss nicht zwangsläufig eine Telomerassoziation bedeuten.

Betrachtet man nun die Intensitätsschwerpunkte auf einem kleineren Level als den unterteilten Armen, also in 10 Megabasen-Schritten über das gesamte X-Chromosom, so kann man auch hier wieder eine deutliche Verkürzung des inaktiven X-Chromosoms im Vergleich zum aktiven X-Chromosom beobachten. Allerdings handelt es sich hier nur um einen Unterschied von 14.06% in der Länge, was aber wohl mit der Aufaddition aller ermittelten Distanzen einhergeht. Geht man nun tiefer ins Detail, fällt auf, dass sich die beiden X-Chromosomen signifikant in der Region des RIDGE Xp unterscheiden, wobei das RIDGE Xp auf dem aktiven X-Chromosom dekondensierter ist als auf dem inaktiven X-Chromosom. Dies bestätigt die Arbeit von Goetze et al., die ebenfalls beobachteten, dass RIDGEs dekondensierter sind als Anti-RIDGEs (Goetze, Mateos-Langerak et al. 2007). Ein weiterer signifikanter Unterschied ist in der Centromerregion zu erkennen. Auch hier ist das Chromatin des aktiven X-Chromosoms dekondensierter als das Chromatin des inaktiven X-Chromosoms. Dies könnte eventuell an der Nähe zum aktiven RIDGE Xp auf dem aktiven X-Chromosom liegen, oder umgekehrt an der allgemeinen Heterochromatisierung des inaktiven X-Chromosoms.

Auch bei der Untersuchung der Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der 10Mb-BAC-Pools gibt es signifikante Unterschiede zwischen dem aktiven und dem

inaktiven X-Chromosom. Wieder sind die Winkel des aktiven X-Chromosoms im Durchschnitt größer als die des inaktiven X-Chromosoms, was folglich für eine höhere Faltung des inaktiven X-Chromosoms spricht.

Bei der Betrachtung der einzelnen 10Mb-BAC-Pool-Strukturen per Auge sind unterschiedliche Strukturen von 10Mb langen DNA-Stücken aufgefallen (siehe Abschnitt 3.8.2.3). Die Verteilung der einzelnen Strukturen ist jedoch in beiden X-Chromosomen annähernd gleich, so dass auf dieser Ebene kein Unterschied zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom gefunden werden kann.

Zusammengefasst kann man hier sagen, dass die bisherigen Ergebnisse, dass inaktives Chromatin kondensierter ist als aktives Chromatin, sowohl auf der Ebene großer Chromatinstücke (hier: unterteilte Arme des X-Chromosoms), als auch auf der Ebene kleinerer Chromatinabschnitte (hier: 10Mb-Stücke über das gesamte X-Chromosom) bestätigt werden kann.

4.6 Ausblick

Die Fluoreszenzmikroskopie ist heute aus der biologischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Mit der konfokalen Mikroskopie ist es möglich, biologische Strukturen dreidimensional darzustellen. Hierbei muss man sich allerdings der Auflösungsgrenzen der heute zur Verfügung stehenden Mikroskopsysteme bewusst sein. Bei der konventionellen konfokalen Mikroskopie, die in der vorgelegten Arbeit benutzt wurde liegt sie bei 500-800nm in axialer Richtung und bei ~200nm in lateraler Richtung. Dadurch ist es nicht möglich, detaillierte Aussagen über Strukturen unterhalb dieses Bereichs zu machen. Es werden also neue lichtoptische Methoden benötigt, die es erlauben, solche Strukturen in der Zelle weit unterhalb der konventionellen Auflösungsgrenze von einigen hundert Nanometer zu analysieren. Dazu wurden in den letzten Jahren mehrere verschiedene Ansätze entwickelt. Zum einen gibt es die spektrale Präzisions Distanzmikroskopie, mit der man biologische Strukturen bis in den Bereich weniger Nanometer vermessen kann, indem man im konfokalen Mikroskop Objekte trotz beugungsbedingtem Überlappen der Bilder anhand eines Mehrkanal-Detektionssystems trennt. Anschließend werden die Intensitätsschwerpunkte jedes aufgenommenen Objektes berechnet und durch eine Korrektur der chromatischen Abberation mit Hilfe von in situ-Kalibrationen deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze vermessen (Esa, Edelman et al. 2000; Rauch, Knoch et al. 2008).

Eine geringere Auflösungsgrenze als 10nm verspricht die sogenannte „Spatially Modulated Illumination“ Mikroskopie. Hier soll die Point Spread Function eines Mikroskops in solch einer Art und Weise modifiziert werden, dass die optische Auflösung erhöht wird und somit die Distanzmessungen an punktförmigen Strukturen verbessert wird. Dies wird zum Beispiel durch die Verwendung zweier gegenläufiger,

interferierender Laserstrahlen in axialer Richtung erreicht (Albrecht, Failla et al. 2002; Martin, Failla et al. 2004; Baddeley, Batram et al. 2007).

Allerdings befinden sich diese Mikroskopsysteme in der Entwicklungsphase.

Eine weitere Neuentwicklung in diesem Bereich ist die 4π -Mikroskopie. Hier werden zwei gegenüberliegende Objektive, die auf den gleichen Punkt fokussieren, kohärent genutzt. Somit kann eine 4-7fach höhere Auflösung in der axialen Richtung erreicht werden (Denk, Strickler et al. 1990; Gugel, Bewersdorf et al. 2004). Ein Nachteil dieses Systems liegt bei der hohen Anforderung an die verwendbaren Fluorochrome. Diese müssen eine große Stabilität gegenüber den Laserstrahlen aufweisen. Dies ist im Moment hauptsächlich mit sogenannten QuantumDots möglich.

Bei der sogenannten STED Mikroskopie (Stimulated emission depletion) wird hingegen eine Verbesserung der Auflösung in lateraler Richtung erreicht (<50nm), jedoch nicht in axialer Richtung. Dies geschieht durch die Anregung einer kleinen Fläche (~200nm Durchmesser) mittels eines fokussierten Lichtstrahls, dem wenige Picosekunden später ein zweiter Lichtstrahl geringerer Energie hinterhergeschickt wird bevor die angeregten Farbstoffmoleküle von sich aus fluoreszieren können. Indem der zweite Lichtstrahl ringförmig um die vorher angeregte Stelle gelegt wird, kann ein Großteil der angeregten Fläche wieder abgeregt werden bevor es zur spontanen Emission von Fluoreszenz kommt. Somit lässt sich die emittierende Fläche - also das Zentrum des Rings - effektiv verkleinern. Da sich hierbei aber nur die Auflösung in lateraler Ebene verbessert, eignet sich dieses System nur für die Darstellung von „flachen“ Objekten (Klar, Jakobs et al. 2000).

Wenn man davon ausgeht, dass sich die Unterschiede zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom wesentlich in der z-Ebene abspielen, könnte die begrenzte Auflösung durchaus ein Grund sein, dass solche Unterschiede nicht erfasst werden. Mit den Fortschritten in der Mikroskopie wird man in den nächsten Jahren hoffentlich mehr wissen.

5 Zusammenfassung

5.1 Radiale Anordnung des Chromatins des X-Chromosoms in Zellkernen humaner Fibroblasten

In den letzten Jahren sind viele Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit dem Thema beschäftigen, welche Kriterien ausschlaggebend sind für die höhere radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern. Dabei wird der Gendichte eine große Rolle zugeschrieben, aber auch Faktoren wie Größe der Chromosomen, Expression der Gene oder die Replikationszeit sind Kandidaten für solch ein Kriterium.

In dieser Arbeit wurde die radiale Anordnung von Chromatin des humanen X-Chromosoms in Zellkernen humaner weiblicher Fibroblasten in einer „top down“-Analyse auf verschiedene Kriterien hin untersucht. Angefangen wurde bei der radialen Verteilung des gesamten X-Chromosoms im Zellkern bis hin zur radialen Verteilung einzelner Gene im Chromosomenterritorium und auch im Zellkern.

Dafür wurden von 333 einzelnen BACs, die über das gesamte humane X-Chromosom gleichmäßig verteilt sind, anhand intensiver Datenbankrecherche, die genaue Lokalisation, die enthaltenen Gene, die Expression dieser Gene und die Gendichtenumgebung in einem 2Mb- und einem 10Mb-Fenster definiert. Anschließend wurden verschiedene Pools erstellt, die den jeweiligen zu untersuchenden Kriterien entsprachen und anhand einer 3D-FISH auf Zellkerne humaner weiblicher Fibroblasten hybridisiert. Nach der Aufnahme von 3D-Bilderstapeln an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop wurden alle aufgenommenen Zellkerne mittels des Programms eADS ausgewertet.

Dabei konnte für das gesamte X-Chromosom gezeigt werden, dass sich das inaktive X-Chromosom weiter im Inneren des Zellkerns aufhält, als das aktive X-Chromosom. Desweiteren konnte eine Gendichte-abhängige radiale Verteilung für einige Abschnitte des aktiven X-Chromosoms beobachtet werden. So liegt das RIDGE auf Xp deutlich weiter zur Zellkernmitte hin orientiert, als der Rest des aktiven X-Chromosoms. Im inaktiven X-Chromosom hingegen ist eine Gendichte-abhängige Anordnung nur im Vergleich mit einer extrem genarmen Region zu beobachten.

In Bezug auf das Chromosomenterritorium konnte eine Polarisierung gesehen werden, wobei genreiche Abschnitte im aktiven X-Chromosom im Inneren des Chromosomenterritoriums liegen, während genarme Abschnitte eher randständig lokalisiert sind. Im inaktiven X-Chromosom ist diese Anordnung nicht zu finden. Hier sind sowohl genreiche als auch genarme Bereiche gleichmäßig verteilt. Diese Anordnung findet man allerdings nur, wenn man eine extrem genreiche Region mit einer extrem genarmen Region vergleicht. Betrachtet man sämtliche, innerhalb eines 2Mb- und 10Mb-Fensters genreiche und genarme Bereiche über das ganze X-Chromosom hinweg, so ist keine Polarisierung in Bezug auf das Chromosomenterritorium zu erkennen.

Auch eine Anordnung des Chromatins abhängig von der Expression der Gene wurde in dieser Arbeit untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass sich das Chromatin des X-Chromosoms unabhängig von der Expression der enthaltenen Gene zufällig im Zellkern humaner Fibroblasten verteilt. Auch in Bezug auf das Chromosomenterritorium gibt es keine höhere radiale Anordnung hoch und niedrig exprimierter Gene.

So konnte in dieser Arbeit die Gendichte-abhängige radiale Anordnung von Chromatin auch für das humane X-Chromosom gezeigt werden.

5.2 Strukturanalysen des humanen X-Chromosoms

Das aktive und das inaktive X-Chromosom unterscheiden sich in ihrer Struktur. Während das aktive X-Chromosom eine eher unregelmäßige Form zeigt, ist das inaktive X-Chromosom als gleichmäßige runder geformte Struktur im Zellkern zu erkennen. In dieser Arbeit wurden Unterschiede in der Kondensation und Faltung zwischen den beiden Chromosomen anhand von Distanzen und Winkeln zwischen Intensitätsschwerpunkten von BAC-Pools untersucht, um die Größenbereiche (Mb) in denen sie liegen beziehungsweise den Zusammenhang mit den Eigenschaften der jeweiligen DNA-Abschnitte zu charakterisieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Distanzen zwischen den Intensitätsschwerpunkten des aktiven X-Chromosoms signifikant größer sind, als die des inaktiven X-Chromosoms, und somit eine stärkere Chromatinkondensierung des inaktiven X-Chromosoms zu beobachten ist. Dieser Unterschied war am deutlichsten zu sehen, wenn man Chromatinsegmente in der Größenordnung von 30-40Mb untersucht hat. Auch konnte gesehen werden, dass das RIDGE auf Xp, welches eine der reichsten und am meisten exprimierte Region des X-Chromosoms darstellt, am aktiven X-Chromosom eine signifikant offenere Struktur zeigt, als am inaktiven X-Chromosom. Betrachtet man die Winkel zwischen den Intensitätsschwerpunkten der BAC-Pools, so sieht man deutlich kleinere Winkel im inaktiven X-Chromosom zwischen dem p- und dem q-Arm. Das inaktive X-Chromosom ist somit in diesem Bereich gefaltet, während das aktive X-Chromosom eine eher lineare Struktur aufweist. Diese Faltung des inaktiven X-Chromosoms kann auch mit einer Manders-Colokalisationsanalyse untermauert werden. Hier sieht man, dass die beiden Arme des inaktiven Chromosoms deutlich mehr miteinander colokalisieren, als die Arme des aktiven X-Chromosoms.

6 Literaturverzeichnis

- (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Adachi, Y., M. Luke, et al. (1991). "Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation." *Cell* **64**(1): 137-48.
- Adolphs, K. W., S. M. Cheng, et al. (1977). "Isolation of a protein scaffold from mitotic HeLa cell chromosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 4937-41.
- Alberts, B. (2002). *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft.
- Albiez, H., M. Cremer, et al. (2006). "Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks." *Chromosome Research* **14**(7): 707-733.
- Albrecht, B., A. V. Failla, et al. (2002). "Spatially modulated illumination microscopy allows axial distance resolution in the nanometer range." *Appl Opt* **41**(1): 80-7.
- Alexandrova, O., I. Solovej, 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.
- Athey, B. D., M. F. Smith, et al. (1990). "The diameters of frozen-hydrated chromatin fibers increase with DNA linker length: evidence in support of variable diameter models for chromatin." *J Cell Biol* **111**(3): 795-806.
- Avner, P. and E. Heard (2001). "X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation." *Nat Rev Genet* **2**(1): 59-67.
- Bacher, C. P., M. Guggiari, et al. (2006). "Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation." *Nat Cell Biol* **8**(3): 293-299.
- Baddeley, D., C. Batram, et al. (2007). "Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy." *Nat Protoc* **2**(10): 2640-6.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2005). "Reversing histone methylation." *Nature* **436**(7054): 1103-1106.
- Bannister, A. J., R. Schneider, et al. (2002). "Histone Methylation: Dynamic or Static?" *Cell* **109**(7): 801-806.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." *Nature* **410**(6824): 120-124.
- Bantignies, F. and G. Cavalli (2006). "Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins." *Current Opinion in Cell Biology* **18**(3): 275-283.
- Barr, M. L. and E. G. Bertram (1949). "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis." *Nature* **163**(4148): 676.
- Bartolome, S., A. Bermudez, et al. (1994). "Internal structure of the 30 nm chromatin fiber." *J Cell Sci* **107** (Pt 11): 2983-92.
- Bartova, E. and S. Kozubek (2006). "Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies." *Biol. Cell* **98**(6): 323-336.
- Belmont, A. S. and K. Bruce (1994). "Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure." *J. Cell Biol.* **127**(2): 287-302.
- Bickmore, W. A. and P. Teague (2002). "Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population." *Chromosome Research* **10**(8): 707-715.

- 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): 73-76.
- Bolzer, A., G. Kreth, et al. (2005). "Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes." PLoS Biology **3**(5): e157.
- Boumil, R. M. and J. T. Lee (2001). "Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation." Hum Mol Genet **10**(20): 2225-32.
- Bourgeois, C. A., F. Laquerriere, et al. (1985). "New data on the in situ position of the inactive X chromosome in the interphase nucleus of human fibroblasts." Human Genetics **69**(2): 122-129.
- 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): 211-9.
- Branco, M. R. and A. Pombo (2006). "Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations." PLoS Biol **4**(5): e138.
- Bridger, J. M., S. Boyle, et al. (2000). "Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts." Curr Biol **10**(3): 149-52.
- Bridger, J. M., H. Herrmann, et al. (1998). "Identification of an interchromosomal compartment by polymerization of nuclear-targeted vimentin." J Cell Sci **111**(9): 1241-1253.
- Brown, C. J., A. Ballabio, et al. (1991). "A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome." Nature **349**(6304): 38-44.
- Brown, S. W. (1966). "Heterochromatin." Science **151**(709): 417-25.
- Caille, N., O. Thoumine, et al. (2002). "Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells." J Biomech **35**(2): 177-87.
- Caron, H., B. v. Schaik, et al. (2001). "The Human Transcriptome Map: Clustering of Highly Expressed Genes in Chromosomal Domains." Science **291**(5507): 1289-1292.
- Carrel, L., A. A. Cottle, et al. (1999). "From the Cover: A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(25): 14440-14444.
- Carrel, L. and H. F. Willard (2005). "X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females." Nature **434**(7031): 400-404.
- Carrozza, M. J., R. T. Utley, et al. (2003). "The diverse functions of histone acetyltransferase complexes." Trends in Genetics **19**(6): 321-329.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard (2004). "Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(50): 17450-17455.
- Chao, W., K. D. Huynh, et al. (2002). "CTCF, a Candidate Trans-Acting Factor for X-Inactivation Choice." Science **295**(5553): 345-347.
- Chaumeil, J., P. Le Baccon, et al. (2006). "A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced." Genes Dev. **20**(16): 2223-2237.
- Cheung, P., C. D. Allis, et al. (2000). "Signaling to Chromatin through Histone Modifications." Cell **103**(2): 263-271.
- Chow, J. C., Z. Yen, et al. (2005). "SILENCING OF THE MAMMALIAN X CHROMOSOME." Annual Review of Genomics and Human Genetics **6**(1): 69-92.

- Clemson, C. M., L. L. Hall, et al. (2006). "The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(20): 7688-7693.
- Comings, D. E. (1968). "The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus." Am J Hum Genet **20**(5): 440-60.
- Cook, P. R. (2002). "Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity." Nat Genet **32**(3): 347-52.
- Craig, J. M. (2005). "Heterochromatin--many flavours, common themes." Bioessays **27**(1): 17-28.
- Craig, J. M. and W. A. Bickmore (1993). "Chromosome bands--flavours to savour." Bioessays **15**(5): 349-54.
- Cremer, C., T. Cremer, et al. (1982a). "Induction of chromosome damage by ultraviolet light and caffeine: correlation of cytogenetic evaluation and flow karyotype." Cytometry **2**(5): 287-90.
- 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): 809-820.
- Cremer, M., J. von Hase, et al. (2001b). "Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells." Chromosome Research **9**(7): 541-567.
- Cremer, T. (1985). Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie, Springer Verlag.
- Cremer, T. and C. Cremer (2001a). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." Nat Rev Genet **2**(4): 292-301.
- Cremer, T. and C. Cremer (2006 I). "Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories." Eur J Histochem **50**(3): 161-76.
- Cremer, T. and C. Cremer (2006 II). "Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present." Eur J Histochem **50**(4): 223-72.
- Cremer, T., C. Cremer, et al. (1982b). "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., M. Cremer, et al. (2006). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 307-16.
- 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., A. Kurz, et al. (1993). "Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **58**: 777-92.
- Croft, J. A., J. M. Bridger, et al. (1999). "Differences in the Localization and Morphology of Chromosomes in the Human Nucleus." J. Cell Biol. **145**(6): 1119-1131.
- Csankovszki, G., B. Panning, et al. (1999). "Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation." Nat Genet **22**(4): 323-324.

- Czermin, B., R. Melfi, et al. (2002). "Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites." Cell **111**(2): 185-196.
- de Napoles, M., J. E. Mermoud, et al. (2004). "Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation." Developmental Cell **7**(5): 663-676.
- Dean, F. B., J. R. Nelson, et al. (2001). "Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification." Genome Res **11**(6): 1095-9.
- Deng, W., S. W. Tsao, et al. (2003). "A new method for improving metaphase chromosome spreading." Cytometry A **51**(1): 46-51.
- Denk, W., J. H. Strickler, et al. (1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." Science **248**(4951): 73-76.
- Dietzel, S., R. Eils, et al. (1998). "Evidence against a Looped Structure of the Inactive Human X-Chromosome Territory." Experimental Cell Research **240**(2): 187-196.
- 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 Res **6**(1): 25-33.
- Dietzel, S., K. Schiebel, et al. (1999). "The 3D Positioning of ANT2 and ANT3 Genes within Female X Chromosome Territories Correlates with Gene Activity." Experimental Cell Research **252**(2): 363-375.
- Disteche, C. M. (1999). "Escapees on the X chromosome." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(25): 14180-14182.
- Disteche, C. M., G. N. Filippova, et al. (2002). "Escape from X inactivation." Cytogenetic & Genome Research **99**(1-4): 36-43.
- Dorigo, B., T. Schalch, et al. (2004). "Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber." Science **306**(5701): 1571-3.
- DuPraw, E. J. and G. F. Bahr (1969). "The arrangement of DNA in human chromosomes, as investigated by quantitative electron microscopy." Acta Cytol **13**(4): 188-205.
- Duret, L., C. Chureau, et al. (2006). "The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene." Science **312**(5780): 1653-5.
- Earnshaw, W. C. and M. M. Heck (1985). "Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes." J Cell Biol **100**(5): 1716-25.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells." Nucl. Acids Res. **10**(8): 2709-2721.
- 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): 1427-1440.
- Esa, A., P. Edelmann, et al. (2000). "Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome." J Microsc **199**(Pt 2): 96-105.
- Fackelmayer, F. O. (2005). "A Stable Proteinaceous Structure in the Territory of Inactive X Chromosomes." J. Biol. Chem. **280**(3): 1720-1723.
- Fakan, S. (2004a). "The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry." Histochemistry and Cell Biology **122**(2): 83-93.

- Fakan, S. (2004b). "Ultrastructural cytochemical analyses of nuclear functional architecture." Eur J Histochem **48**(1): 5-14.
- Falkowski, P. G., M. E. Katz, et al. (2005). "The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals." Science **309**(5744): 2202-4.
- Fang, J., T. Chen, et al. (2004). "Ring1b-mediated H2A Ubiquitination Associates with Inactive X Chromosomes and Is Involved in Initiation of X Inactivation." J. Biol. Chem. **279**(51): 52812-52815.
- Felsenfeld, G. and M. Groudine (2003). "Controlling the double helix." Nature **421**(6921): 448-53.
- 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.
- Filippova, G. N., M. K. Cheng, et al. (2005). "Boundaries between Chromosomal Domains of X Inactivation and Escape Bind CTCF and Lack CpG Methylation during Early Development." Developmental Cell **8**(1): 31-42.
- Finch, J. T., L. C. Lutter, et al. (1977). "Structure of nucleosome core particles of chromatin." Nature **269**(5623): 29-36.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." Genes Dev. **17**(15): 1870-1881.
- Flemming, W. (1882). Beiträge zur Kenntnis der Zelle und ihrer Lebenserscheinungen. Archiv für Mikroskopische Anatomie. I. v. S. G. u. W. Waldeyer. Bonn, Verlag von Max Hen & Sohn: 1-87.
- Flindt, R. (1985). Biologie in Zahlen. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Franco, B. and A. Ballabio (2006). "X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders." Current Opinion in Genetics & Development **16**(3): 254-259.
- Fuchs, J., D. Demidov, et al. (2006). "Chromosomal histone modification patterns - from conservation to diversity." Trends in Plant Science **11**(4): 199-208.
- Gasser, S. M. and U. K. Laemmli (1986). "The organisation of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site." Embo J **5**(3): 511-518.
- Gazave, E., P. Gautier, et al. (2005). "Does radial nuclear organisation influence DNA damage?" Chromosome Research **13**(4): 377-388.
- Gerlich, D., J. Beaudouin, et al. (2003). "Global chromosome positions are transmitted through mitosis in mammalian cells." Cell **112**(6): 751-64.
- Gilbert, N., S. Boyle, et al. (2003). "Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1." Embo J **22**(20): 5540-50.
- Gilbert, N. and B. Ramsahoye (2005). "The relationship between chromatin structure and transcriptional activity in mammalian genomes." Brief Funct Genomic Proteomic **4**(2): 129-142.
- Gilbert, S. L. and P. A. Sharp (1999). "Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(24): 13825-13830.
- Gladilin, E., A. Micoulet, et al. (2007). "3D finite element analysis of uniaxial cell stretching: from image to insight." Phys Biol **4**(2): 104-13.
- Goetze, S., J. Mateos-Langerak, et al. (2007). "Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function." Seminars in Cell & Developmental Biology **18**(5): 707-714.

- Goldberg, A. D., C. D. Allis, et al. (2007). "Epigenetics: A Landscape Takes Shape." Cell **128**(4): 635-638.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, et al. (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2." Science **311**(5759): 395-398.
- Goodfellow, P. J., C. Mondello, et al. (1988). "Absence of Methylation of a CpG-Rich Region at the 5' End of the MIC2 Gene on the Active X, the Inactive X, and the Y Chromosome." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(15): 5605-5609.
- Graves, J. A. M., J. Gecz, et al. (2002). "Evolution of the human X - a smart and sexy chromosome that controls speciation and development." Cytogenetic & Genome Research **99**(1-4): 141-145.
- Gugel, H., J. Bewersdorf, et al. (2004). "Cooperative 4Pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy." Biophys J **87**(6): 4146-52.
- Habermann, F. A., M. Cremer, et al. (2001). "Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells." Chromosome Res **9**(7): 569-84.
- Hancock, R. (2004a). "Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model." Biol Cell **96**(8): 595-601.
- Hancock, R. (2004b). "A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus." J Struct Biol **146**(3): 281-90.
- Hancock, R. (2007). "Packing of the polynucleosome chain in interphase chromosomes: evidence for a contribution of crowding and entropic forces." Semin Cell Dev Biol **18**(5): 668-75.
- Heard, E. and C. M. Disteche (2006). "Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome." Genes Dev. **20**(14): 1848-1867.
- Heard, E., C. Rougeulle, et al. (2001). "Methylation of Histone H3 at Lys-9 Is an Early Mark on the X Chromosome during X Inactivation." Cell **107**(6): 727-738.
- Heitz, E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. Jahrbuch der Wissenschaftlichen Botanik. **1**: 762-818.
- Herzing, L. B., J. T. Romer, et al. (1997). "Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre." Nature **386**(6622): 272-5.
- Hirano, T., R. Kobayashi, et al. (1997). "Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein." Cell **89**(4): 511-21.
- Hong, L., G. P. Schroth, et al. (1993). "Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA." J. Biol. Chem. **268**(1): 305-314.
- Horn, P. J. and C. L. Peterson (2002). "MOLECULAR BIOLOGY: Chromatin Higher Order Folding--Wrapping up Transcription." Science **297**(5588): 1824-1827.
- Hsu, T. C. (1975). "A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis." Genetics **79** **Suppl**: 137-50.
- Huisinga, K. L., B. Brower-Toland, et al. (2006). "The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing." Chromosoma **115**(2): 110-22.
- Ito, T. (2007). "Role of Histone Modification in Chromatin Dynamics." J Biochem (Tokyo) **141**(5): 609-614.
- Jackson, D. A. and A. Pombo (1998). "Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells." J. Cell Biol. **140**(6): 1285-1295.

- Janeway, T. (2002). Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Jenke, A. C. W., I. M. Stehle, et al. (2004). "Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(31): 11322-11327.
- Jenke, B. H., C. P. Fetzter, et al. (2002). "An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo." EMBO Rep **3**(4): 349-54.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the Histone Code." Science **293**(5532): 1074-1080.
- Kim, S. H., P. G. McQueen, et al. (2004). "Spatial genome organization during T-cell differentiation." Cytogenetic and Genome Research **105**(2-4): 292-301.
- Kioussis, D. (2005). "Gene regulation: kissing chromosomes." Nature **435**(7042): 579-80.
- Klar, T. A., S. Jakobs, et al. (2000). "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(15): 8206-8210.
- Klose, R. J. and A. P. Bird (2006). "Genomic DNA methylation: the mark and its mediators." Trends in Biochemical Sciences **31**(2): 89-97.
- Kohlmaier, A., F. Savarese, et al. (2004). "A Chromosomal Memory Triggered by Xist Regulates Histone Methylation in X Inactivation." PLoS Biology **2**(7): e171.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." Science **184**(139): 868-71.
- Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." Cell **98**(3): 285-94.
- Kosak, S. T. and M. Groudine (2004). "Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation." Genes Dev. **18**(12): 1371-1384.
- Koss, L. G. (1998). "Characteristics of chromosomes in polarized normal human bronchial cells provide a blueprint for nuclear organization." Cytogenetics & Cell Genetics **82**(3/4): 230-237.
- Kourmouli, N., P. Jeppesen, et al. (2004). "Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals." J Cell Sci **117**(12): 2491-2501.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Küpper, K., A. Kölbl, et al. (2007). "Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression." Chromosoma **116**(3): 285-306.
- Kurz, A., S. Lampel, et al. (1996). "Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories." J. Cell Biol. **135**(5): 1195-1205.
- Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." Nature **410**(6824): 116-120.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, et al. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." J Cell Sci **116**(11): 2117-2124.
- Laemmli, U. K. (1978). "Levels of organization of the DNA in eucaryotic chromosomes." Pharmacol Rev **30**(4): 469-76.
- Lanctot, C., T. Cheutin, et al. (2007). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." Nat Rev Genet **8**(2): 104-115.
- Lee, D. Y., J. J. Hayes, et al. (1993). "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." Cell **72**(1): 73-84.
- Lee, J., L. S. Davidow, et al. (1999). "Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre." Nat Genet **21**(4): 400-404.

- Lee, J. T. (2005). "Regulation of X-Chromosome Counting by Tsix and Xite Sequences." *Science* **309**(5735): 768-771.
- Lee, J. T. and N. Lu (1999). "Targeted Mutagenesis of Tsix Leads to Nonrandom X Inactivation." *Cell* **99**(1): 47-57.
- Lee, J. T., W. M. Strauss, et al. (1996). "A 450 kb Transgene Displays Properties of the Mammalian X-Inactivation Center." *Cell* **86**(1): 83-94.
- 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): 865-873.
- Liang, G., M. F. Chan, et al. (2002). "Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements." *Mol. Cell. Biol.* **22**(2): 480-491.
- 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): 224-34.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp]Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Lukášová, E., S. Kozubek, et al. (2002). "The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei." *Chromosome Research* **10**(7): 535-548.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.)." *Nature* **190**(4773): 372-373.
- Lyon, M. F. (1962). "Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome." *Am J Hum Genet* **14**: 135-48.
- Lyon, M. F. (2003). "The Lyon and the LINE hypothesis." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **14**(6): 313-318.
- Maeshima, K., M. Eltsov, et al. (2005). "Chromosome structure: improved immunolabeling for electron microscopy." *Chromosoma* **114**(5): 365-75.
- Maeshima, K. and U. K. Laemmli (2003). "A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly." *Dev Cell* **4**(4): 467-80.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002a). "Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH." *J. Cell Biol.* **159**(5): 753-763.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002b). "Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories." *J. Cell Biol.* **157**(4): 579-589.
- Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, et al. (1993). "Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images." *Journal of Microscopy* **169**: 375-382.
- Maniotis, Andrew J., Christopher S. Chen, et al. (1997). "Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(3): 849-854.
- Manuelidis, L. (1985). "Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization." *Hum Genet* **71**(4): 288-93.
- Manuelidis, L. (1990). "A view of interphase chromosomes." *Science* **250**(4987): 1533-40.
- Marahrens, Y. (1999). "X-inactivation by chromosomal pairing events." *Genes Dev.* **13**(20): 2624-2632.
- Marahrens, Y., J. Loring, et al. (1998). "Role of the Xist Gene in X Chromosome Choosing." *Cell* **92**(5): 657-664.

- Maraldi, N. M., S. Squarzone, et al. (2005). "Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases." J Cell Physiol **203**(2): 319-27.
- Margueron, R., P. Trojer, et al. (2005). "The key to development: interpreting the histone code?" Current Opinion in Genetics & Development **15**(2): 163-176.
- Martens, J. H., R. J. O'Sullivan, et al. (2005). "The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome." Embo J **24**(4): 800-12.
- Martin, S., A. V. Failla, et al. (2004). "Measuring the size of biological nanostructures with spatially modulated illumination microscopy." Mol Biol Cell **15**(5): 2449-55.
- Mayer, R., A. Brero, et al. (2005). "Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse." BMC Cell Biol **6**: 44.
- McGhee, J. D., J. M. Nickol, et al. (1983). "Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length." Cell **33**(3): 831-41.
- Migeon, B. R. (1994). "X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences." Trends in Genetics **10**(7): 230-235.
- Molenaar, C., K. Wiesmeijer, et al. (2003). "Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes." Embo J **22**(24): 6631-41.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, et al. (1986). "Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene." Nature **323**(6089): 646-50.
- Müller, W. G., D. Rieder, et al. (2004). "Generic Features of Tertiary Chromatin Structure as Detected in Natural Chromosomes." Mol. Cell. Biol. **24**(21): 9359-9370.
- Münkel, C., R. Eils, et al. (1999). "Compartmentalization of Interphase Chromosomes Observed in Simulation and Experiment." Journal of Molecular Biology **285**(3): 1053-1065.
- Murken, J. a. C., Hartwig (1996). Humangenetik, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- 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.
- Nagele, R., T. Freeman, et al. (1995). "Precise Spatial Positioning of Chromosomes During Prometaphase: Evidence for Chromosomal Order." Science **270**(5243): 1831-1835.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1998). "Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation." Chromosoma **107**(5): 330-338.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1999). "Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells." J Cell Sci **112**(4): 525-535.
- Nesterova, T. B., C. M. Johnston, et al. (2003). "Skewing X chromosome choice by modulating sense transcription across the Xist locus." Genes Dev. **17**(17): 2177-2190.
- Neusser, M., V. Schubel, et al. (2007). "Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates." Chromosoma **116**(3): 307-320.
- Ng, K., D. Pullirsch, et al. (2007). "Xist and the order of silencing." EMBO Rep **8**(1): 34-9.
- Nguyen, D. K. and C. M. Disteché (2006). "Dosage compensation of the active X chromosome in mammals." Nat Genet **38**(1): 47-53.

- Nogami, M., A. Kohda, et al. (2000). "Relative locations of the centromere and imprinted SNRPN gene within chromosome 15 territories during the cell cycle in HL60 cells." J Cell Sci **113**(12): 2157-2165.
- Norton, V. G., B. S. Imai, et al. (1989). "Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change." Cell **57**(3): 449-457.
- 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): 1095-1110.
- Ohno, S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Berlin, Springer Verlag.
- Okada, Y., Q. Feng, et al. (2005). "hDOT1L Links Histone Methylation to Leukemogenesis." Cell **121**(2): 167-178.
- Okamoto, I., A. P. Otte, et al. (2004). "Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development." Science **303**(5658): 644-649.
- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development." Cell **99**(3): 247-257.
- Olins, A. L. and D. E. Olins (1974). "Spheroid chromatin units (v bodies)." Science **183**(4222): 330-2.
- Osborne, C. S., L. Chakalova, et al. (2004). "Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription." Nat Genet **36**(10): 1065-71.
- Osoegawa, K., A. G. Mammoser, et al. (2001). "A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome." Genome Res. **11**(3): 483-496.
- Parada, L., P. McQueen, et al. (2004). "Tissue-specific spatial organization of genomes." Genome Biology **5**(7): R44.
- Parada, L. A., P. G. McQueen, et al. (2002). "Conservation of Relative Chromosome Positioning in Normal and Cancer Cells." Current Biology **12**(19): 1692-1697.
- Parada, L. A., J. J. Roix, et al. (2003). "An uncertainty principle in chromosome positioning." Trends in Cell Biology **13**(8): 393-396.
- Park, P. C. and U. De Boni (1998). "A specific conformation of the territory of chromosome 17 locates ERBB-2 sequences to a DNase-hypersensitive domain at the nuclear periphery." Chromosoma **107**(2): 87-95.
- Paulson, J. R. and U. K. Laemmli (1977). "The structure of histone-depleted metaphase chromosomes." Cell **12**(3): 817-28.
- Peters, A. H. F. M., S. Kubicek, et al. (2003). "Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin." Molecular Cell **12**(6): 1577-1589.
- Plath, K., J. Fang, et al. (2003). "Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation." Science **300**(5616): 131-135.
- Plath, K., D. Talbot, et al. (2004). "Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex 1 proteins on the inactive X chromosome." J. Cell Biol. **167**(6): 1025-1035.
- 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**(17): 3973-3983.
- Rabl, C. (1885). Über Zelltheilung. Morphologisches Jahrbuch. C. Gegenbauer. **10**: 214-330.
- Rauch, J., T. A. Knoch, et al. (2008). "Light optical precision measurements of the active and inactive Prader-Willi syndrome imprinted regions in human cell nuclei." Differentiation **76**(1): 66-82.

- Rhodes, D. (1997). "Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up." Nature **389**(6648): 231, 233.
- Ross, M. T., D. R. Bentley, et al. (2006). "The sequences of the human sex chromosomes." Current Opinion in Genetics & Development **16**(3): 213-218.
- Rougeulle, C., J. Chaumeil, et al. (2004). "Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome." Mol. Cell. Biol. **24**(12): 5475-5484.
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, et al. (1986). "Cloning the gene for the inherited disorder chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 177-83.
- Saccone, S., C. Federico, et al. (2002). "Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds." Gene **300**(1-2): 169-178.
- Sadoni, N., M. C. Cardoso, et al. (2004). "Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication." J Cell Sci **117**(22): 5353-5365.
- 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): 1211-1226.
- Salníková, M., S. Kozubek, et al. (2000). "Spatial arrangement of genes, centromeres and chromosomes in human blood cell nuclei and its changes during the cell cycle, differentiation and after irradiation." Chromosome Research **8**(6): 487-499.
- Scanlan, M. J., A. J. Simpson, et al. (2004). "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." Cancer Immun **4**: 1.
- 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): 281-7.
- Scheuermann, M. O., A. E. Murmann, et al. (2005). "Characterization of nuclear compartments identified by ectopic markers in mammalian cells with distinctly different karyotype." Chromosoma **114**(1): 39-53.
- Scheuermann, M. O., J. Tajbakhsh, et al. (2004). "Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei." Experimental Cell Research **301**(2): 266-279.
- Schoeftner, S., A. K. Sengupta, et al. (2006). "Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing." Embo J **25**(13): 3110-22.
- Schotta, G., M. Lachner, et al. (2004). "A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin." Genes Dev. **18**(11): 1251-1262.
- Sedat, J. and L. Manuelidis (1978). "A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **42 Pt 1**: 331-50.
- Seligson, D. B., S. Horvath, et al. (2005). "Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence." Nature **435**(7046): 1262-1266.
- Shizuya, H., B. Birren, et al. (1992). "Cloning and Stable Maintenance of 300-Kilobase-Pair Fragments of Human DNA in Escherichia coli Using an F-Factor-Based Vector." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(18): 8794-8797.
- Shopland, L. S., C. V. Johnson, et al. (2003). "Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods." J Cell Biol **162**(6): 981-90.

- Shopland, L. S., C. R. Lynch, et al. (2006). "Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence." J. Cell Biol. **174**(1): 27-38.
- Simon, J. A. and J. W. Tamkun (2002). "Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes." Current Opinion in Genetics & Development **12**(2): 210-218.
- Solovei, Grandi, et al. (2004a). "Positional changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development." Cytogenetic & Genome Research **105**(2-4): 302-310.
- Solovei, I., A. Cavallo, et al. (2002). "Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH)." Exp Cell Res **276**(1): 10-23.
- Solovei, I., C. Lanctot, et al. (2008). "Unique organization of rod photoreceptor cell nuclei observed in nocturnal mammalian species." submitted.
- Solovei, I., L. Schermelleh, et al. (2004b). "Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types." Chromosoma **112**(8): 410-423.
- Spilianakis, C. G., M. D. Lalioti, et al. (2005). "Interchromosomal associations between alternatively expressed loci." Nature **435**(7042): 637-45.
- Storch, V. and U. Welsch (1994). Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer Verlag.
- Strachan, T. a. R., A.P. (1996). Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag.
- Struhl, K. (1998). "Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms." Genes Dev. **12**(5): 599-606.
- Tanabe, H., F. A. Habermann, et al. (2002a). "Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **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." Cytogenetic & Genome Research **108**(1-3): 255-261.
- Tanabe, H., S. Muller, et al. (2002b). "Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(7): 4424-4429.
- Tanious, F. A., J. M. Veal, et al. (1992). "DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites." Biochemistry **31**(12): 3103-12.
- Thoma, F., T. Koller, et al. (1979). "Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin." J Cell Biol **83**(2 Pt 1): 403-27.
- Thomas, J. O. (1999). "Histone H1: location and role." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 312-7.
- Travers, A. and H. Drew (1997). "DNA recognition and nucleosome organization." Biopolymers **44**(4): 423-33.
- van Driel, R., P. F. Fransz, et al. (2003). "The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels." J Cell Sci **116**(20): 4067-4075.
- Verdone, L., M. Caserta, et al. (2005). "Role of histone acetylation in the control of gene expression." Biochemistry & Cell Biology **83**(3): 344-353.
- 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.

- Versteeg, R., B. D. C. van Schaik, et al. (2003). "The Human Transcriptome Map Reveals Extremes in Gene Density, Intron Length, GC Content, and Repeat Pattern for Domains of Highly and Weakly Expressed Genes." Genome Res. **13**(9): 1998-2004.
- Vettese-Dadey, M., P. A. Grant, et al. (1996). "Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro." Embo J **15**(10): 2508-18.
- Vigneau, S., S. Augui, et al. (2006). "An essential role for the DXPas34 tandem repeat and Tsix transcription in the counting process of X chromosome inactivation." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(19): 7390-7395.
- Vinogradov, A. E. (1998). "Buffering: a Possible Passive-homeostasis Role for Redundant DNA." Journal of Theoretical Biology **193**(2): 197-199.
- Vinogradov, A. E. (2005). "Genome size and chromatin condensation in vertebrates." Chromosoma **113**(7): 362-369.
- Visser, A. E., F. Jaunin, et al. (2000). "High resolution analysis of interphase chromosome domains." J Cell Sci **113**(14): 2585-2593.
- 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**(9): 1565-1576.
- Waddington, C. H. (1942). Endeavor **1**: 18-20.
- Wakelin, L. P., W. D. McFadyen, et al. (1984). "Interaction of phenylthiolato-(2,2',2"-terpyridine)platinum(II) cation with DNA." Biochem J **222**(1): 203-15.
- Walker, C. L., C. B. Cargile, et al. (1991). "The Barr Body is a Looped X Chromosome Formed by Telomere Association." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(14): 6191-6195.
- 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.
- Weber, M. and D. Schubeler (2007). "Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark." Current Opinion in Cell Biology **19**(3): 273-280.
- Wegel, E. and P. Shaw (2005). "Gene activation and deactivation related changes in the three-dimensional structure of chromatin." Chromosoma **114**(5): 331-7.
- Weierich, C., A. Brero, et al. (2003). "Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes." Chromosome Research **11**(5): 485-502.
- Willetts, N. and R. Skurray (1987). Cellular and Molecular Biology. Escherichia coli and Salmonella typhimurium. F. C. Neidhardt. Washington. **2**: 1110-1133.
- Williams, R. R. and A. G. Fisher (2003). "Chromosomes, positions please!" Nat Cell Biol **5**(5): 388-90.
- Williams, R. R. E., S. Broad, et al. (2002). "Subchromosomal Positioning of the Epidermal Differentiation Complex (EDC) in Keratinocyte and Lymphoblast Interphase Nuclei." Experimental Cell Research **272**(2): 163-175.
- Williams, S. P., B. D. Athey, et al. (1986). "Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length." Biophys J **49**(1): 233-48.
- Williams, S. P. and J. P. Langmore (1991). "Small angle x-ray scattering of chromatin. Radius and mass per unit length depend on linker length." Biophys J **59**(3): 606-18.

- Wischnitzer, S. (1973). "The submicroscopic morphology of the interphase nucleus." Int Rev Cytol **34**: 1-48.
- Woodcock, C. L. and S. Dimitrov (2001). "Higher-order structure of chromatin and chromosomes." Current Opinion in Genetics & Development **11**(2): 130-135.
- Woodcock, C. L. and J. Frank (1984). "Nucleosome mass distribution using image averaging." J Ultrastruct Res **89**(3): 295-302.
- Woodfine, K., H. Fiegler, et al. (2004). "Replication timing of the human genome." Hum. Mol. Genet. **13**(2): 191-202.
- Worcel, A., S. Strogatz, et al. (1981). "Structure of chromatin and the linking number of DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(3): 1461-5.
- Wurster, D. H. and K. Benirschke (1967). "Chromosome studies in some deer, the springbok, and the pronghorn, with notes on placentation in deer." Cytologia (Tokyo) **32**(2): 273-85.
- Wutz, A. and R. Jaenisch (2000). "A Shift from Reversible to Irreversible X Inactivation Is Triggered during ES Cell Differentiation." Molecular Cell **5**(4): 695-705.
- Wutz, A., T. P. Rasmussen, et al. (2002). "Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA." Nat Genet **30**(2): 167-174.
- Xu, N., C.-L. Tsai, et al. (2006). "Transient Homologous Chromosome Pairing Marks the Onset of X Inactivation." Science **311**(5764): 1149-1152.
- Yang, X. J. (2004). "Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling." Bioessays **26**(10): 1076-87.
- Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." Genes Dev. **15**(18): 2343-2360.
- Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 27-65.
- Zink, D., M. D. Amaral, et al. (2004). "Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei." J. Cell Biol. **166**(6): 815-825.
- Zink, D., H. Bornfleth, et al. (1999). "Organization of Early and Late Replicating DNA in Human Chromosome Territories." Experimental Cell Research **247**(1): 176-188.
- Zinner, R., K. Teller, et al. (2007). "Biochemistry meets nuclear architecture: Multicolor immuno-FISH for co-localization analysis of chromosome segments and differentially expressed gene loci with various histone methylations." Adv Enzyme Regul **47**: 223-41.
- Zirbel, R. M., U. R. Mathieu, et al. (1993). "Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries." Chromosome Research **1**(2): 93-106.

7 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Cremer für die Möglichkeit bedanken, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und für das damit entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit. Außerdem hat er mir beigebracht, dass man nie aufgeben darf, wenn man etwas erreichen will.

Bei PD. Dr. Angelika Böttger möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großes Dankeschön an Dr. Marion Cremer für ihre Geduld bei all meinen Fragen und ihr unerschöpfliches Interesse an meiner Arbeit.

A very special thank-you to Dr. Irina Solovei. Without you I would not be a Dr. now.

Bei meiner Diplomandin Doris Illner möchte ich mich dafür bedanken, dass sie in sehr selbstverantwortlicher Art Versuche gemacht hat, die zum Teil auch zu dieser Arbeit beitragen.

Danke auch an meine Praktikanten Katrin Härtling, Yana Feodorova, Simon Ernst und Beatrice Schmeer, die mir bei einigen Versuchen geholfen haben.

Danke an Heiner Albiez, für seinen Rat und seine Tat und für überhaupt alles in jeglichen Fragen.

DANKE AN ROMAN ZINNER FÜR DAS JAHRELANGE ZIMMER TEILEN, SEKRETARIAT TELLER-DIENSTE LEISTEN UND IMMER ZUHÖREN.

Danke an Dani Köhler, Claudia Weierich und Katrin Küpper. Ohne Euch hätte ich das nicht geschafft. Aber eigentlich...

Danke an Claudia Hepperger für's Mitleiden während der Schreibphase (Hast Du heute schon was gemacht?).

Danke an Robert Mayer, der immer einen zynischen Spruch parat hatte.

Danke an Hilmar Strickfaden für seine Gitarreneinlagen und besondere Einsichten in Origami-Techniken.

Danke an Andreas Zunhammer und Jens Nagel einfach dafür, dass sie da waren.

Danke an Florian Grasser für seine Hilfsbereitschaft beim Suchen von Fehlern in *Distangles*-Parameterfiles.

Danke an Alexandra Kölbl und Tobias Thormeyer für die nette Zimmernachbarschaft.

Danke an die PostDocs Christian Lanctôt, Stefan Müller, Michaela Neusser, Steffen Dietzel, Alessandro Brero, Joachim Walter und Lothar Schermelleh für all Eure Hilfe während dieser Zeit.

Danke an Boris Joffe für seine geduldige Hilfe in Fragen seitens der Statistik.

Danke an Heidi Jahn-Henninger für die wunderbare Ordnung und Sauberkeit im Labor, sowie das Bereitstellen unzähliger Lösungen.

Danke an Carolin Bleese und Ming Zhao.

Danke an meine Eltern, Geschwister und Freunde. Ohne Euch wäre dies nie möglich gewesen.

8 Curriculum Vitae

Kathrin Teller

geboren am 25.09.1977 in Fürth/Bayern

Volkartstr.71, Rgb..

80636 München

Telefon: 089-18970289

Mobil: 0177-8456495

Email: kathrin.teller@gmx.de

Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1997

Grundschule in Bubenreuth und Gymnasium in Erlangen

Abschluss: Abitur (Note 2,6)

Hochschulstudium

10/1998 – 10/1999

Studium des Diplomstudiengangs Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik

Nebenfächer: Immunologie, Medizinische Mikrobiologie, Pharmakologie und Toxikologie

Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur topologischen Assoziation der paternalen und maternalen PWS/AS-Regionen auf Chromosom 15q11-13 während des Zellzyklus“, Note 1,0

Abschluss: Diplom mit der Note 1,6

05/2004 – dato

Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Rupprecht-Karls-Universität Heidelberg

Thema: „Die Architektur des X-Chromosoms – eine „top down“-Analyse in humanen Fibroblasten“

Berufserfahrung

10/2003 – 04/2004

HiWi-Tätigkeit an der Ludwig-Maximilians-Universität

Aufgabenschwerpunkte:

Zellkultur, 3D Fluoreszenz in Situ Hybridisierung, konfokale Mikroskopie, computergestützte Datenauswertung

Auslandsaufenthalte

05/2005	Amsterdam, Niederlande Forschungsaufenthalt im Rahmen eines EU-Projekts
07/1997 – 08/1997	Universidad de Malaga, Spanien (Spanisch-Unterricht)
04/1993	Schüleraustausch mit einer Partnerschule in England (Cambridge)

Sprachkenntnisse

Englisch	- sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
Spanisch	- Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

Sehr gute Kenntnisse im Umgang mit MS Office (Word, Excel, PowerPoint, Outlook), Adobe Photoshop
Kenntnisse im Umgang mit SigmaStat, AMIRA

München, den 28. Februar 2008

9 Publikationen

1. **Teller, K.**, Solovei, I., Buiting, K., Horsthemke, B., Cremer, T., (2007). "Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(38): 14970-5.
2. Zinner, R., **Teller, K.**, Versteeg, R., Cremer, T., Cremer, M., (2007). "Biochemistry meets nuclear architecture: multicolor immuno-FISH for co-localization analysis of chromosome segments and differentially expressed gene loci with various histone methylations." Adv Enzyme Regul **47**: 223-41.
3. Rauch, J., T. A. Knoch, Solovei, I., **Teller, K.**, Stein, S., Buiting, K., Horsthemke, B., Langowski, J., Cremer, T., Hausmann, M., Cremer, C., (2008). "Light optical precision measurements of the active and inactive Prader-Willi syndrome imprinted regions in human cell nuclei." Differentiation **76**(1): 66-82.
4. Yang, S., Köhler, D., **Teller, K.**, Cremer, T., Le Baccon, P., Heard, E., Eils, R., Rohr, K., (2006). "Non-rigid registration of 3D multi-channel microscopy images of cell nuclei." Med Image Comput Comput Assist Interv Int Conf Med Image Comput Comput Assist Interv **9**(Pt 1): 907-14.
5. Yang, S., Illner, D., **Teller, K.**, Cremer, M., Solovei, I., van Driel, R., Joffe, B., Cremer, T., Eils, R., Rohr, K., (2008). "Structural analysis of interphase X-chromatin fiber based on statistical shape theory." (in Vorbereitung)

10 Ehrenwörtliche Versicherung

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

München, den 28. Februar 2008

Kathrin Teller

11 Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

München, den 28. Februar 2008

Kathrin Teller

12 Anhang

12.1 BAC-Liste

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
1	RP11-74L17	1865728	2013567	LOC441480 LOC203604	---	---	R	12	6	37	3,7
2	RP11-155F12	2449600	2605375	LOC401577 CD99	---	201028_s_at 4307.1	R	4	2	38	3,8
3	RP11-418N20	2922871	3106243	ARSD ARSE LOC347527 ARSF	---	206831_s_at 254.965 205894_at 223.452 214490_at 245.362	R	4	2	42	4,2
4	RP11-428I5	3231922	3407677	DKFZp564I19 22 ASSP4	---	209596_at 2472.9 ---	R	2	1	44	4,4
5	RP11-73C20	3466729	3632176	PRKX	---	204060_s_at 230.463	R	2	1	45	4,5
6	RP11-37M12	4004524	4171874	---	---	---	R	0	0	48	4,8
7	RP11-313N15	4363498	4550619	---	---	---	G2	0	0	50	5
8	RP11-42P20	5191658	5350755	LOC347381	---	---	G2	1	0,5	55	5,5
9	RP11-381A9	6322683	6522988	---	---	---	R	0	0	58	5,8
10	RP11-483M24	6807445	6986643	LOC392425 FAM16AX STS	---	---	R	3	1,5	44	4,4
11	RP11-147O4	7962996	8111526	VCX2	---	207281_x_at 160.977	R	1	0,5	44	4,4
12	RP11-347D3	8398299	8605280	LOC401578 KAL1 FAM9A LOC392426	---	205206_at 61.585 --- ---	R	4	2	48	4,8
13	RP11-479A17	8883683	9050713	LOC392426 FAM9B LOC401579	---	---	R	3	1,5	47	4,7
14	RP11-111F17	9168489	9310156	LOC442443 TBL1X	---	201867_s_at 184.075 204967_at 131.774	R	2	1	48	4,8
84	RP11-259J9	9589358	9757177	APXL	---	205148_s_at 96.9414 205149_s_at 121.57 214769_at 40.6722 / 217556_at 50.8832	G2	4	2	52	5,2
15	RP11-196N16	10041748	10137830	CLCN4	---	205148_s_at 96.9414 205149_s_at 121.57 214769_at 40.6722 / 217556_at 50.8832	G2	5	2,5	52	5,2
16	RP11-66H17	11211051	11361474	ARHGAP6	---	205148_s_at 130.798 / 208085_s_at 157.437 /	G2	7	3,5	66	6,6
17	RP11-3O12	11691588	11844380	PDZK10	---	215052_at 501.796	G2	13	6,5	69	6,9
18	RP11-100J8	11907170	12084437	PDZK10	---	215052_at 501.796	G2	12	6	71	7,1

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
19	RP11-449I8	12894005	13046286	---	---	---	G2	19	9,5	68	6,8
20	RP11-1A22	13290713	13427932	EGFL6 MGC17403 RAB9A SEDL OFD1	219454_at --- 221808_at 209751_s_at 203569_s_at	40.6722 --- 747.544 421.734 286.648	G2	20	10	69	6,9
21	RP11-268O19	13599409	13768214	RAB9A SEDL OFD1 GPM6B FLJ20514	221808_at 209751_s_at 203569_s_at 209167_at 209168_at 209169_at 209170_at 219252_s_at	747.544 421.734 286.648 186.346 221.749 159.888 40.6722 161.371	G2	22	11	71	7,1
76	RP11-94J4	14019120	14190025	LOC286480	---	---	G2	15	7,5	72	7,2
22	RP11-109L18	14547045	14719197	GLRA2 LOC392428 FLJ34064 MOSPD2	207462_at --- --- 221895_at 64883_at	911.074 --- --- 161.168 295.396	G2	18	9	73	7,3
23	RP11-350I6	14768005	14925461	MOSPD2 ASB9	221895_at 64883_at 205673_s_at	161.168 295.396 107.721	G2	18	9	73	7,3
24	RP11-264L13	15239166	15381151	FIGF PIR BMX ACE2 TMEM27 LOC340591	206742_at 207469_S_at 206464_at 214379_at 219962_at 222257_s_at --- 213363_at	79.167 94.0575 121.443 273.349 86.491 51.7141 --- 380.926	G2	19	9,5	73	7,3
25	RP11-237K17	15649169	15819746	CA5B U2AF1L2 AP1S2 GRPR LOC441482	207129_at 214082_at 208174_x_at 213876_x_at 203299_s_at 203300_x_at 207929_at ---	46.2709 129.134 123.735 833.088 270.94 567.848 275.953 ---	G2	25	12,5	72	7,2

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
26	RP11-347D6	16180299	16347878	LOC392429 CTPS2 CALB3	--- 219080_s_at 207885_at	--- 526.823 104.488	G2	22	11	71	7,1
27	RP11-160F21	16267255	16432260	LOC392429 CTPS2 CALB3 SYAP1	-- 219080_s_at 207885_at ---	-- 526.823 104.488 --	G2	20	10	71	7,1
28	RP11-268O15	16915281	17088027	REPS2 NHS	205645_at 220873_at 206217_at 211127_x_at 211128_at 211129_x_at 211130_x_at 211131_s_at 219283_at	102.993 205.383 157.394 1135.27 310.664 140.414 69.7219 341.18 585.722	G2	14	7	74	7,4
77	RP11-115I10	17265069	17446336	NHS	206217_at 211127_x_at 211128_at 211129_x_at 211130_x_at 211131_s_at 219283_at	157.394 1135.27 310.664 140.414 69.7219 341.18 585.722	R	13	6,5	76	7,6
78	RP11-46N14	17682195	17849728	---	---	---	R	17	8,5	71	7,1
29	RP11-75D20	18074131	18266588	SCML2 CDKL5	206147_x_at 206575_at 216923_at	438.351 71.542 125.551	R	14	7	70	7
30	RP11-318G17	18513637	18676797	CDKL5 RS1 PPEF1 LOC441483 LOC441484 PHKA2 LOC441485 GPR64	206575_at 216923_at 207363_at 216937_s_at 206547_s_at --- --- 209438_at 209439_s_at 209438_at 206002_at	71.5422 125.551 75.4633 1365.4 66.2175 --- --- 96.5104 389.233 96.5104 60.9419	R	17	8,5	66	6,6
79	RP11-358O1	18915924	19098823	LOC401581	---	---	R/G2	16	8	70	7
31	RP11-317L16	19317804	19487786	FLJ16518 SH3KBP1	200979_at ---	325.711 ---	G2	16	8	74	7,4

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
32	RP11-467F23	19570863	19751489	SH3KBP1 CXorf23	---	---	G2	14	7	75	7,5
80	RP11-100D14	20076904	20233831	---	---	---	G2	7	3,5	73	7,3
81	RP11-52E20	20885846	21032627	---	---	---	G2	10	5	64	6,4
82	RP11-16H4	21227780	21397725	CNKS2	206731_at	61.9213	G2	8	4	65	6,5
83	RP11-147O5	21659073	21823564	MBTPS2 SMS PHEX	206473_at 202043_s_at 210617_at	123.136 3345.32 172.03	R	10	5	60	6
33	RP11-478I12	22147898	22343781	PHEX FLJ25735 LOC389841	210617_at --- ---	172.03 --- ---	R	12	6	59	5,9
34	RP11-192D9	22497537	22661124	DDX53	---	---	R	14	7	62	6,2
35	RP11-203E20	22791267	23076510	MGC45134 LOC392432	---	---	R	15	7,5	67	6,7
36	RP11-359I12	23304119	23461397	PRDX4	201923_at	3022.27	R	18	9	65	6,5
37	RP11-326D20	23523356	23731243	SAT MGC4825 LOC317771 FLJ25444	203455_s_at 221620_s_at ---	589.865 409.98 ---	R	19	9,5	64	6,4
38	RP11-110F9	26434818	26578708	HMGA1L1	---	---	G3	10	5	59	5,9
39	RP11-106N9	26819948	27000980	---	---	---	G3	17	8,5	55	5,5
40	RP11-265A20	27306636	27437523	LOC439944	---	---	G3	13	6,5	52	5,2
41	RP11-116M3	27678468	27841507	LOC139425	---	---	G3	12	6	52	5,2
42	RP11-110F5	27942877	28094474	---	---	---	G3	12	6	50	5
43	RP11-57I11	28539877	28710812	IL1RAPL1	220663_at	113.638	G3	9	4,5	45	4,5
44	RP11-262B9	28947992	29124810	IL1RAPL1	220663_at	113.638	G3	6	3	41	4,1
45	RP11-426F14	29241185	29401082	IL1RAPL1	220663_at	113.638	R	6	3	40	4
46	RP11-241G16	29834432	30026614	MAGEB2 MAGEB3 MAGEB4 MAGEB1	206218_at 207579_at 207580_at 207581_s_at 207534_at	111.383 318.307 43.1304 314.702 71.1239	R	10	5	37	3,7
47	RP11-153D5	30083906	30248373	NR0B1	206644_at 206645_s_at	93.4854 232.975	R	12	6	36	3,6
48	RP11-242C19	30468985	30634237	GK TAB3	207387_s_at ---	117.785 ---	R	12	6	37	3,7
49	RP11-46A23	30874687	31028427	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	R	11	5,5	39	3,9

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
50	RP11-122N14	31276805	31440002	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	R/G3	6	3	37	3,7
51	RP11-457L2	31728360	31889416	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	G3	3	1,5	35	3,5
52	RP11-168F15	31989652	32063272	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	G3	1	0,5	40	4
53	RP11-42E12	32402623	32607671	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	G3	1	0,5	44	4,4
54	RP11-148E7	32825893	32989474	DMD	203881_s_at 207660_at 208086_s_at	40.6722 80.0685 159.57	G3	1	0,5	41	4,1
55	RP11-451K2	33362395	33540840	---	---	---	G3	4	2	48	4,8
56	RP11-419K19	33699372	33865350	---	---	---	G3	5	2,5	50	5
57	RP11-281B1	33989929	34174295	LOC392439	---	---	G3	7	3,5	50	5
58	RP11-211J6	34477242	34653166	---	---	---	G3	8	4	52	5,2
59	RP11-141B4	34883967	35058211	---	---	---	G3	10	5	52	5,2
60	RP11-111N24	35226356	35374102	---	---	---	G3	9	4,5	52	5,2
61	RP11-22O14	35579740	35753385	LOC139604 CXorf22	---	---	G3	8	4	54	5,4
62	RP11-134B11	36062456	36206458	LOC158730 LOC401583	---	---	G3	12	6	56	5,6
63	RP11-562E1	37007363	37179999	PRRG1 LOC389844 LOC139249	205618_at	329.384	G3	23	11,5	60	6
64	RP11-495K15	37239134	37425983	FLJ42925 XK CYBB	206698_at 203922_s_at 203923_s_at 217431_x_at	46.608 98.5072 242.996 40.6722	G3/R	24	12	60	6
65	RP11-245M13	37686362	37831467	SYTL5 SRPX	204955_at	1281.48	R	26	13	61	6,1
66	RP11-64H6	38029097	38197598	OTC LOC392442 LOC392443 LOC442446 TM4SF2	207200_at	40.6722	R	20	10	63	6,3
67	RP11-414E15	38437280	38608517	---	---	---	R	18	9	65	6,5
68	RP11-71H10	38817958	38973698	LOC389846	---	---	R	13	6,5	68	6,8
69	RP11-429N5	39524948	39730119	LOC392445 BCOR	219433_at	180.237	R	11	5,5	71	7,1

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
70	RP11-126D17	40108591	40246636	ATP6AP2 LOC347411 MGC39350	201442_s_at 201443_s_at 201444_s_at --- ---	73.5896 2019.96 1825.34	R	17	8,5	71	7,1
71	RP11-185O17	40472057	40655592	LOC401584 LOC392447 LOC286444 LOC442447	217466_x_at 221798_x_at	5283.38 13435.9	R	21	10,5	73	7,3
72	RP11-360E17	40860674	41053405	DDX3X	201210_at 201211_s_at 207617_at 212514_x_at 212515_s_at	1789.33 420.471 40.6722 598.662 835.633	R	18	9	75	7,5
73	RP11-36E24	41598677	41777431	---	---	---	R	9	4,5	82	8,2
74	RP11-36C6	42016782	42167008	---	---	---	R/G2	7	3,5	86	8,6
75	RP11-366F4	42836266	43009514	LOC139334	---	---	G2	9	4,5	94	9,4
85	RP11-384A17	43240048	43392966	---	---	---	G2	11	5,5	109	10,9
86	RP11-110B2	43717626	43895364	NDP LOC643167 EFHC2	206022_at --- 220523_at 220591_s_at	116,162 40,6722 141,611	G2	15	7,5	127	12,7
87	RP11-469F12	43862315	44049267	EFHC2	220523_at 220591_s_at	40,6722 141,611	G2	15	7,5	132	13,2
88	RP11-52K7	44493703	44633434	LOC644464 DUSP21 UTX	--- 220515_at 203990_s_at 203991_s_at 203992_s_at	40,6722 114,894 52,5064 115,035	G2	16	8	163	16,3
89	RP11-452M18	44849398	45013048	UTX CXorf36	203990_s_at 203991_s_at 203992_s_at 219652_s_at	114,894 52,5064 115,035 124,308	G2	16	8	166	16,6
90	RP11-10C19	45087908	45237080	LOC139061	---	---	G2	16	8	167	16,7
91	RP11-351L6	45625087	45801972	LOC643267 LOC139060	---	---	G2	21	10,5	162	16,2
92	RP11-28K1	46129275	46287646	LOC392456 LOC389849 LOC643351 ZNF673 RNU6P1	206583_at ---	161,335	G2	28	14	162	16,2
93	RP11-48J14	46515092	46666894	RP2 PHF16	205191_at 204866_at	155,333 177,503	G2	36	18	164	16,4

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
94	RP11-96A6	46666898	46829091	PHF16 RGN	204866_at 210751_s_at	177,503 81,472	G2	38	19	165	16,5
95	RP11-17B23	47222765	47415438	ZNF41 CXorf24 LOC389850 ARAF TIMP1 SYN1 PFC ELK1 LOC643468 UXT	214904_at --- 215207_x_at 201895_at 201666_at 221914_at 206380_s_at 203617_x_at 210850_s_at 217039_x_at --- 218495_at	40,6722 221,299 658,649 10498,8 93,2812 185,446 637,436 74,7405 455,489 2110,74	G2	53	26,5	178	17,8
96	RP11-28K10	47651169	47825381	ZNF81 ZNF21 LOC389852 ZNF630	215901_at --- --- ---	127,256	R	65	32,5	190	19
97	RP11-107A19	48043403	48203755	SSX9 psiSSX9 SSX3 LOC653530 SSX4 psiSSX6 psiSSX7 SLC38A5	215881_x_at --- 207666_x_at 211670_x_at 211731_x_at 215881_x_at --- 208586_s_at 210394_x_at 211425_x_at --- --- ---	175,689 40,6722 103,216 167,13 175,689 218,848 120,337 203,143	R	78	39	202	20,2
98	RP11-416B14	48337118	48519446	WDR13 WAS SUV39H1 LOC392465 LOC643687	222138_s_at 205400_at 218619_s_at --- ---	1832,02 147,193 404,634	R	85	42,5	205	20,5

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
99	RP11-122F2	49204287	49373098	LOC645061 GAGE6 LOC645073 LOC645083 LOC645093 GAGE1 VDAC1LP LOC139163 PAGE1	--- 206640_x_at 207086_x_at 207739_s_at 208155_x_at --- --- --- 207739_s_at 208283_at --- --- 206897_at	69,5986 167,268 84,9094 240,646 84,9094 99,229 137,614	R	69	34,5	204	20,4
100	RP11-58H17	49260873	49460929	VDAC1LP LOC139163 PAGE1	--- --- 206897_at	 137,614	R	65	32,5	204	20,4
101	RP11-110H18	49955055	50130809	CCNB3 DGKK	--- ---		G1	45	22,5	206	20,6
102	RP11-96H3	50279698	50433914	KIAA1202	---		G1	21	10,5	213	21,3
103	RP11-263H2	50604902	50757352	LOC347376 BMP15 LOC644129	--- 221332_at ---	72,9624	G1	22	11	216	21,6
104	RP11-69C3	50914118	51081692	LOC392467	---		G1	22	11	215	21,5
105	RP11-114H20	51626991	51630387	MAGED1	209014_at	5808,5	G1	37	18,5	208	20,8
106	RP11-248E15	51889966	52047428	LOC653210 LOC653466	--- ---		G1	44	22	205	20,5
107	RP11-155M8	52595182	52776436	LOC644518 LOC644550 psiSSX4 psiSSX1 SSX8 SSX7 psiSSX5 SSX2	--- --- --- --- --- 215881_x_at --- 207493_x_at 210497_x_at 215881_x_at 216471_x_at	175,689 203,03 548,696 175,689 54,0055	G1	51	25,5	191	19,1
108	RP11-52N6	53239471	53381681	SMCX IQSEC2 LOC653516	202383_at 214819_at ---	337,409 71,0645	G1	39	19,5	174	17,4
178	RP11-155O24	53392170	53555098	SMC1L1 RIBC1 HADH2	201589_at 217555_at --- 202282_at	657,773 46,2699 1124,53	G	39	19,5	168	16,8

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
109	RP11-161N3	53953446	54145539	PHF8 CXorf17	212916_at 215065_at 220685_at	175,108 83,4625 183,764	G1	24	12	148	14,8
179	RP11-353K22	54392638	54582839	WNK3 RP1-112K5.2 FGD1 GNL3L	--- 213079_at 204819_at 205010_at 222109_at	702.906 416.102 79.9656 251.113	G	21	10,5	117	11,7
110	RP11-148J19	54733448	54924911	ITIH5L MAGED2	--- 208682_s_at 213627_at	1356,53 1926,37	R	26	13	113	11,3
111	RP11-135O10	55257361	55424005	PAGE5 PAGE3	--- ---	---	R	27	13,5	109	10,9
112	RP11-155P15	55605813	55748562	FOXR2 LOC644900 XAGE-4	--- --- ---	---	R	24	12	108	10,8
113	RP11-3N11	56011729	56175995	LOC644938	---	---	R	19	9,5	101	10,1
114	RP11-155D22	56448914	56594852	---	---	---	R/G2	17	8,5	96	9,6
115	RP11-78H10	56867680	57031278	SPIN3	---	---	G2	14	7	89	8,9
116	RP11-141B6	57182900	57346972	LOC645067 FLJ31204	---	---	G2	16	8	86	8,6
117	RP11-20I12	57636030	57767933	ZXDB NOD24	215263_at 216013_at 216014_s_at ---	87,118 101,942 163,138	G2	14	7	70	7
118	RP11-96A5	58201216	58375121	---	---	---	G2	8	4	58	5,8
119	RP11-78G20	61973741	62133110	---	---	---	R	4	2	43	4,3
120	RP11-93I16	62287639	62440826	LOC645251	---	---	R	5	2,5	40	4
121	RP11-73M8	62713253	62868912	ARHGEF9	203263_s_at 203264_s_at	89,2315 98,1361	R	11	5,5	40	4
122	RP11-346J4	63037958	63232026	HNRPDP	---	---	R	11	5,5	37	3,7
123	RP11-118L20	63384082	63540920	MTMR8	220537_at 221390_s_at	53,1177 87,7683	R	11	5,5	38	3,8
124	RP11-90I7	63877784	64041067	---	---	---	R/G2	15	7,5	41	4,1
180	RP11-151G12	64287737	64454280	---	---	---	cen	18	9	45	4,5
125	RP11-434B14	64678009	64856130	FKSG43 MSN	--- 200600_at	3444,84	G2	17	8,5	55	5,5
126	RP11-117H20	65060085	65229621	LOC645420 VSIG4 LOC392485 LOC645430	--- 204787_at ---	161,592	G2	17	8,5	57	5,7
127	RP11-414C19	65485528	65638407	GPR165P LOC402408	---	---	G2	15	7,5	68	6,8
128	RP11-348O5	65903248	66045337	---	---	---	G2	11	5,5	77	7,7

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
129	RP11-242G13	66328751	66489980	---	---	---	G2	8	4	84	8,4
130	RP11-75E16	66605587	66756045	AR	---	---	G2	7	3,5	87	8,7
131	RP11-76N1	67048278	67193715	OPHN1	206323_x_at	1380,06	G2	9	4,5	94	9,4
132	RP11-110C20	67395315	67555859	LOC643374 OPHN1	---	---	G2/R	10	5	99	9,9
133	RP11-235H17	67911405	68068688	SERBP1P EFNB1	---	---	R	11	5,5	103	10,3
134	RP11-54P15	68347655	68528125	---	---	---	R	17	8,5	110	11
135	RP11-188E19	68721768	68888505	EDA	206217_at	157,394	R	21	10,5	112	11,2
136	RP11-177A4	69047580	69196884	LOC643426 EDA DGAT2L4	---	---	R	20	10	113	11,3
137	RP11-151F17	69591529	69744739	DLG3 TEX11	207732_s_at 212727_at 212728_at 212729_at 221259_s_at	259,673 191,463 395,492 240,437 153,346	R	31	15,5	114	11,4
138	RP11-485H23	70127149	70300853	SNX12 MLLT7 LOC158830 IL2RG MED12 NLGN3	---	---	R	35	17,5	108	10,8
139	RP11-402P6	70654274	70864233	LOC653664 OGT ACRC CXCR3 LOC158825 LOC645783	---	---	R	33	16,5	107	10,7
140	RP11-262D11	71038276	71216074	LOC441502	---	---	R	38	19	107	10,7
141	RP11-125B17	71482485	71650650	HDAC8	---	---	R	33	16,5	107	10,7
142	RP11-69J13	71698320	71874440	HDAC8 PHKA1 LOC645938	---	---	R	36	18	108	10,8
181	RP11-10F3	72299646	72425778	NAP1L2 LOC646016	219368_at ---	55,2969 ---	G	33	16,5	113	11,3
143	RP11-13M9	72767254	72921991	CHIC1 LOC389873	---	---	G2	36	18	113	11,3

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
182	RP11-570B23	73140412	73300964	RPSAP14 LOC646056 LOC260337 LOC646068 MKRNP1	---	---	G	29	14,5	112	11,2
274	RP11-348O6	73541133	73718361	LOC646108 SLC16A2	---	204462_s_at 611.884	R	28	14	115	11,5
183	RP11-203C17	73920999	74093863	KIAA2022	---	---	R	23	11,5	113	11,3
275	RP11-361K24	74286363	74448393	ABCB7 RP11-311P8.3	209620_s_at ---	209.771	R/G1	23	11,5	111	11,1
276	RP11-478C17	74780269	74953227	LOC286495 MAGEE2	208661_s_at ---	569.61	R/G1	14	7	105	10,5
277	RP11-15N1	74978543	75129521	---	---	---	R/G1	14	7	106	10,6
278	RP11-194N18	75473033	75620552	MAGEE1	---	---	G1	12	6	94	9,4
279	RP11-278D10	75893061	76065951	MIRN384	---	---	G1	10	5	88	8,8
280	RP11-42M11	76635703	76778892	ATRX	208859_s_at 208860_s_at 208861_s_at 211022_s_at 217701_x_at	131.742 299.646 590.836 141.453 84.7113	G1	14	7	79	7,9
281	RP11-142K4	76840499	77003368	ATRX DKFZp564K142	208859_s_at 208860_s_at 208861_s_at 211022_s_at 217701_x_at 221553_at	131.742 299.646 590.836 141.453 84.7113 347.56	G1	14	7	76	7,6
282	RP11-378B3	77306339	77458898	LOC727814 CYSLTR1	---	216288_at 67.8899	G1/R	16	8	68	6,8
283	RP11-14C19	77697069	77875555	ZCCHC5	---	---	R	17	8,5	66	6,6
284	RP11-153A13	78071843	78236079	P2RY10 LOC449518	---	214615_at 45.6164	R	14	7	65	6,5
285	RP11-170P13	78359542	78510471	LOC347363 ITM2A	---	202746_at 202747_s_at 40.6722 183.204	R	14	7	58	5,8
286	RP11-30O9	78930959	79065201	---	---	---	R	11	5,5	50	5
287	RP11-135K14	79369398	79536504	---	---	---	R/G3	11	5,5	52	5,2
288	RP11-114E9	79590368	79754180	LOC727874 LOC347364 LOC642546	---	---	R/G3	9	4,5	50	5
289	RP11-196G4	80046114	80198225	LOC642585	---	---	G3	9	4,5	48	4,8
290	RP11-300P13	80506623	80687111	---	---	---	G3	8	4	46	4,6
291	RP11-113F23	80942125	81092762	---	---	---	G3	4	2	45	4,5
292	RP11-472I8	81314608	81446759	---	---	---	G3	3	1,5	44	4,4

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
293	RP11-2D7	81680867	81842359	---	---	---	G3	2	1	44	4,4
294	RP11-58H8	82116136	82305611	---	---	---	G3	2	1	40	4
295	RP11-246G22	82543054	82716671	POU3F4	207694_at	175.939	G3	6	3	37	3,7
296	RP11-346M24	82954746	83148509	CYLC1	216778_s_at 216779_at 216809_at	56.5044 162.192 333.649	G3	7	3,5	36	3,6
297	RP11-125I6	83342718	83512953	CXorf43	---	---	G3	10	5	33	3,3
298	RP11-70I5	83695070	83849096	---	---	---	G3	10	5	31	3,1
299	RP11-36O19	84284037	84447576	ZNF711 POF1B	---	---	G3	12	6	32	3,2
300	RP11-153M4	84903148	85060091	CHM MIRN361	207099_s_at ---	80.1876	G3	9	4,5	28	2,8
301	RP11-15L16	85447662	85584418	DACH2	---	---	R	6	3	24	2,4
302	RP11-187H16	85676351	85833999	DACH2	---	---	R	6	3	25	2,5
303	RP11-243M6	86157725	86297391	---	---	---	R/G3	6	3	27	2,7
304	RP11-269J23	86527672	86655739	---	---	---	R/G3	6	3	28	2,8
305	RP11-365H4	87358708	87508500	---	---	---	G3	5	2,5	30	3
306	RP11-64G5	87781931	87947410	CPXCR1	---	---	G3	5	2,5	30	3
307	RP11-111O14	88079214	88236864	---	---	---	G3	3	1,5	31	3,1
308	RP11-164B23	88546220	88700424	---	---	---	G3	3	1,5	30	3
309	RP11-482H5	88947792	89144536	TGIF2LX	---	---	G3	2	1	28	2,8
310	RP11-350L13	89350045	89511460	---	---	---	G3	2	1	25	2,5
311	RP11-140L2	89728774	89890669	---	---	---	G3	3	1,5	24	2,4
312	RP11-148C7	90113989	90289915	---	---	---	G3	4	2	23	2,3
313	RP11-383D15	90444424	90592682	PABPC5	---	---	G3	5	2,5	23	2,3
314	RP11-419C11	90850801	91019714	LOC728150 PCDH11X	---	---	G3	6	3	24	2,4
					208366_at 210292_s_at	145.211 59.9744					
315	RP11-204F7	91251464	91408666	LOC642784 PCDH11X	---	---	G3	6	3	23	2,3
					208366_at 210292_s_at	145.211 59.9744					
316	RP11-115D3	91740334	91882405	PCDH11X LOC392501	---	---	G3/R	7	3,5	23	2,3
					208366_at 210292_s_at	145.211 59.9744					
317	RP11-88F12	92511357	92668313	---	---	---	G3/R/G2	8	4	21	2,1
318	RP11-136J6	92991864	93185463	---	---	---	R/G2	5	2,5	20	2
319	RP11-351M18	93441669	93590986	LOC643371	---	---	R/G2	3	1,5	20	2
320	RP11-32N6	93759774	93953129	---	---	---	G2	4	2	20	2
321	RP11-26J9	94521408	94658595	CALM1P1	---	---	G2	3	1,5	22	2,2
144	RP11-351B17	94898285	95056380	---	---	---	G2	5	2,5	30	3
145	RP11-117G2	95313924	95482924	LOC643486	---	---	G2	5	2,5	44	4,4
146	RP11-159O24	95771245	95913073	DIAPH2	205603_s_at 205726_at 217246_s_at	138,023 179,151 100,763	G2	3	1,5	57	5,7

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
322	RP11-124M15	96084009	96248294	DIAPH2	205603_s_at 205726_at 217246_s_at	138.023 179.151 100.736	G2	5	2,5	54	5,4
323	RP11-121M23	96521879	96693261	DIAPH2	205603_s_at 205726_at 217246_s_at	138.023 179.151 100.736	G2	5	2,5	59	5,9
324	RP11-115M20	97030640	97191050	---	---	---	G2	4	2	66	6,6
325	RP11-165B19	97317693	97476010	LOC392505	---	---	G2	4	2	69	6,9
326	RP11-265I1	97602469	97765609	---	---	---	G2/R	3	1,5	74	7,4
327	RP11-343M5	98150565	98331653	---	---	---	R	3	1,5	86	8,6
328	RP11-278O10	98570440	98753474	---	---	---	R	4	2	89	8,9
329	RP11-72K7	98891162	99059263	LOC442459	---	---	R	8	4	91	9,1
147	RP11-60B3	99307757	99483337	PCDH19	---	---	R	22	11	98	9,8
184	RP11-506F15	99666517	99826760	TNMD TSPAN6 SRPX2 SYTL4	220065_at 209108_at 209109_s_at 205499_at 216465_at 216639_at ---	40.6722 277.839 430.678 256.372 84.1896 122.677 ---	R	31	15,5	98	9,8
185	RP11-261B15	100055628	100221146	XKRX dJ341D10.1 ARL13A CXorf34 TMEM35	---	---	R	31	15,5	99	9,9
330	RP11-99B8	100479270	100653935	TIMM8A BTK RPL36A GLA HNRPH2 ARMCX4	205217_at 205504_at 201406_at --- 201132_at ---	109.638 40.6722 7254.16 --- 1252.98 ---	R	40	20	94	9,4
331	RP11-165B8	101081458	101247635	---	---	---	R	39	19,5	99	9,9
186	RP11-262O8	101785694	101968179	GPRASP1 GPRASP2 BHLHB9 LOC644026 MTND2P2	204793_at --- 213709_at --- ---	110.78 --- 170.745 --- ---	R	42	21	114	11,4
148	RP11-96O8	102186293	102376558	BEX1 NXF3 BEXL1	218332_at 220110_s_at 215440_s_at	434,447 202,755 200,528	R	42	21	119	11,9
149	RP11-246J12	102620518	102790255	RAB40A TCEAL4 TCEAL3 TCEAL1	217589_at 202371_at --- 204045_at	299,781 1585,19 --- 567,873	G2	41	20,5	120	12

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
187	RP11-462K21	102989399	103181829	LOC442461 LOC644261 LOC644273 MGC39900 H2BFWT H2BFM	--- --- --- 214051_at --- ---	284.791	G	33	16,5	121	12,1
332	RP11-163C21	103349908	103513421	ESX1	---	---	R	27	13,5	115	11,5
188	RP11-262L11	104096147	104267683	IL1RAPL2	221112_at	239.273	R	14	7	128	12,8
189	RP11-259K10	104412876	104579255	IL1RAPL2 LOC643535	221112_at ---	239.273	R	9	4,5	131	13,1
190	RP11-393D6	104913910	105076568	NRK	---	---	R	10	5	129	12,9
191	RP11-155N17	105266064	105423890	MUM1L1	---	---	R	17	8,5	120	12
192	RP11-150F24	105752194	105922003	FLJ10178 RNF128	215803_at 219355_at 219263_at	109.804 47.7766 94.7277	R	24	12	108	10,8
193	RP11-313A11	106081966	106266689	MORC4 FLJ11016 FLJ20130 LOC644563	219038_at 219754_at 220520_s_at ---	282.814 75.1112 65.1136	R	22	11	107	10,7
194	RP11-452M1	106431592	106604885	LOC644580 LOC644588 LOC392516	--- --- ---	---	R	24	12	103	10,3
195	RP11-23E23	107022485	107186400	MID2 NOD13 TEX13B VSIG1	208384_s_at --- 221034_s_at ---	563.724 285.755	R	21	10,5	95	9,5
196	RP11-71N20	107278404	107443003	ATG4A COL4A6	213115_at 210945_at 211473_s_at 213992_at	221.026 100.695 244.981 91.3753	R	18	9	93	9,3
197	RP11-105F23	107894782	108039097	---	---	---	R	17	8,5	82	8,2
198	RP11-343I21	108140759	108335615	---	---	---	R	15	7,5	73	7,3
199	RP11-106O18	108454994	108628666	LOC644728 GUCY2F	--- 208053_at	101.995	R	16	8	68	6,8
200	RP11-349A16	108957587	109167251	LOC392520 RP13-360B22.2	--- 220486_x_at	370.845	R	16	8	70	7
201	RP11-195C22	109408044	109580741	AMMECR1 GNG5ps RGAG1	204976_s_at --- ---	308.84	R	19	9,5	75	7,5
202	RP11-158N23	109662386	109825851	CHRD1	209763_at	53.3037	R	17	8,5	74	7,4
203	RP11-23D15	110098230	110280586	LOC644830 PAK3	--- 214078_at 214607_at	40.6722 183.601	R	17	8,5	94	9,4

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
204	RP11-111F16	110576999	110744373	---	---	---	G	14	7	94	9,4
205	RP11-106I16	110947385	111115213	TRPC5	220552_at	40.6722	G	15	7,5	95	9,5
206	RP11-416K16	111746309	111897947	LHFPL1 LOC203510	---	---	G	11	5,5	81	8,1
207	RP11-230L7	112059287	112215986	---	---	---	G	9	4,5	80	8
208	RP11-468C24	112475299	112655004	LOC139466	---	---	G	7	3,5	77	7,7
209	RP11-358L8	112911280	113099852	---	---	---	G	6	3	79	7,9
210	RP11-155O22	113446575	113611678	LOC286528	---	---	G	11	5,5	88	8,8
211	RP11-111B4	113741759	113904485	LOC653062 HTR2C	---	---	G	10	5	89	8,9
212	RP11-420H18	114109580	114281569	IL13RA2 LOC642307 LRCH2 TMSL7	206172_at ---	373.556 ---	G	32	16	97	9,7
213	RP11-268A15	114556505	114709176	PLS3	201215_at	2529.25	G	34	17	100	10
214	RP11-107O11	114940147	115131238	LOC642776 LOC392525	---	---	G	35	17,5	104	10,4
215	RP11-105E16	115319238	115462461	---	---	---	G	29	14,5	113	11,3
216	RP11-19P23	116142477	116306438	---	---	---	G	9	4,5	108	10,8
217	RP11-89N19	116594468	116741334	LOC642903	---	---	G	7	3,5	104	10,4
218	RP11-351E4	117529257	117736911	DOCK11	---	---	R	21	10,5	106	10,6
219	RP11-99A13	117726585	117877505	IL13RA1 ZCCHC12 LOC401616	201887_at 201888_s_at 210904_s_at 211612_s_at ---	958.931 471.2 452.594 388.943 ---	R	23	11,5	104	10,4
220	RP11-22P2	118034087	118191840	LONRF3 LOC643000 KIAA1210	220009_at ---	157.625 ---	R	31	15,5	107	10,7
333	RP11-5A17	118830080	118830850	---	---	---	R	39	19,5	106	10,6
221	RP11-42G22	118969224	119136295	LOC643134 LOC643158 LOC653221 OTEX	---	---	R	40	20	108	10,8
222	RP11-423F7	119341086	119490436	ATP1B4 LAMP2	220556_at 200821_at 203041_s_at 203042_at	40.6722 530.735 1145.11 811.805	R	44	22	103	10,3

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
223	RP11-52A16	119464844	119638951	LAMP2 RNU7P1 RNU7P2 CUL4B MCTS1	200821_at 203041_s_at 203042_at --- --- 202213_s_at 202214_s_at 210257_x_at 215997_s_at 218163_at	530.735 1145.11 811.805 684.234 1419.83 448.135 272.346 1437.29	R	42	21	102	10,2
224	RP11-52A2	120061559	120211852	LOC158714	---	---	R	29	14,5	82	8,2
225	RP11-481F18	120516795	120685955	---	---	---	R	18	9	81	8,1
226	RP11-177N8	120864226	121048356	---	---	---	G	13	6,5	79	7,9
227	RP11-112G15	121311855	121494941	---	---	---	G	3	1,5	80	8
228	RP11-235J12	121782758	121957276	---	---	---	G	6	3	79	7,9
229	RP11-121P4	122408416	122567612	GRIA3 LOC643508 LOC402422	206730_at 208032_s_at 217565_at --- ---	127.279 63.7357 52.2945 ---	G	11	5,5	79	7,9
230	RP11-416A1	123341461	123485698	ODZ1	205728_at	884.653	G	11	5,5	68	6,8
231	RP11-162J23	123712464	123887213	ODZ1	205728_at	884.653	G	8	4	67	6,7
232	RP11-298P20	124210770	124387792	LOC392536	---	---	G	6	3	60	6
233	RP11-152E23	124479429	124634081	---	---	---	G	6	3	62	6,2
150	RP11-110F2	124936652	125116893	LOC643688	---	---	G3	7	3,5	55	5,5
234	RP11-79C15	125308025	125458401	---	---	---	G	6	3	50	5
235	RP11-47E11	125729393	125907174	---	---	---	G	5	2,5	59	5,9
236	RP11-315L22	126132688	126333393	---	---	---	G	4	2	63	6,3
237	RP11-137M24	126541789	126716249	---	---	---	G	5	2,5	65	6,5
238	RP11-229G9	126914186	127068207	ACTRT1	---	---	G	5	2,5	65	6,5
151	RP11-14N8	127834113	128003699	LOC392539	---	---	G3	12	6	62	6,2
152	RP11-460L15	128049751	128208089	---	---	---	G3	15	7,5	61	6,1
153	RP11-111E8	128701147	128864688	XPNPEP2 CXorf9 ZDHHC9	206484_s_at 216910_at 204923_at ---	94,1241 138,001 272,704 ---	G3	20	10	66	6,6
154	RP11-429L5	128701504	128888804	XPNPEP2 CXorf9 ZDHHC9 UTP14A	206484_s_at 216910_at 204923_at --- 221098_x_at	94,124 138,001 272,704 43,7502	G3	20	10	68	6,8
155	RP11-246J10	129352168	129518339	RBMX2 FAM45B LOC644066	204097_s_at 204098_at 221804_s_at ---	347,123 181,521 1208,4 ---	G3	26	13	80	8

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
156	RP11-57D8	129806400	129978978	COVA1	204643_s_at 204644_at 32042_at	92,537 94,3093 214,562	R	29	14,5	91	9,1
157	RP11-81I6	130122768	130296489	OR11Q1P IGSF1 OR11N1P	207695_s_at ---	180,799	G1	29	14,5	96	9,6
158	RP11-158M12	130519976	130655782	OR13K1P OR7L1P OR2AF1P HDGFP	--- --- --- ---	---	G1	24	12	102	10,2
159	RP11-102E5	130897809	131069451	MASK LOC90167	218499_at ---	93,6192	G1	23	11,5	105	10,5
160	RP11-62A13	131318231	131498578	MBNL3	219814_at	40,6722	G1	19	9,5	106	10,6
161	RP11-313H17	131719107	131893649	HS6ST2	---	---	G1	11	5,5	108	10,8
162	RP11-260P14	132049591	132232459	TFDP3	207385_at	403,951	G1	7	3,5	107	10,7
163	RP11-177A8	132425360	132609538	GPC3	209220_at	326,772	G1	10	5	107	10,7
164	RP11-153C19	133487245	133678817	MGC16121 PLAC1	--- 219702_at	297,181	R	25	12,5	108	10,8
165	RP11-80N13	133726094	133872483	LOC159090 RP3-473B4.1 MOSPD1	--- --- 218853_s_at	339,955	R	36	18	109	10,9
166	RP11-112L10	134057760	134228353	LOC644596 CXorf48 LOC644621 LOC389888	--- 221121_at --- ---	90,5392	R	41	20,5	105	10,5
167	RP11-432N13	134408746	134628224	DDX26B LOC653304 LOC644717	--- --- ---	---	R	42	21	99	9,9
168	RP11-55E17	134920589	135073630	SLC9A6 LOC139542 FHL1	203909_at --- 201539_s_at 201540_at 210298_x_at 210299_s_at	606,309 559,373 1948,31 775,202 635,19	R	43	21,5	101	10,1
169	RP11-164L16	135389924	135543285	BRS3 HTATSF1 VGLL1	207369_at 202601_s_at 202602_s_at 205487_s_at 215729_s_at 215730_at	139,457 452,044 847,409 141,606 40,6722 217,123	R	33	16,5	101	10,1
170	RP11-3L1	135785709	135930319	RBMX FLJ31132 LOC644874	213762_x_at --- ---	1628,38	R	22	11	99	9,9
171	RP11-136K20	136194759	136344660	---	---	---	R	15	7,5	99	9,9
172	RP11-469N8	136528889	136683718	LOC389892	---	---	R	11	5,5	98	9,8
173	RP11-466G5	136911835	137048824	---	---	---	R	8	4	98	9,8

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
174	RP11-98B14	137306018	137465589	LOC139363 LOC392552	---	---	R	7	3,5	95	9,5
175	RP11-259D9	137703029	137862882	---	---	---	G2	9	4,5	100	10
176	RP11-264A18	138147895	138330399	---	---	---	G2	12	6	97	9,7
239	RP11-35F15	138610287	138788316	BCYRN1P1 ATP11C	---	---	G	14	7	93	9,3
240	RP11-102D21	138912733	139089981	LOC643689 LOC389895	---	---	G	14	7	90	9
241	RP11-318H23	139335635	139505671	SOX3	214633_at	76.3599	G	19	8,5	80	8
242	RP11-135D17	139598035	139766320	LOC286411 LOC653568 CDR1	---	---	G	22	11	75	7,5
243	RP11-36G4	140120870	140276370	SPANXC	220217_x_at	40.6722	R	24	12	65	6,5
244	RP11-15J9	140501192	140660339	LOC653580 LOC645188 SPANXD SPANXE	---	---	R	22	11	59	5,9
177	RP11-133C8	140927078	141114288	LOC392555 LOC645226	---	---	R	19	9,5	56	5,6
245	RP11-357P12	141354638	141523051	---	---	---	R	13	6,5	54	5,4
246	RP11-179F2	141852587	142012047	SPANX-N4	---	---	R/G	10	5	54	5,4
247	RP11-133I20	142136297	142307049	---	---	---	G	6	3	55	5,5
248	RP11-29O6	142473318	142634011	MYCL3 SLITRK4 SPANX-N2	---	---	G	7	3,5	56	5,6
249	RP11-451D1	142924065	143107260	---	---	---	G	7	3,5	55	5,5
250	RP11-99J24	143442159	143607268	---	---	---	G	7	3,5	62	6,2
251	RP11-207N2	143837938	144015954	---	---	---	G	8	4	71	7,1
252	RP11-35C23	144189756	144343305	---	---	---	G	8	4	71	7,1
253	RP11-177G18	144629347	144790016	LOC642408 LOC653092 SLITRK2 CXorf1	---	---	G	8	4	73	7,3
254	RP11-430H11	145056609	145227574	---	---	---	G	8	4	71	7,1
255	RP11-366L22	145396592	145560815	LOC653103	---	---	G	7	3,5	71	7,1
256	RP11-281L8	145803597	145948506	---	---	---	G	4	2	69	6,9
257	RP11-13A15	146160270	146308300	---	---	---	G	5	2,5	69	6,9
258	RP11-37P24	146655492	146799009	---	---	---	G	7	3,5	83	8,3
259	RP11-164A8	147018577	147175850	---	---	---	R	7	3,5	91	9,1
260	RP11-55B1	147457740	147631935	AFF2	206105_at 210957_s_at 216364_s_at	528.155 88.7662 484.941	R	16	8	101	10,1
261	RP11-57P8	147785625	147940875	AFF2	206105_at 210957_s_at 216364_s_at	528.155 88.7662 484.941	R	26	13	119	11,9
262	RP11-270M21	148191975	148351719	---	---	---	R	28	14	128	12,8

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
263	RP11-413L16	149444190	149631111	MTM1 MTMR1	204101_at 36920_at 213511_s_at 214975_s_at 216095_x_at 216303_s_at	163.007 116.958 396.942 71.7638 323.501 299.607	R	29	14,5	172	17,2
264	RP11-351H6	149992222	150193075	GPR50 LOC286456	208311_at ---	377.115	R	21	10,5	174	17,4
265	RP11-161E19	150257477	150418186	LOC203547	---	---	R	22	11	174	17,4
266	RP11-316I17	150736989	150924816	MAGEA4 GABRE	214254_at 204537_s_at	40.6722 377.855	R	33	16,5	174	17,4
267	RP11-267J13	151073861	151226853	GABRA3	207210_at	52.2714	R	36	13	174	17,4
268	RP11-11G21	151620822	151789233	MAGEA6 CSAG2 CSAG3 LOC653310 LOC653297 MAGEA12 CSAG1 MAGEA2B MAGEA2 LOC643425 MAGEA3 psMAGEA CETN2 NSDHL	214612_x_at 220445_s_at --- --- --- 210467_x_at --- 214603_at 214603_at --- 209942_x_at --- 209194_at 209279_s_at 215093_at	53.4121 64.4305 --- --- --- 47.3349 --- 653.535 653.535 --- 124.585 --- 1346.81 301.173 310.705	R	50	25	174	17,4
269	RP11-76K17	151881650	151947652	ZNF185 PNMA5	203585_at ---	457.256	R	60	30	174	17,4
270	RP11-66N11	152238464	152418905	LOC139046 ZNF275 LOC643656 LOC392559 LOC139735 TREX2 UIP1 LOC389904 BGN	--- --- --- --- --- 207891_s_at 211788_s_at 213334_x_at --- 201261_x_at 201262_s_at 213905_x_at	--- --- --- --- --- 130.708 186.667 310.978 --- 5040.08 409.455 4434.79	R	72	36	174	17,4

Internal Nr.	BAC	begin	end	Genes NCBI	Affymetrix-Nr.	affymetrix	R-or G-band	2 Mb window NCBI	genes /1Mb (2Mb)	10Mb window NCBI	genes/1Mb (10Mb)
271	RP11-244I10	152599591	152759574	SLC6A8 BCAP31 ABCD1 PLXNB3 STK23 IDH3G SSR4 PDZK4	202219_at 210854_x_at 213843_x_at 215812_s_at 200837_at 205142_x_at 216418_at 205957_at 206216_at 202471_s_at 214333_x_at 201004_at ---	369.37 210.197 152.343 154.007 2568.43 554.616 171.797 174.717 172.755 1068.04 903.022 3847.24	R	88	44	174	17,4
272	RP11-115M6	153478009	153656495	CTAG1B CTAG1A LOC340600 deltaNEMO CTAG2 OR3B1P GAB3 DKC1	210546_x_at 211674_x_at 217339_x_at --- --- 207337_at 215733_x_at --- --- 201478_s_at 201479_at 216212_s_at	186.055 224.6 203.489 66.8149 217.18 592.44 882.247 214.09	R	79	39,5	174	17,4
273	RP11-30I1	153974206	154147170	BRCC3 VBP1 RAB39B	--- 201472_at ---	1477.87	R	63	31,5	174	17,4

BLAU niedrig exprimierte Bacs

ROT hoch exprimierte Bacs

GELB mittel exprimierte Bacs

GRÜN nicht definierbare Bacs

Position of clones: UCSC Genome Browser on Human May 2004 Assembly

Genes on clones: NCBI

12.2 Liste der verwendeten BACs

p- und q-Arm ganz

p-Arm					
1	16	82	50	72	105
2	19	34	53	74	107
4	76	36	55	85	178
6	24	38	58	88	179
8	26	40	61	91	112
9	77	43	63	93	114
11	29	45	65	95	117
14	31	47	68	98	118
15	80	49	70	100	119

q-Arm									
120	140	291	315	186	204	226	159	245	265
122	181	294	317	149	207	229	162	248	267
124	274	298	319	332	211	230	164	251	268
125	276	300	321	189	213	233	167	253	270
127	279	302	146	192	215	235	170	255	271
130	281	304	323	194	217	237	173	258	272
132	283	306	326	196	219	151	176	261	273
135	285	308	328	199	333	154	242	262	
138	288	312	147	202	222	155	244	264	

p- und q-Arm unterteilt

p-Arm 1			p-Arm 2		
1	16	82	50	72	105
2	19	34	53	74	107
4	76	36	55	85	178
6	24	38	58	88	179
8	26	40	61	91	112
9	77	43	63	93	114
11	29	45	65	95	117
14	31	47	68	98	118
15	80	49	70	100	119

q-Arm 1					q-Arm 2				
120	140	291	315	186	204	226	159	245	265
122	181	294	317	149	207	229	162	248	267
124	274	298	319	332	211	230	164	251	268
125	276	300	321	189	213	233	167	253	270
127	279	302	146	192	215	235	170	255	271
130	281	304	323	194	217	237	173	258	272
132	283	306	326	196	219	151	176	261	273
135	285	308	328	199	333	154	242	262	
138	288	312	147	202	222	155	244	264	

10Mb-Pools

10Mb-1	10Mb-2	10Mb-3	10Mb-4	10Mb-5	10Mb-6	10Mb-7	10Mb-8
1	16	82	50	72	105	120	140
2	19	34	53	74	107	122	181
4	76	36	55	85	178	124	274
6	24	38	58	88	179	125	276
8	26	40	61	91	112	127	279
9	77	43	63	93	114	130	281
11	29	45	65	95	117	132	283
14	31	47	68	98	118	135	285
15	80	49	70	100	119	138	288
10Mb-9	10Mb-10	10Mb-11	10Mb-12	10Mb-13	10Mb-14	10Mb-15	10Mb-16
291	315	186	204	226	159	245	265
294	317	149	207	229	162	248	267
298	319	332	211	230	164	251	268
300	321	189	213	233	167	253	270
302	146	192	215	235	170	255	271
304	323	194	217	237	173	258	272
306	326	196	219	151	176	261	273
308	328	199	333	154	242	262	
312	147	202	222	155	244	264	

2Mb-Gendichte-Pools ganzes X-Chromosom

genreich				
93	105	137	330	333
94	106	138	331	221
95	107	139	186	222
96	178	140	148	223
97	268	141	149	165
98	269	142	187	166
99	270	181	212	167
100	271	143	213	168
101	272	184	214	169
266	273	185	220	

genarm						
1	29	66	279	318	217	254
2	31	69	281	144	219	257
5	81	75	284	146	235	259
7	83	109	287	324	237	262
8	34	111	290	329	151	89
9	37	114	292	230	154	92
11	38	117	295	233	156	102
13	73	119	298	332	159	103
15	41	121	300	189	162	104
16	44	124	208	192	164	264
19	47	127	210	194	170	267
71	50	129	302	196	173	
87	54	133	306	199	176	
76	56	135	309	202	242	
24	59	225	311	204	177	
26	61	228	314	206	247	
77	63	183	316	215	251	

10Mb-Gendichte-Pools ganzes X-Chromosom

genreich		
93	106	90
94	107	91
95	178	92
96	268	102
97	269	103
98	270	104
99	271	263
100	272	264
101	273	265
266	88	267
105	89	

genarm						
1	29	66	279	318	217	254
2	31	69	281	144	219	257
5	81	75	284	146	235	259
7	83	109	287	324	237	262
8	34	111	290	329	151	138
9	37	114	292	230	154	141
11	38	117	295	233	156	143
13	73	119	298	332	159	330
15	41	121	300	189	162	186
16	44	124	208	192	164	149
19	47	127	210	194	170	184
71	50	129	302	196	173	213
87	54	133	306	199	176	333
76	56	135	309	202	242	223
24	59	225	311	204	177	
26	61	228	314	206	247	
77	63	183	316	215	251	

10Mb-Gendichte-Pools RIDGES

10Mb-Gendichte-Pools genarm Mitte und genarm tail

RIDGE Xp	RIDGE Xq
88	263
89	264
90	265
91	266
92	267
93	268
94	269
95	270
96	271
97	272
98	273
99	
100	
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	
108	
178	

"Mitte"			"tail"
105	140	315	1
107	181	317	2
178	274	319	4
179	276	321	6
112	279	146	8
114	281	323	9
117	283	326	11
118	285	328	14
119	288	147	15
120	291	186	16
122	294	149	19
124	298	332	76
125	300	189	24
127	302	192	26
130	304	194	77
132	306	196	29
135	308	199	31
138	312	202	80

RIDGE Xp-Pools

hoch exprimiert/genreich	niedrig exprimiert/genreich	niedrig exprimiert/genarm
95	96	85
	97	86
	99	87
	100	88
		89
		109
		114

Genarme Region Xq

hoch exprimiert/genarm	niedrig exprimiert/genarm
230	227
231	228
	229
	233
	234
	235

RIDGE vs. Genarme Region

hoch exprimiert/genreich	niedrig exprimiert/genreich	hoch exprimiert/genarm	niedrig exprimiert/genarm
95	93	230	227
98	94	231	228
	96		229
	97		233
	99		234
	100		235

Expressionsabhängige BAC-Pools ganzes X-Chromosom

hoch exprimiert				niedrig exprimiert				
2	65	131	168	3	69	279	198	245
4	70	132	169	7	73	282	203	250
20	71	138	170	9	89	286	207	254
21	72	330	268	12	96	291	215	259
22	95	149	270	15	99	295	216	263
25	98	213	271	16	103	299	333	266
28	105	219	272	19	108	304	225	
77	178	222	273	23	109	308	229	
30	179	223		78	114	312	233	
83	110	230		80	118	316	236	
36	125	155		33	119	320	152	
				39	180	146	157	
				43	128	324	160	
				47	134	328	164	
				52	139	331	171	
				58	181	188	176	
				64	275	193	243	

Expressionsabhängige BAC-Pools p-Arm

hoch exprimiert	niedrig exprimiert
2	3
4	6
20	9
21	12
22	23
25	42
28	47
30	50
36	53
65	55
70	60
71	66
72	73
77	80
83	84

