

# **Untersuchungen von menschlichen Zellen mit ungewöhnlicher Chromatin-Anordnung und Zellkernform**

**Der Einfluss von Chaetocin auf das Organisationsprinzip von Chromatin  
in humanen Fibroblasten**

**Untersuchungen zur Chromatin-Polarität in humanen Granulozyten**

Doris Illner



Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München, 2012

Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Cremer  
am Institut für Anthropologie und Humangenetik  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Cremer  
Zweitgutachter: PD Dr. Steffen Dietzel

Tag der Abgabe: 24.04.2012  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2012

### **ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass meine Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 24.04.2012

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1 Die Zellkernarchitektur.....	5
1.1.1 Das Chromosom.....	5
1.1.2 Das Chromosomen-Territorium.....	7
1.1.3 DNS-Sequenzgruppen.....	8
1.1.4 Kompaktierung von Chromatin.....	9
1.1.5 Verteilung von Eu- und Heterochromatin in Kernen verschiedener Zelltypen.....	13
1.1.6 Der Zellkern von Granulozyten .....	15
1.1.7 Ursachen verschiedener Zellkernformen.....	17
1.1.8 Das Chromosomen-Territorium-Interchromatin-Kompartiment-Modell .....	17
1.1.9 Funktionelle radiale Zonen des Zellkerns.....	19
1.1.10 Chromatin im Zellkern und ihre Organisations-Prinzipien.....	20
1.2 Das Zytoskelett des Zellkerns.....	26
1.3 Regulation der Transkription.....	27
1.3.1 Die Ebene der Gene .....	27
1.3.2 Epigenetische Regulatoren.....	27
1.3.3 Histonmodifikationen.....	28
1.3.4 DNS-Modifikationen.....	28
1.3.5 sRNA – Modulatoren der Genexpression.....	29
1.4 Chromatin-Kondensation .....	30
1.5 Zelluläre Seneszenz in Säugerzellen ( <i>in vitro</i> ).....	31
1.5.1 Formen der Seneszenz.....	31
1.5.2 Intrinsische und extrinsische Ursachen der Seneszenz .....	32
1.5.3 Die Seneszenz im Kontext der Evolution .....	33
1.5.4 Merkmale von replikativer Seneszenz <i>in vitro</i> .....	34
1.5.5 Signalwege der Seneszenz.....	34
1.6 Chaetocin - ein historischer Überblick.....	36
1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit .....	39
<b>2 MATERIAL UND METODEN .....</b>	<b>41</b>
2.2 Medien, Puffer und Lösungen.....	44
2.3 Geräte, optische Ausrüstung und sonstige Hilfsmittel .....	45
2.4 Zellkultur.....	49
2.4.1 verwendete Zelltypen.....	49
2.4.1.1 Humane Lymphozyten (HLy) .....	49
2.4.1.2 Humane Granulozyten .....	50
2.4.1.3 Humane Fibroblasten (HFb).....	52
2.4.1.4 Zellfixierung .....	52
2.4.2 Chaetocin Behandlung.....	54
2.4.3 Antioxidanzien und spezifische Enzym-Inhibitoren.....	54
2.4.4 Induktion von Seneszenz .....	54
2.4.5 Induktion von Apoptose .....	54
2.4.5 Zellbasierte Assay .....	55
2.4.5.1 $\beta$ -Galactosidase Assay .....	55
2.4.5.2 Vitalitätstest durch eine 7-AAD-Lebendfärbung.....	56
2.4.5.3 Visualisierung von neu gebildeter RNS .....	57
2.4.6 S-Phasen Nachweis.....	57
2.4.7 Immunfluoreszenz .....	57
2.5 Isolation von Proteinen .....	58
2.6 Zellpräparation für die Fluoreszenz- <i>In-Situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	59
2.6.1 Chromosomenpräparation für die 2-D-in-situ-Hybridisierung.....	59
2.6.2 Präparate für die 3D- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	61
2.7 DNS-Sonden für die Fluoreszenz- <i>in-Situ</i> -Hybridisierung .....	63
2.7.1 Amplifikation der BAC-DNS über GenomiPhi (Whole Genome Amplification) .....	63
2.7.2 Markierung der DNS über Nick-Translation.....	63
2.7.3 Markierung der Paint-Sonden durch DOP-PCR .....	64

2.7.4 Markierung von <i>Alu</i> -Sequenzen durch Primern.....	66
2.7.5 Ethanol-fällung der DNS für FISH .....	68
2.7.6 Chromosomen in situ Suppressions-Hybridisierung (CISS) .....	69
2.8 2D-FISH .....	70
2.9 3D-FISH .....	72
2.10 Mikroskopie .....	73
2.10.1 Phasenkontrasmikroskopie .....	73
2.10.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie .....	74
2.10.3 konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	75
2.11 Software für die Bildverarbeitung .....	76
2.11.1 ImageJ.....	76
2.11.2 Adobe Photoshop 7.0 .....	77
2.11.3 Amira .....	77
2.12 Quantitative Auswertungsmethoden .....	78
2.12.1 Auswertung mit ADS (absolute distances to surface) EDMT v.1.07a .....	78
2.12.2 Auswertung mit Distangles.....	79
2.13 quantitative Auswertung und Statistik .....	79
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>81</b>
3.1 Zusammensetzungen der DNS-Sonden .....	81
3.1.1 BAC-Sonden für das Chromosom 1 .....	81
3.1.2 BAC-Sonden für das Chromosom 12.....	81
3.1.3 BAC-Sonden für das X-Chromosom .....	82
<b>CHAETOCIN EXPERIMENTE.....</b>	<b>84</b>
3.2 Chaetocin-induzierte Chromatin-Reorganisation der Zellkernarchitektur.....	84
<b>CHAETOCIN Teil I.....</b>	<b>84</b>
3.2.1 CICC-Induktion .....	84
3.2.2 Volumen des Chromatins.....	86
3.2.3 Abgrenzung zur Apoptose.....	87
3.3 Sensitivitäten verschiedener Zelllinien .....	90
3.4 Zellzyklusanalyse .....	92
3.4.1 CICC-Frequenz.....	92
3.4.2 Immunfluoreszenz-Markierung von pKi67, H3pS10 und BrdU .....	94
3.5 Löst Chaetocin oxidativen Stress aus? .....	96
3.5.1 Testung von Antioxidanzien und Enzym-Inhibitoren.....	96
3.5.2 DCF-Färbung.....	97
3.6 Seneszenz-Marker .....	98
3.6.1 Zytoplasma-Organisation .....	98
3.6.2 Lipofuchsin .....	99
3.6.3 p53-Markierung.....	100
3.6.4 Western-Blot von p16, p21 und p53.....	102
3.6.5 SA- $\beta$ -Galaktosidase.....	102
<b>CHAETOCIN Teil II.....</b>	<b>108</b>
3.7 funktionelle Zonen des Zellkerns .....	108
3.7.1 Ein CICC entspricht einem Chromosomen-Territorium .....	108
3.7.2 Radiale Verteilung von neu gebildeter RNS und H4K8ac.....	110
3.7.3 Radiale Verteilung von Pol II, SC35 und H3K9me3 .....	111
3.7.4 Radiale Verteilung von SC35 und H3K27me3.....	112
3.7.5 Radiale Verteilung der Chromatin-Textur von H4K8ac und H3K9me3 .....	114
3.7.6 Radiale Verteilung von Zentromeren und Telomeren.....	115

3.8 3D-FISH-Experimente .....	118
3.8.1 Verteilung der Chromsomen 18, 19 und <i>Alu</i> -Sequenzen .....	118
3.8.2 Verteilung von Xp11 und Xq25 .....	122
3.8.3 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 1 .....	125
3.8.3 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 .....	130
<b>Humane Granulozyten - Untersuchungen zur Chromatin-Organisation .....</b>	<b>137</b>
4.1 pKi67- und neu gebildete RNS-Färbung .....	137
4.2 Untersuchung der DAPI-freien Räume .....	140
4.2.1 DAPI vs. H4K8ac .....	140
4.2.2 DAPI- vs. 7AAD-Färbung .....	143
4.3 3D-FISH-Experimente .....	144
4.3.1 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 1 .....	145
4.3.2 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 12 .....	148
4.4 Radiale Organisation des Drumsticks .....	150
4.4.1 Drumstick-Frequenz und die Verteilung der X-Chromosomen .....	150
4.4.2 3D-FISH Experimente .....	151
4.4.3 3D-Topologie der BAC-Pools P1, P2, P3, P4 .....	152
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>167</b>
Teil I: Der Einfluss von Chaetocin auf das Organisationsprinzip von .....	167
Chromatin in humanen Fibroblasten .....	167
Der ClCC Phänotyp assoziiert mit der Zellkernarchitektur .....	172
Teil II - Untersuchungen zur Chromatin-Organisation .....	177
in humanen Granulozyten .....	177
<b>AUSBLICK .....</b>	<b>182</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>185</b>
1. Chaetocin-induzierte Veränderungen der Zellkernarchitektur .....	185
2. Chromatin-Organisation in humanen Granulozyten .....	186
<b>ANHANG .....</b>	<b>188</b>
Interne BAC-Liste des X-Chromosoms .....	188
Verwendete Zell-Linien .....	190
Beispiel für eine eADS-Parametadatei .....	192
Beispiel für eine Distangles-Parametadatei .....	193
Abbildungsverzeichnis: .....	194
Front cover Chromosome Research .....	198
Chromatin-Kondensation in humanen Fibroblasten .....	199
Literaturverzeichnis .....	200
Danksagung .....	212
<b>Publikationen .....</b>	<b>213</b>

## Häufig verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BAC	Bacterial artificial Chromosome
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
3D-FISH	3-dimensionale fluorszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
2D-FISH	2-dimensionale fluorszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
CICC	Chaetocin induced chromatin clustering / condensation
CT	Chromosomen Territorium
CT-IC	Chromosome territory – Interchromatin Kompartment
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DCF	2,7-dichlorodihydro fluorescein deacetate
Dig	Digoxigenin
DNS	Deoxyribonuklein Säure
H3pS10	Histon H3 phosphoryliert am Serin 10
H3K9m3	Histon H3 trymethyliert am Lysin 9
H3K27m3	Histon H3 trymethyliert am Lysin 27
H4K8ac	Histon H4 acetyliert am Lysin 8
HTM	Histon Methyltransferase
IC	Interchromatin space
IF	Immunofluoreszenz
Kb	Kilobasen
LM	Licht Mikroskopie
LSM	Laser Scanning Mikroskop
NT	Nicktranslation
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCC	premature chromosome condensation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Para-Formealdehyd
PD	Populations-Verdopplung
PR	Perichromatin Region
ROS	reactive oxygene species
rpm	rounds per minute
RNase	Ribonuclease
SAHF	Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci
Xa	aktives X-Chromosom
Xi	inaktives X-Chromosom

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Zellkernarchitektur

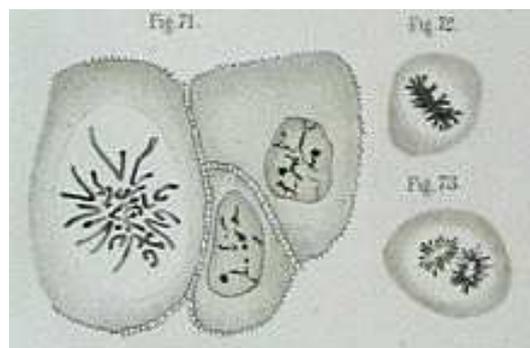
Die Zellkernarchitektur beschäftigt sich mit der Frage, wie die Zellkernorganisation die Genexpression beeinflusst. Hierbei untersucht sie die Substrukturen des Zellkerns, d. h. die Lage und Zusammensetzung von Zellkern-Kompartimenten, die räumliche Anordnung von Chromosomenterritorien, das interchromosomale Kanalnetzwerk, den RNS-Metabolismus, die subchromosomalen Regionen, die Verteilung von Chromatinschleifen im Zellkern und den Einfluss verschiedener Fixierungsmethoden auf das Chromatin.

Die Zellkernarchitektur beschäftigt sich mit der Frage, wie das lineare DNS-Molekül räumlich im Zellkern angeordnet und verteilt ist. Ein diploider Zellkern eines Menschen enthält einen fast 2m langen DNS-Faden und einen 4m langen in Zellkernen nach der S-Phase (Lewin, 1998); dieser muss in einem 10µm langen Zellkern Platz haben, was leicht möglich ist.

Daher muss die DNS-Sequenz in hoch kondensierter Form im Zellkern verpackt werden. Die Lage der Chromosomen im Interphasekern und die Kompaktierung eines Chromosoms in der Metaphase weist auf einen sehr hohen Organisationsgrad hin, der weiterhin noch viele Fragen offen lässt (siehe Kapitel 1.1.4). In der folgenden Einleitung soll ein Überblick über die im Moment gültigen Vorstellungen zur Zellkernarchitektur gegeben werden.

### 1.1.1 Das Chromosom

Das Wort Chromosom kommt von altgriechisch χρώμα *chrōma* (=Farbe) σῶμα *sōma* (=Körper) und bedeutet wörtlich Farbkörper. 1882 entdeckte Flemming färbare Substanzen im Zellkern und führte den Begriff Chromatin ein.



**Abb. 1: humane Chromosomen der Augenhornhaut**  
Die Abbildung 1 zeigt die vermutlich älteste Darstellung humaner Chromosomen der Augenhornhaut von Walther Flemming 1882.

In lebenden Zellen sind Chromosomen während der Mitose im Phasenkontrastmikroskop sichtbar. Zunächst war nicht klar, ob sich die Chromosomen während der Interphase

auflösen und sich in der Mitose neu bilden oder ob sie als Einheit (Chromosomenterritorien) den Zellzyklus überdauern.

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte Carl Rabl eine Konstanz der Chromosomenzahl in verschiedenen Mitosen eines Gewebes und schloss daraus, dass die Chromosomen kontinuierlich, als strukturelle Einheit erhalten bleiben und distinkte Territorien einnehmen (Cremer, 1985). Er nahm an, dass jedes Chromosom im Interphasekern ein eigenes Chromosomen-Territorium bildet und entwickelte daraus die Lehre der Chromosomenkontinuität.

1921 publizierte Theophilus S. Painter, dass der menschliche Chromosomensatz 48 Chromosomen enthält. Erst 1956 konnte durch Joe Hin Tijo und Albert Levan der korrekte Chromosomensatz ermittelt werden. Dies wurde durch die Behandlung der Zellen mit Colchizin und hypotonen Schocks ermöglicht. Weitere historische Details können bei Cremer und Cremer (2010) und Gartler (2006) nachgelesen werden.

Die Chromosomen innerhalb eines Organismus' und zwischen Organismen einer Art unterscheiden sich nicht. Jedoch gibt es zwischen den Arten eine hohe Variabilität der Chromosomen in der Anzahl, der Form und dem DNS-Gehalt (Gregory, 2005a; Gregory et al., 2007). Der unterschiedliche DNS-Gehalt resultiert überwiegend aus der unterschiedlichen Menge an repetitiven DNS-Sequenzen.

Die Anzahl der Chromosomen pro Zellkern ist für jeden Organismus charakteristisch. Angehörige einer Art haben dieselbe Anzahl von Chromosomen. Die Anzahl der Chromosomen sagt jedoch nichts über die Größe des Organismus aus.

Der Mensch besitzt 46 Chromosomen, 23 von der Mutter und 23 vom Vater. Diese verteilen sich auf 22 Autosomenpaare und ein Gonosomenpaar.

Die Anzahl der Chromosomen kann sich zwischen verschiedenen Arten beträchtlich unterscheiden, sagt jedoch nichts über deren Entwicklungsgrad<sup>1</sup> aus. So besitzt Euglenia 200 Chromosomen, die Natternzunge 480 Chromosomen, das Neunauge (*Petromyzontidae*) 174 Chromosomen, die Steckmücke (*Lulex*) 6 Chromosomen und der Spulwurm (*Ascaris megalocephala var. univales*) nur zwei Chromosomen (Flindt, 2000). Auch innerhalb einer Art kann die Chromosomenzahl variieren: so findet man bei Pflanzen Euplodien, das heißt Veränderungen des ganzen Chromosomensatzes. Dabei besitzt der Wildtyp immer  $2n$  und die domestizierte Pflanze einen bis zu 16-fachen Chromosomensatz. Bei der Rose besitzt der Wildtyp 7 Chromosomen und es sind Formen mit 14, 28, 56, 70, 84, und 112 Chromosomen bekannt (Linder Biologie 2010; Flindt, 2000).

---

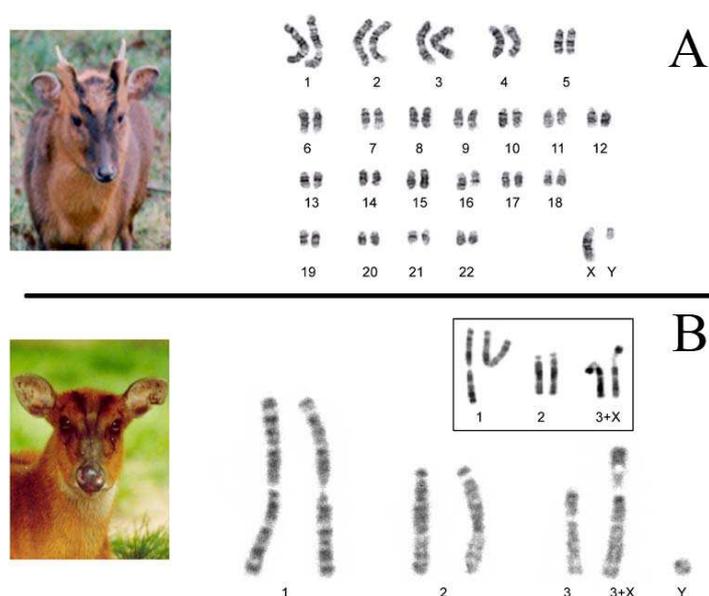
<sup>1</sup> Stand innerhalb eines Evolutionsstammbaumes

Während der Evolution der Genome von Säugetieren kam es häufig zur Umstrukturierung der Chromosomen, wobei die Chromosomenevolution unabhängig vom Phänotyp geschehen kann. Ein Beispiel hierfür ist der chinesische und der indische Muntjak.

*Muntiacus reevesi* und *Muntiacus muntjak* sind eng miteinander verwandt. Beide Muntjak-Arten besitzen ein ähnlich großes Genom, haben die gleiche Proteinausstattung und besitzen einen ähnlichen Phänotyp. Ihr Karyotyp ist jedoch unterschiedlich.

Das Genom des chinesischen Muntjaks ist auf  $2n=46$  Chromosomen verteilt.

Aufgrund von zahlreichen Fusionen besitzt der indische Muntjak  $2n=7$  (♂) bzw.  $2n=6$  (♀) Chromosomen. Wie aus dem Karyogramm zu entnehmen ist, ist das X-Chromosom mit einem Autosom fusioniert (Scheuermann et al., 2005).



**Abb. 2: Muntjak-Karyogramme**

Die Abbildung 2 wurde von Scheuermann et al. 2005 übernommen.

A: Karyogramm chinesischer Muntjaks

B: Karyogramm des indischen Muntjaks

### 1.1.2 Das Chromosomen-Territorium

Die Chromosomen nehmen während der Interphase distinkte Bereiche im Zellkern ein.

Bereits 1885 wurde von Carl Rabl und 1909 von Theodor Boveri die Existenz von Chromosomen-Territorien (CT) vorgeschlagen. Demnach nehmen Chromosomen in der Interphase voneinander abgegrenzte „Chromatinmassen“ ein (Cremer, 1985; Lichter et al., 1988; Schardin et al., 1985).

1985 gelang mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Nachweis von Chromosomen-Territorien (Manuelidis, 1985, Schardin et al., 1985). 2005 ist es gelungen, alle 24 menschlichen Chromosomen durch kombinatorische Markierung mit sieben verschiedenen Fluorochromen in einem Zellkern darzustellen (Bolzer et al., 2005).

Auch größere Chromosomenabschnitte wie ein Chromosomenarm oder Chromosomenbanden belegen eigene, distinkte Domänen innerhalb ihres Territoriums (Dietzel et al., 1998; Visser and Aten, 1999; Volpi et al., 2000). Mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die DNS nicht wie ein ungeordnetes „Wollknäuel“ im Zellkern liegt.

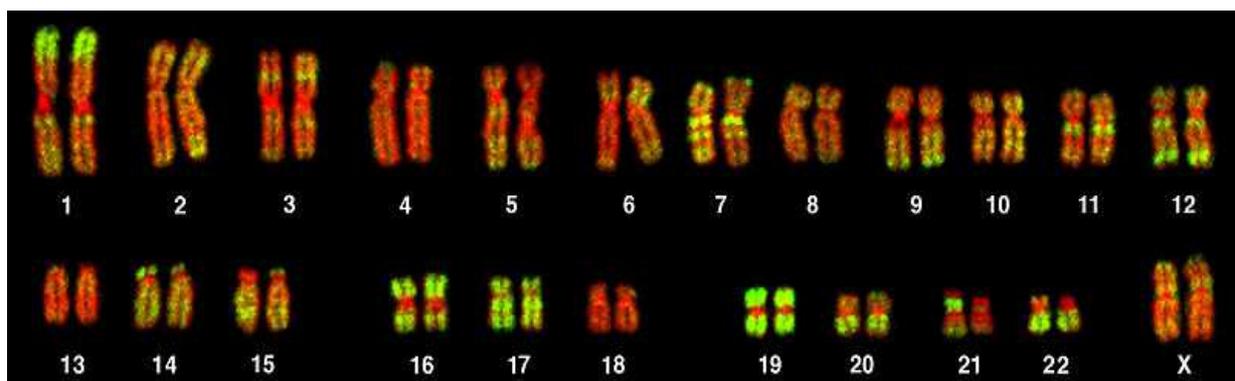
### 1.1.3 DNS-Sequenzgruppen

Bei Eukaryonten besteht das Genom zum größten Teil aus DNS, die nicht für Proteine kodiert. Ein großer Teil davon sind repetitive DNS-Sequenzen. Sie setzt sich aus drei verschiedenen Sequenzgruppen zusammen:

der hochrepetitiven, mittelrepetitiven und nichtrepetitiven DNS (Makalowski, 2003).

Zu den hochrepetitiven Sequenzen gehören die SINEs (short interspersed nuclear elements) und die Satelliten-DNS. Die SINEs sind DNS-Sequenzen von 100-400 Basenpaaren, die *Alu*-Sequenzen sind durchschnittlich 300 Basenpaare lang. Sie befinden sich in genreichen Regionen (R-Banden) und machen über 10% des menschlichen Genoms aus.

Satelliten-DNS ist 5-10 Nukleotide lang (z.B. AAAGG), wiederholt sich tausend- oder millionenfach und kommt im Heterochromatin, an den Enden von Chromosomen und im Zentromer vor. Zu den mittelrepetitiven Sequenzen gehören die LINEs (long interspersed nuclear elements). Sie bestehen aus 4500-6000 Basenpaaren und machen 21% des Gesamtgenoms aus. Sie befinden sich vor allem im Heterochromatin, in AT-reichen, genarmen, Gimsa positiven Regionen (G-Banden). LINEs werden in die drei Gruppen LINE-1, LINE-2 und LINE-3 unterteilt. (Dewannieux and Heidmann, 2005; Sellis et al., 2007).



**Abb. 3: *Alu*-Sequenzen in einer weiblichen, humanen Metaphase**  
Diese Abbildung wurde von Bolzer 2005 übernommen.

Sie zeigt die Verteilung von *Alu*-Sequenzen in einer humanen, weiblichen Metaphase. Die *Alu*-Sequenzen (genreiche Regionen) sind in grün dargestellt, die DNS wurde mit DAPI gegengefärbt und ist in rot dargestellt.

*Alu*-Sequenzen gehören zur Klasse der SINEs, diese sind nicht zufällig oder gleichmäßig im Genom verteilt, sondern sie reichern sich in genreichen Regionen an, daher dienen sie zur globalen Darstellung von genreichen Chromatinabschnitten. Das Chromosom 19 ist sehr

genreich (20 Gene/Mbp) und besitzt die meisten *Alu*-Sequenzen, wohingegen das genarme Chromosom 18 kaum *Alu*-Sequenzen enthält.

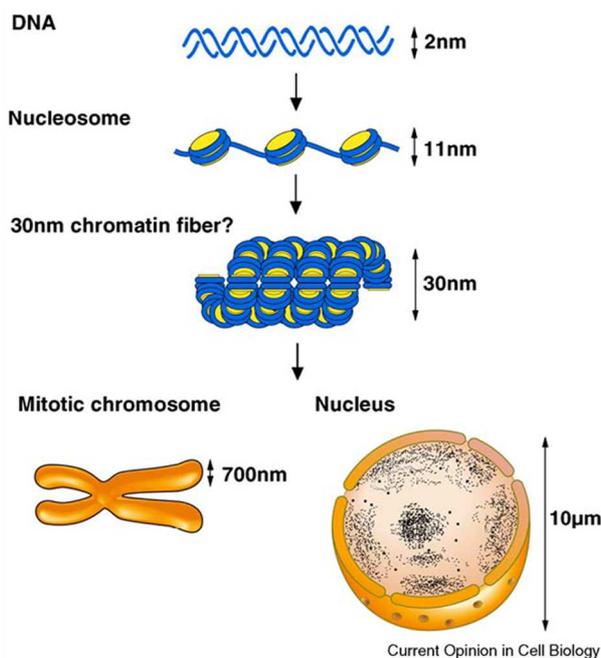
#### 1.1.4 Kompaktierung von Chromatin

Das humane Genom besitzt in einem diploiden, somatischen Zellkern während der G1-Phase 6,4 Milliarden Basenpaare; diese sind auf 46 Chromosomen (22 Autosomenpaare + XX oder XY) verteilt. Wird davon ausgegangen, dass die Länge eines Basenpaars 0,34nm beträgt, würde die DNS-Gesamtlänge 2m ergeben (Wakelin et al., 1984).

Pro Chromatid ergibt dies im Schnitt eine Länge von 4,5cm. Nach der S-Phase bestehen die Chromosomen aus zwei Chromatiden mit einem DNS-Gehalt von 12,8 Milliarden Basenpaaren und einer Gesamtlänge von etwa 4m.

Ein Interphasekern hat jedoch nur einen Durchmesser von 5µm-10µm. Um die DNS in den Zellkern zu bekommen, muss der DNS-Faden stark gefaltet werden. Dies wird hier meist Kompaktierung genannt, doch ist dabei zu bedenken, dass selbst das Volumen eines extrem dicht gepackten DNS-Fadens von 4m Länge nur etwa 40% des Kernvolumens einnehmen würde. Eine wichtige Rolle bei der Kompaktierung der DNS spielen basische Strukturproteine. DNS-Kompaktierung ist notwendig, um die DNS, d.h. den korrekten Satz an Chromosomen, erfolgreich an die Tochterzelle weiterzugeben.

Das Metaphasechromosom ist um den Faktor 1:10.000 verkürzt, dies weist auf ein sehr hierarchisches Ordnungsprinzip hin.



**Abb. 4: Modell der Chromatinfaltung**

Die Abbildung 4 wurde von Maeshima et al. 2010 übernommen.

Die Abbildung 4 zeigt ein Modell der Chromatinfaltung. Die DNS hat einen Durchmesser von 2nm und ist um ein Histon-Oktamer gewickelt, das aus den Proteinen H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Dadurch entsteht ein Nukleosom, welches einen Durchmesser von 11nm hat. Mehr als 40 Jahre lang wurde davon ausgegangen, dass die nächsthöhere Organisationsform die 30nm Fiber ist. Das obige Modell zeigt ein one-start Helix-(solenoid)Modell, das sich in einem Metaphasechromosom und im Interphasezellkern weiter organisiert (Maeshima et al., 2010). Die DNS-Kompaktierung eines Chromosoms ist organisiert und geschieht stufenweise. Den kleinsten Organisationsgrad stellt die Doppelhelix dar. Sie hat einen Durchmesser von 2nm. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen ist die DNS nicht in der Lage sich selbst in sich zu falten.

### **Die 10nm-Fibrille:**

Die eukaryontische DNS ist in Form von Nukleosomen organisiert (Kornberg, 1974; Kornberg and Lorch, 1999). Ein Nukleosom besteht aus acht Histonen und der DNS. Die Struktur des Nukleosoms ist seit mehr als 20 Jahren bekannt und durch Luger et al. detailliert analysiert (Luger et al., 1997). Es können vier Typen von Histonen unterschieden werden (H2A, H2B, H3 und H4). Sie sind stark basische, d.h. positiv geladene Proteine. Die positive Ladung entsteht durch die Anreicherung von Lysin- und Arginin-Resten. Dadurch kann die negative Ladung der Phosphatgruppen der DNS zum Teil kompensiert und gebunden werden. Durch die Bindung der DNS an ein Histon-Oktamer entsteht ein Nukleosom. Es wickeln sich 147 Basenpaare mit 1,7 Linkswindungen um ein Oktamer. Zwischen den Oktameren verbleiben 20 bis 60 Basenpaare. Durch die Bildung eines Nukleosoms wird die DNS um den Faktor 7 verkürzt. 1974 konnten Ada und Donald Olins mit Hilfe der Elektronenmikroskopie „*Beads-on-a-String*“, d.h. Protein-Perlen auf einem DNS-Faden aufnehmen und dadurch die Ergebnisse der Biochemie und die daraus resultierenden Annahmen über die 10nm-Fibrille bestätigen (Olins and Olins, 1974).

### **25-30nm-Fibrille:**

Einen weiteren Beitrag zur Faltung von Chromatin liefert das Histon H1. Es ist ebenfalls positiv geladen und liefert einen weiteren Beitrag dazu, die negative Ladung der DNS zu neutralisieren (Strick et al., 2001). H1 bindet mit seinem globulären Mittelteil an der Linker-DNS und erlaubt die nächsthöhere Verpackungseinheit der DNS. H1 spielt eine wichtige Rolle in der Transkription, da es phosphoryliert und ADP-ribosyliert werden kann.

Das Histon H1 ist in inaktivem Chromatin vorhanden, jedoch nicht bzw. fast nicht in transkriptionsaktivem Chromatin. Ein Gen-Knockout von drei der sechs H1-Gene ist bereits in der embryonalen Entwicklung letal (Fan et al., 2005).

Derzeit werden zwei verschiedene Strukturmodelle der 30nm-Fiber diskutiert.

#### 1.1.4.1 Das „eingängige“ Helix-Modell (one-start Helix)

Es wurde 1976 von Finch und Klug begründet und in den folgenden Jahren weiter untersucht (Finch and Klug, 1976; Finch et al., 1977; Widom and Klug, 1985). In diesem Modell kontaktiert die Linker-DNS derselben Helix immer das nachfolgende Nukleosom.

Ein bekanntes Beispiel dafür ist das Solenoid-Modell, in dem sich sechs bis acht Nukleosomen um einen Hohlraum anordnen. Diese Struktur wird auch heute noch durch eine "single molecule" Spectroscopie unterstützt (Kruithof et al., 2009; Rhodes and Klug, 1980).

#### 1.1.4.2 Das „zweigängige“ Helix-Modell (two-start Helix)

Dieses Modell basiert auf der Beobachtung einer Zick-Zack-Anordnung der Nukleosomen.

Die Linker-DNS kontaktiert jedes zweite Nukleosom in einer linearen Helix-Abfolge (crossed-linker). Die alternierenden Nukleosomen stehen sich in diesem Modell gegenüber.

Das zweigängige Helix-Modell wird in zwei Klassen unterteilt: in das Robbon-Modell, auch supercoiled genannt (Woodcock and Frank, 1984; Worcel et al., 1981) und in das Crossed-Linker-Modell, auch two start twist genannt (Williams et al., 1986). Auch Richmond et al. können das zweigängige Zick-Zack-Modell durch Nukleosomen Arrays (Dorigo et al., 2004) bestätigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass one-start solenoid und two-start Zick-Zack-Anordnung unter verschiedenen Bedingungen in der gleichen Chromatin-Fiber vorhanden sind (Grigoryev et al., 2009).

#### 1.1.4.3 Ursachen der unterschiedlichen Kompaktierung von Chromatin

Woraus resultieren die Unterschiede zwischen dem eingängigen und zweigängigen Helix-Modell? Der Grad der Kompaktierung hängt von vielen Faktoren ab. Diese sind die Ionenkonzentration, Histonmodifikationen, die Länge der Linker-DNS und die Zusammensetzung des AT- bzw. GC-Gehaltes.

Unter physiologischen Bedingungen, d.h. 150mM NaCl und 1-5mM  $Mg^{2+}$  formatiert sich eine 11nm Fiber *in vitro* zu einer 30nm Fiber, auch dann, wenn kein H1 vorhanden ist. Eine niedrige Salzkonzentration führt hingegen zu einem aufgelockerten Chromatin (Finch and Klug, 1976; Gerchman and Ramakrishnan, 1987; Hansen, 2002).

Rhodes et al. konnten zeigen, dass die Unterschiede in der 30nm-Fiber durch das Linker-Histon und durch *nucleosome repeat length* (NRLs) beeinflusst werden (Routh et al., 2008). Eine lange NRL (=197bp) und H1 führen zu einer starken Kompaktierung, d.h. zu einer 30nm Fiber. Eine kurze NRL (=167bp) und H1 führen zu einer 21nm Fiber.

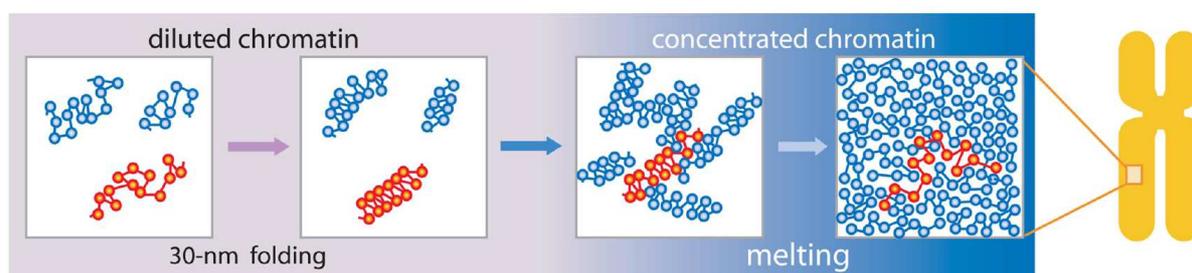
Dekker konnte mit der 3C-Methode in Hefe zeigen, dass die Kompaktierung von Chromatin vom AT-GC Gehalt abhängig ist. In aktiven, GC-reichen Chromatindomänen existiert keine

30nm-Fiber, vielmehr kommen die Nukleosomen in einem ziemlich lockeren Arrangement vor (Dekker, 2008).

Die Diskussion über die Organisation der 30nm Fibrille ist und bleibt kontrovers (Robinson and Rhodes, 2006). Die Existenz der 30nm Fiber ist Lehrbuch-Wissen und wird von angesehenen und hochrangigen Biologie- (Alberts, 2011) und Genetikbüchern (Graw, 2010) weiter in die wissenschaftliche Fachwelt hineingetragen, obwohl ihre Existenz in den letzten Jahren durch zahlreiche, wissenschaftliche Beiträge in Frage gestellt wird (siehe folgendes Kapitel).

#### 1.1.4.4 Das Polymer-melt Konzept

Zahlreiche Wissenschaftler kommen zu dem Ergebnis, dass es *in vivo* keine 30nm Fiber gibt (Eltsov et al., 2008). Sie sind allesamt Anhänger des Polymer-melt Konzepts. Dieses Modell kommt ursprünglich aus der Physik und beschreibt dynamische Polymer-Ketten, die sich konstant bewegen und rearrangieren (Gennes, 1979). Die Polymer-Physik kann auf die Chromatinfibern und deren Organisation übertragen werden. In diesem Modell existiert keine 30nm Fiber und das Nukleosom „weiß“ nicht zu welcher Helix es gehört, es kontaktiert seinen nächsten Nachbarn, auch wenn dieser in einer anderen 10nm Fiber ist.



**Abb. 5: Polymer-melt Konzept**

Diese Abbildung 5 wurde von Eltsov et al. 2008 übernommen.

Die Abbildung 5 zeigt die Organisation des Chromatins unter Annahme des Polymer-melt Modells. Bei einer niedrigen Chromatin-Konzentration kontaktiert die flexible Nukleosomen-Fiber das nächste Nukleosom innerhalb seiner Fiber, dadurch formiert sich eine 30nm Fiber. Eine Erhöhung der Chromatin-Konzentration führt zu einer Interaktion von Nukleosomen verschiedener Fibern. Die zuvor gebildete 30nm Fiber wird gestört, löst sich auf und das Chromatin verschmilzt zu einer einheitlichen Masse. Es entsteht eine offene, nicht geordnete Chromatinstruktur, in der es keinen Unterschied in der Affinität der Nukleosomen gibt.

Die Affinität der Nukleosomen innerhalb der gleichen oder der angrenzenden Fiber ist gleich. Der Signalweg der Chromatin-Kompaktierung zu Chromatin-Verschmelzung ist in lebenden Zellen nicht geklärt (Eltsov et al., 2008).

In dieser dynamischen Unordnung und offenen Polymer-melt Struktur, in der es keine 30nm Fiber gibt, ist das Chromatin zugänglich für Transkriptionsfaktoren und DNS-Reparatur.

Außerdem hat es den Vorteil, dass sich das Chromatin dynamisch falten kann, d. h. das Chromatin kann Schleifen (Loops) bilden und es bilden sich leichter Interaktionen zwischen Promoter und Enhancer Sequenz (Eltsov et al., 2008).

Bis heute sind die 2nm Fiber und die 10nm Fiber (Beads-on-a-String) Fakt.

Für alle weiteren, höheren Organisationsformen ist unklar, inwieweit die vorhandenen Untersuchungsmethoden zu Strukturartefakten beitragen. Daher blieben alle weiteren, noch höheren Organisationsformen des Chromatins in lebenden Zellen spekulativ.

Jedoch konnte in aktuellen *in vivo* Studien weder im Gewebe noch in humanen mitotischen Chromosomen 30nm Fibern belegt werden (Fusser et al., 2011, Jeffery C. Hansen, 2012, Nishino et al., 2012).

Um die Funktion von Chromatin (DNS-Reparatur, Replikation, Biosynthese von RNS und Proteinen) im lebenden Zellkern zu verstehen, ist es weiterhin wichtig, die 3D-Organisation des Chromatins im Zellkern zu erforschen.

#### 1.1.5 Verteilung von Eu- und Heterochromatin in Kernen verschiedener Zelltypen

Die Bestandteile des Chromatins sind DNS, Histone und Nicht-Histonproteine. Chromatin wird zunächst in Euchromatin und Heterochromatin eingeteilt. Diese Einteilung geht auf den Biologen Emil Heitz (1892-1965) zurück, der im Jahre 1928 färbare und nicht färbare Regionen des Chromatins entdeckte (Heitz, 1928). Das Euchromatin ist genreich, nicht repetitiv, kodiert für Protein und ist H3K4me3 positiv, wohingegen das Heterochromatin kondensiert, genarm und repetitiv ist und die Histonmarker H4K20me3 und H3K9me3 enthält (Craig, 2005).

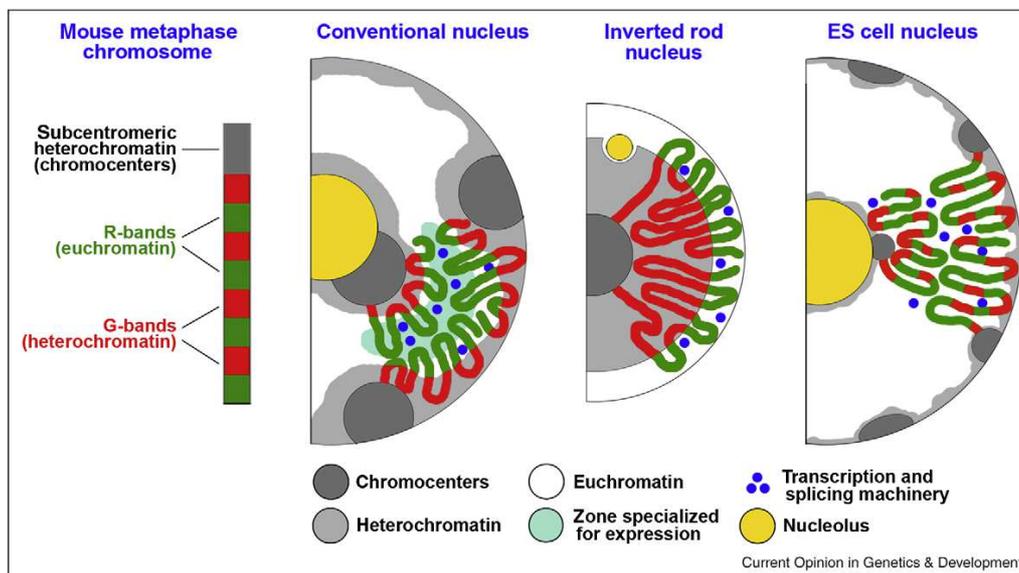
Oft wird das Heterochromatin im Vergleich zum Euchromatin auch als stärker kompakt charakterisiert. In welchem Ausmaß Kompaktierungsunterschiede tatsächlich bestehen, ist in letzter Zeit im Hinblick auf fakultatives Heterochromatin fraglich geworden. Für das inaktive X-Territorium, das als Paradebeispiel für fakultatives Heterochromatin herangezogen werden kann, wurde nur ein geringer Unterschied in der Kompaktierung festgestellt und dieser Unterschied beruht weniger auf einer tatsächlichen Verdichtung des Chromatins, sondern auf einer Verschmälerung des Interchromatinkompartiments (Teller et al. 2011).

Eu- und Heterochromatin befinden sich in unterschiedlichen Zonen innerhalb des Zellkerns.

Dieses Muster der nukleären Chromatin-Verteilung ist nahezu universell und in der Evolution von einzelligen bis mehrzelligen Organismen konserviert (Postberg et al. 2005).

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass es eine zelltypische, höhere Ordnungsstruktur der Chromatinarchitektur gibt. In jüngster Zeit wurden die Zellkerne von embryonalen Zellen und der Rod Photorezeptor hinsichtlich ihrer Chromatin-Verteilung untersucht und nun können

drei verschiedene Chromatin-Organisationen unterschieden werden: der konventionelle Zellkern (Cremer et al., 2001; Cremer and Cremer, 2001; Cremer and Cremer, 2010; Cremer et al., 2000; Habermann et al., 2001; Illner, 2007), die invertierte Zellkernarchitektur (Solovei et al., 2009) und die pluripotente Organisation des Chromatins in embryonalen Zellen (Efroni et al., 2008; Meshorer, 2007; Meshorer and Misteli, 2006; Meshorer et al., 2006).



**Abb. 6: Modelle der Zellkernarchitektur**

Die Abbildung 6 wurde von Joffe et al. 2010 übernommen.

Die Abbildung 6 zeigt drei Modelle der Chromosomenfaltung und der Zellkernarchitektur in differenzierten und pluripotenten Zellen.

Die Zellkernarchitektur hat einen Einfluss auf die Lage von Eu- und Heterochromatin im Interphasezellkern und ist somit ein weiteres, potenzielles Mittel der Genregulation. In der Interphase liegt Chromatin unterschiedlich stark kondensiert vor.

#### 1.1.5.1 Konventioneller Zellkern

Einen großen Beitrag zur konventionellen Zellkernarchitektur lieferte in den letzten Jahrzehnten das Labor von Professor Thomas Cremer.

Die meisten eukaryontischen Zellkerne haben eine konventionelle Zellkernarchitektur, in der sich das Heterochromatin entlang des Zellkernrandes und am Nucleolus konzentriert. Das Euchromatin liegt in Zonen zwischen dem Heterochromatin. Diese spezialisierten Zonen enthalten das aktive Chromatin, *transcription factories*, Splicing Speckles und neugebildete RNS. (Berchtold et al. 2010; Cremer et al., 2006; Fraser and Bickmore, 2007; Lanctot et al., 2007; Meaburn and Misteli, 2007; Misteli, 2007).

#### 1.1.5.2 Invertierter Zellkern

Er wurde von Solovei et al. in Rod Photorezeptoren von nachtaktiven Tieren entdeckt.

Das Euchromatin erscheint homogener und ist am Zellkernrand lokalisiert. Durch 3D-FISH Experimente konnte gezeigt werden, dass sich in der Euchromatinzone alle Gene, d.h. aktive, gewebsspezifische und stille Gene befinden.

Hingegen organisiert sich das Heterochromatin (Minor-Satelliten, Telomere und Zentromere) zur Zellkernmitte. Interessant hierbei ist, dass sich der invertierte Zellkern stufenweise innerhalb weniger Wochen aus einem konventionellen Zellkern, der bei der Geburt vorhanden ist, entwickelt und sich nicht nur das Chromatin umorganisiert, sondern auch die Lage von Zellkernorganellen wie *Nukleolus* oder *Splicing Speckles*.

Der invertierte Zellkern hat eine biologische Funktion, denn er ermöglicht es nachtaktiven Tieren, das wenige Licht zu bündeln und dadurch optimal zu nutzen (Solovei et al., 2009).

#### 1.1.5.3 Pluripotenter Zellkern

Der pluripotente Zellkern kommt in embryonalen Stammzellen (ES) und in reprogrammierten iPS-Zellen vor. Das Heterochromatin ist, wie in der konventionellen Zellkernarchitektur, am Zellkernrand und um den Nukleolus verteilt, jedoch ist die heterochromatische Zone deutlich schmaler organisiert, da der pluripotente Zellkern transkriptionell hyperaktiv ist.

Dies bedeutet, dass ein großer Teil des Chromatins, der in Zellkernen differenzierter Zellen als fakultatives Heterochromatin vorliegt, in ES-Zellen euchromatisch ist. Nach dem CT-IC Modell (siehe S. 17) wäre zu postulieren, dass der Anteil der Perichromatin-Region wesentlich größer ist. In pluripotenten Zellen werden repetitive Sequenzen wie Satelliten DNS, LINEs und SINEs bis zu 10fach höher transkribiert (Efroni et al., 2008).

#### 1.1.6 Der Zellkern von Granulozyten

In Eukaryonten ist der Zellkern meist rund oder oval mit einer glatten Oberfläche. Veränderungen der Zellkernmorphologie können in verschiedenen Entwicklungsprozessen und unter pathologischen Bedingungen (Laminopathien) beobachtet werden.

Ein Beispiel für eine physiologische Veränderung eines Zellkerns ist der Granulozyt.

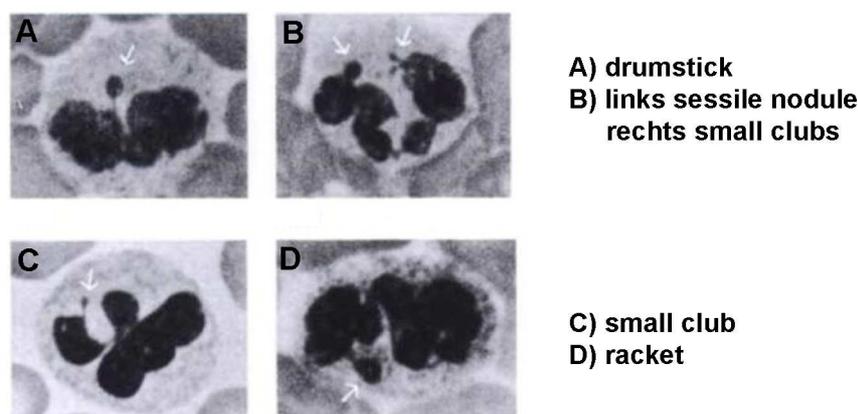
Differenzierte Granulozyten des peripheren Bluts haben eine kurze Lebensspanne und eine niedrige Genexpression (Borregaard and Cowland, 1997).

Die morphologischen Veränderungen sind im Zusammenhang mit den Aufgaben des Granulozyten zu betrachten. Granulozyten sind Zellen des Immunsystems und haben die Fähigkeit durch Migration das Blutendothel zu verlassen und in infiziertes Gewebe einzudringen. Granulozyten haben einen gelappten Zellkern mit stark kondensiertem, randständigem Chromatin.

Einen großen Beitrag zur Physiologie des Granulozyten-Zellkerns haben Ada und Donald Olins in den letzten Jahrzehnten geleistet. Ursächlich für die Segmentierung des Zellkerns ist das Level der verschiedenen Komponenten der Zellkernhülle.

Eine wichtige Rolle spielen hierbei der Lamin-B-Rezeptor, B1 und B2, LAP2 $\beta$ , Emerin (Gaines et al., 2008; Zwirger et al., 2008), die Isoformen von HP1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ ) (Lukasova et al., 2005; Olins and Olins, 2005), sowie der LINC-Komplex (Olins et al., 2009) und die Zusammensetzung von Heterochromatin, sowie des Cytoskeletts (Olins and Olins, 2004).

Überraschenderweise sind Granulozyten H3(S10)phos<sup>2</sup> und H4/H2A(S1)phos positiv (Olins et al., 2008). Die Segmentierung der Zellkerne hängt vom Alter der Granulozyten ab. Je älter sie sind, umso mehr Segmente besitzen sie. Überwiegend können 3-4 Segmente gefunden werden, diese sind durch DNS-Brücken miteinander verbunden.



**Abb. 7: neutrophile Granulozyten**

Die Abbildung 7 wurde aus Hecker und Freund, Praktikum der mikroskopischen Hämatologie entnommen (Heckner, 2001) und zeigt humane Granulozyten.

Sie zeigt geschlechtsspezifische und unspezifische Kernanhangsgebilde der Granulozyten.

Drumstick: Nachweis von mindestens 7 "Drumsticks" in 500 Granulozyten gilt als beweisend für das Vorhandensein eines inaktiven X-Chromosoms.

Sessile nodule: Drumstickvorläufer (♀)

Small club: unspezifisch, häufiger (♂)

Racket: unspezifisch (selten)

Eine weitere, einzigartige Erscheinung des Granulozyten Zellkerns ist die Bildung von NETs. NET ist die Abkürzung für Neutrophil Extracellular Traps. Wie der Name bereits sagt, kommen NETs nur in neutrophilen Granulozyten vor. Diese enthalten antibakterielle Peptide, humane DNS und Chromatin. Mit diesem Netzwerk sind humane Zellen in der Lage, Bakterien „einzufangen“ und die Virulenz der Bakterien zu hemmen (Brinkmann et al., 2004).

<sup>2</sup> H3(S10)phos ist ein Marker für die späte G2 Phase.

NETs binden gram-positive und gram-negative Bakterien sowie Pilze (Urban et al., 2009). Fuchs und Mitarbeiter konnten 2007 zeigen, dass ein differenzierter, polylobulierter Granulozyten-Zellkern nach Aktivierung seine Segmentierung verliert und die Zellkernform wieder rund wird. Dabei kommt es zu einer Durchmischung bzw. Veränderung von Eu- und Heterochromatin (Fuchs et al., 2007).

#### 1.1.7 Ursachen verschiedener Zellkernformen

Die Zellkernform wird beeinflusst durch die Interaktion der Zellkernmembran und den Laminen mit den Elementen des Zytoskeletts und dem Chromatin sowie der Lipidbiosynthese (Polychronidou and Grobhans, 2011). Modifikationen von Zellkern-Membranproteinen und eine unterschiedliche Zusammensetzung der Lamine und Laminrezeptoren verändern die Zellkernform. Dies konnte an verschiedenen Organismen (Hefe, Drosophila und Menschen) gezeigt werden. Einen Überblick über dieses Thema kann in Polychronidou und Grobhand (2011) nachgelesen werden.

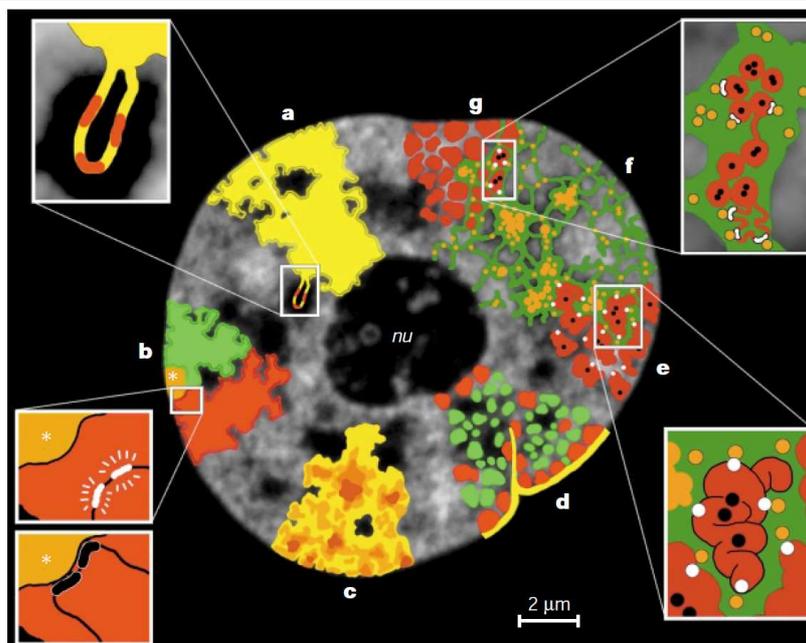
So führt der Verlust von Lamin B zu Ausstülpungen des Zellkerns, den sogenannte Lamin A/C blebs. In ihnen sammelt sich überwiegend genreiches Euchromatin. Durch 3D-FISH Experimente konnten die genreichen Chromosomen 19 und 17 in ihnen nachgewiesen werden (Dechat et al., 2008; Shimi et al., 2008).

Die funktionelle Bedeutung einer nicht zufälligen Anordnung von Chromatin wird durch Laminopathien deutlich (Shimi et al., 2008). Eine Laminopathie ist eine molekular definierte Gruppe von Krankheiten, bei denen die Anheftung von konstitutivem und fakultativem Heterochromatin an die Kernlamina gestört ist. Ein Beispiel hierfür ist das äußerst seltene Progerie-Syndrom, das multiple Gewebe und Organe betrifft und zu einem vorzeitigen Altern und einem frühen Tod führt (Eriksson et al., 2003; Goldman et al., 2004).

#### 1.1.8 Das Chromosomen-Territorium-Interchromatin-Kompartiment-Modell

Der Zellkern besteht nicht nur aus Chromatin. Heute kann davon ausgegangen werden, dass nur 40-50% des Volumens eines Zellkerns von Chromatin eingenommen wird (Rouquette et al., 2009). Es stellt sich daher die Frage, wie Chromatin und der Chromatin-freier Raum organisiert sind.

Ob die DNS sich um den DNS-freien Raum oder umgekehrt der DNS-freier Raum sich um die DNS organisiert, ist unklar. Der DNS-freie Raum liegt zwischen den CTn und erstreckt sich von den Zellkernporen um die CTn herum und mit dünnen Kanälen in die CTn hinein. Das CT-IC-Modell beschreibt die Zellkernarchitektur in Säugerzellen und verbindet das Wissen über CTn und dem Interchromatin-Kompartiment. Es ist ein topologisches Modell der Genregulation. Aus der Verteilung der CTn innerhalb eines Zellkerns entwickelte sich das Chromosomenterritorium-Interchromatin-Kompartiment-Modell, kurz CT-IC (Albiez et al., 2006; Cremer and Cremer, 2001). Dieses Modell beschreibt die Organisation von CTn auf der subchromosomalen Ebene.



**Abb. 8: CT-IC- Modell**

Die Abbildung 8 wurde aus Cremer 2001 entnommen.

Sie zeigt ein Modell der funktionellen Zellkernarchitektur anhand eines optischen Serienschchnittes durch einen lebenden Hela-Zellkern.

Das Chromosomen-Territorium-Interchromatin-Kompartiment-Modell geht davon aus, dass

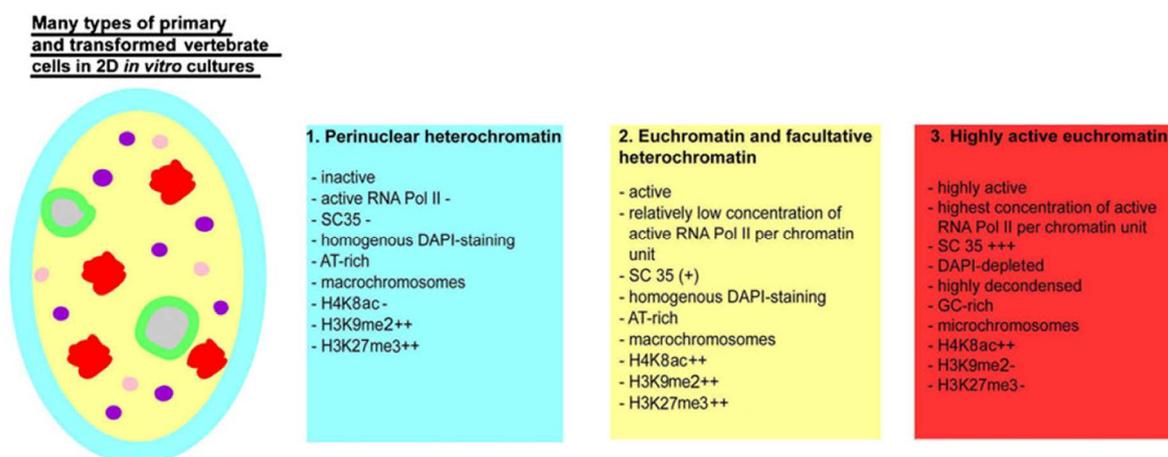
- A) Chromosomenterritorien komplex gefaltete Oberflächen haben, aus denen Chromatin-Schleifen mit aktiven Genen (rot) in das Interchromatin-Kompartiment (IC) hineinragen können.
- B) ein Chromosom p- und q-Arme enthält, diese nehmen nochmals distinkte Bereiche innerhalb eines CTn ein und werden durch das Zentromer (Stern) zusammengehalten. Vergrößerter Ausschnitt: oben: Aktive Gene (in weiß dargestellt) liegen auf der Chromatinschleife in Entfernung zu zentromerischem Heterochromatin. Unten: Inaktive Gene (in schwarz dargestellt) halten sich bevorzugt in der Nähe des Zentromers auf.
- C) die Chromatindichte innerhalb eines Territoriums variiert. Bereiche mit hoher Chromatindichte sind dunkelbraun dargestellt und mit geringer Dichte hellgelb. Offenes Chromatin ragt in das IC hinein, wohingegen dicht gepacktes Chromatin entfernt vom IC liegt.
- D) innerhalb eines CTn früh- (grün) und mittel- bis spät-(rot) replizierende Bereiche unterschieden werden können. Das genarme spät-replizierende Chromatin (rot) ist bevorzugt am Rande des CTn lokalisiert und mit der nuklearen Lamina (gelb) assoziiert. Genreiches, früh-replizierendes Chromatin (grün) hingegen liegt bevorzugt zwischen den genarmen Kompartimenten.
- E+G) Chromatinfibern hierarchisch aufgebaut sind. Aktive Gene (weiße Punkte) liegen an der Oberfläche von Chromatinschleifen und haben dadurch die Möglichkeit, mit Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, in Kontakt zu kommen, wohingegen inaktive Gene (schwarze Punkte) innerhalb der Chromatinfiber liegen.
- F) der Interchromatinraum, in grün dargestellt, verläuft zwischen den Territorien und kann tief in das CT hineinragen. Er enthält die Nicht-Chromatin-Zone und Proteinkomplexe (orange Punkte), z. B. Faktoren, die für die Transkription, die DNS-Reparatur und das Splicing notwendig sind.
- G) 1 Mb-Chromatin-Domänen wurden ursprünglich als Domänen replizierendes Chromatin (replication foci) während der S-Phase entdeckt. Später konnte gezeigt werden, dass diese Domänen Strukturkomponenten des Chromatins darstellen, die

während der gesamten Interphase nachweisbar sind (Sadoni et al. 1999; Walter et al. 2003). 1 Mb-Chromatin-Domänen (rot) und IC (grün) umspannen diese Komplexe, wohingegen inaktive Gene (schwarz) innerhalb der Chromatin-Domänen liegen.

Durch die feine Verzweigung des Interchromatins, welches bis in die CT hineinreicht, können aktive Gene sowohl im Inneren als auch an der Oberfläche der Territorien liegen (Albiez et al., 2006; Cremer and Cremer, 2001; Deghani et al., 2005; Visser et al., 2000).

### 1.1.9 Funktionelle radiale Zonen des Zellkerns

1998 wurde von Berezney und Wei das Konzept von Kernzonen als strukturelle Voraussetzung von Replikation und Transkription vorgeschlagen (Berezney and Wei, 1998). Dieses Konzept konnte in den letzten 20 Jahren durch zahlreiche, weitere Aspekte der Zellkernarchitektur ergänzt und bestätigt werden. Der Zellkern unterliegt einer funktionellen Kompaktierung (Lanctot et al., 2007). Innerhalb eines Zellkerns können viele verschiedene Domänen identifiziert werden (wie z.B. der Nukleolus, PML-Bodies, Splicing Speckles, Cajal-Körperchen, Hetero- und Euchromatin-Bereiche) und jede Kernzone hat auf Grund ihrer molekularen Zusammensetzung eine bestimmte Funktion. Die Organisation des Zellkerns ist durch funktionelle, distinkte radial angeordnete Zonen charakterisiert (Berchtold et al. 2010; Cremer et al., 2006; Lanctot et al., 2007; Meaburn and Misteli, 2007; Spector, 2001).



**Abb. 9: Zellkernorganisation in 2D-*in-vitro*-Zellkulturen**

Die Abbildung 9 wurde aus Zink 2011 entnommen.

Die Abbildung 9 illustriert die Zellkernorganisation, wie sie in vielen primären und transformierten Zellen von Vertebraten in 2D *in vitro* Zellkultur vorkommt.

Der Zellkern besitzt drei funktionelle Zonen, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften und den damit verbundenen Aufgaben voneinander unterscheiden.

- Das perinukleäre Heterochromatin (hellblau) ist AT-reich und enthält wenig aktive Polymerase II, keine Splicing Speckles und wenig H4K8ac. Dagegen kann eine

Anreicherung von Histonmarkern, die typisch für Heterochromatin sind gefunden werden.

- Das Innere des Zellkerns (gelb) enthält fakultatives Heterochromatin, Euchromatin, die aktive Polymerase II, Splicing Speckles und Histonmarker für aktives Chromatin.
- Das Euchromatin enthält eingestreute, kondensierte, heterochromatische Domänen (violett), HP1 $\beta$  (pink) und DNS-freie Räume, in denen die Splicing Speckles (rot) und die Nukleoli (grau) liegen. Die Nukleoli haben keine definierte Position im Zellkern. Innerhalb des Euchromatins gibt es transkriptionell besonders aktives Euchromatin.

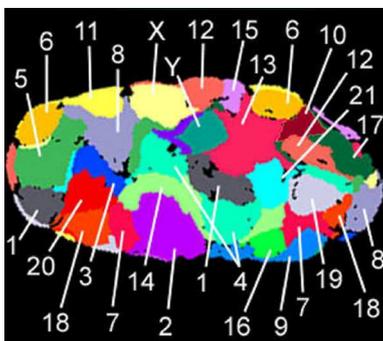
### 1.1.10 Chromatin im Zellkern und ihre Organisations-Prinzipien

#### 1.1.10.1 Chromosomale Nachbarschaften

Ob die Anordnung von Chromosomenterritorien zufällig oder nicht zufällig ist, beschäftigte bereits Theodor Boveri. Er untersuchte Embryonen des Pferdespulwurms und kam zu dem Ergebnis, dass sich die Nachbarschaft der Chromosomenterritorien während der Mitose ändert und die Nachbarschaft der CTn im Interphasekern variabel und somit vermutlich zufällig und funktionell bedeutungslos ist (Boveri, 1888; Boveri, 1909).

In humanen Fibroblasten wurde sowohl eine hochgradige Ordnung (Nagele et al., 1995), als auch eine sehr variable Nachbarschaft sowohl zwischen homologen als auch heterologen CTs nachgewiesen (Leitch et al., 1994). Auch das Vermessen von Distanzen zwischen homologen und heterologen chromosomalen Abschnitten in diploiden Fruchtwasserzellen (AFC) ergab eine sehr variable Nachbarschaft (Cremer et al., 2001).

Um diese Fragen einer variablen oder zufälligen Verteilung von CTs endgültig und eindeutig zu klären, wurde von Bolzer und Speicher die zunächst an Metaphasespreitungen etablierte M-FISH-Methode (Speicher et al., 1996) für Zellkerne adaptiert und ein 3D-M-FISH an postmitotischen menschlichen Fibroblasten (46, XY) durchgeführt (Bolzer et al. 2005).



**Abb. 10: 3D-M-FISH eines menschlichen Fibroblasten Zellkerns**

Die Abbildung 10 wurde aus Bolzer et al. 2005 entnommen.

Die Abbildung 10 zeigt einen lichtoptischen Schnitt eines menschlichen Fibroblastenzellkerns nach *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*. Die kleineren Chromosomen 19, 20, 21 und Y liegen in dieser Darstellung mehr im Zentrum des Zellkerns.

Die Ergebnisse von Bolzer et al. belegen eindeutig, dass die Anordnung der Chromosomen innerhalb eines Fibroblastenzellkerns zueinander hochvariabel ist. Nachbarn in einem Kern können im nächsten weit auseinander liegen. Das seit Jahrzehnten immer wieder postulierte Phänomen der Genomseparation konnte durch Bolzer et al. nicht bestätigt werden.

Eine variable Anordnung von CTn (#7 und #10) wird auch von Untersuchungen an Zellkolonien (Hela-Zell-Kone) vom Zwei-Zell-Stadium bis zum 32-Zell-Stadium unterstützt (Gao J., 2004).

Sanchez et al. untersuchten die Verteilung der Chromosomen 2, 18, X und Y in neutrophilen Granulozyten und kamen zu dem Resultat, dass die Chromosomen-Partition zufällig stattfindet. Hingegen entdeckten Bartova und Mitarbeiter in den segmentierten Zellkernen von neutrophilen Granulozyten eine nicht zufällige Verteilung von Chromosomen auf die Kernsegmente (Bartova et al., 2001).

Hepperger et al. untersuchten das Phänomen der paternalen Genomseparation in Zellkernen von Maultieren und konnten eine zufällige Verteilung des Chromatins feststellen (Hepperger et al., 2009).

Im Gegensatz zur hohen Variabilität der Nachbarschaft gibt es eine größenabhängige Anordnung der Chromosomen im Zellkern, diese Anordnung ist auch von der Zellkernform abhängig. Große Chromosomen sind in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert, während kleinere Chromosomen (unabhängig von ihrer Gendichte) sich näher im Zentrum des Zellkerns befinden. Als Folge davon sind kleine CTn häufiger und näher benachbart als große (Bolzer et al., 2005; Cremer et al., 2001).

Dass sich Chromosomen hinsichtlich ihrer Größe im Zellkern anordnen, konnte in verschiedenen Zelltypen und in verschiedenen Arten bestätigt werden. Bei Vögeln treten Chromosomen mit unterschiedlicher Größe auf. Das Chromosom 1 ist 188 Mbp groß und die vielen Mikrochromosomen haben eine Größe von 1 Mbp ([www.ensembl.org/Gallus\\_gallus/info/Index](http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/info/Index)). Die kleinen Chromosomen befinden sich mehr im Zentrum, wohingegen die großen Chromosomen in der Zellkernperipherie lokalisiert sind (Berchtold et al., 2011; Habermann et al., 2001; Stadler et al., 2004).

Obwohl die Lage der CTn auf dem ersten Blick zufällig erscheint, d.h. von Kern zu Kern wechselt, gibt es ein replikationsabhängiges Ordnungsprinzip.

#### 1.1.10.2 DNS-Replikationsmuster

Die DNS-Replikation erfolgt während der S-Phase nicht gleichmäßig über den Zellkern verteilt, sondern ein Chromosom repliziert an manchen Stellen früher und an anderen später. Dadurch entstehen charakteristische Replikationsmuster, die distinkte Bereiche im Zellkern einnehmen (Schermelleh et al., 2001). Während der frühen S-Phase können mehrere

tausend Replikations-Foci beobachtet werden (Markaki et al. 2012); diese sind gleichmäßig über den Zellkern verteilt, mit Ausnahme des Zellkernrandes und der Nukleoli.

Mittelreplizierendes Chromatin befindet sich am Zellkernrand und um die Nukleoli.

Spätreplizierendes Chromatin besteht aus großen Chromatinblöcken, die aus vielen kleinen Replikations-Foci zusammengesetzt sind. Das DNS-Replikationsmuster ist konserviert, d.h. man findet es bei Säugern, Vögeln und Wimpertierchen (Postberg et al., 2005).

Williams et al. untersuchte die Reorganisation von Chromatin während der Differenzierung von ES-Zellen zu neuronalen Zellen und kam zu dem Ergebnis, dass 20% aller Gene ihre Expression verändern und damit auch ihr Replikationsverhalten (Williams et al., 2006).

### 1.1.10.3 Chromatin-Topologie in Abhängigkeit ihrer Gendichte

Die Lage des Chromatins korreliert mit der Gendichte. Dies kann auf der Ebene der einzelnen Chromosomen sowie auf dem subchromosomalen Level beobachtet werden.

Die humanen Chromosomen 18 und 19 sind fast gleich groß, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Gendichte. Das Chromosom 18 ist 77 Mbp groß und enthält insgesamt 646 Gene (8 Gene / Mbp), während das *Alu*-Sequenz-reiche Chromosom 19 60 Mbp groß ist und 1696 Gene (28 Gene / Mbp) enthält (Croft et al., 1999).

Chromosomen mit hoher Gendichte befinden sich näher zum Zentrum des Zellkerns, während genarme Chromosomen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert sind (Cremer et al., 2003; Cremer et al., 2001; Cremer et al., 2004; Kupper et al., 2007).

Auch die subchromosomalen Regionen des X-Chromosoms Xp11 und Xq25 (Illner, 2007) und die subchromosomalen, genreichen und genarmen Regionen des Chromosoms 12 (Kupper et al., 2007) positionieren sich in Abhängigkeit ihrer Gendichte im Zellkern. Hierbei ist die lokale Gendichte innerhalb eines 2 oder 10Mb Fensters von Bedeutung (Murmans et al., 2005).

Während der Primatenevolution kam es zu chromosomalen Umbauten. Dennoch haben homologe Chromosomen-Segmente ihre nukleäre Anordnung beibehalten. Dieses seit 30 Millionen Jahren konservierte Motiv des Gendichte-abhängigen Chromatin-Arrangements deutet auf eine hohe funktionelle Bedeutung hin (Neusser et al., 2007; Tanabe et al., 2002).

Auch in Tumorzellen kann nach chromosomalen Translokationen weiterhin eine Gendichte abhängige Chromatin-Anordnung beobachtet werden (Cremer et al., 2003).

Ein Vergleich von aktiven und inaktiven Genen in Korrelation mit deren Gendichte kam zu dem Ergebnis, dass es überwiegend die Gendichte und nicht die Genaktivität ist, die die radiale Position eines Gens bestimmt. Inaktives Chromatin wie konstitutives Heterochromatin, Zentromere und die perizentromere Region befinden sich bevorzugt in der Peripherie des Zellkerns und in der Nähe der Nukleoli (Weierich et al., 2003).

#### 1.1.10.4 Genloci in Abhängigkeit ihrer Aktivität

Der Zellkernrand wurde lange Zeit generell als transkriptionell inaktiv erachtet, neuere Studien belegen eine Heterogenität der peripheren Zone und können eine transkriptionelle Aktivität in der Peripherie des Zellkerns zeigen (Deniaud and Bickmore, 2009; Markaki et al., 2010).

Dort können transkriptionell aktive Mikrodomänen beobachtet werden. Bei diesen Mikrodomänen handelt es sich um die Expression von Lamin-assoziierten Proteinen und um aktive Gene in unmittelbarer Nähe von Zellkernporen (Guelen et al., 2008).

Darüber hinaus konnten zahlreiche Artikel ein Fehlen von DAPI-Signalen um die Zellkernpore belegen. Dies konnte in der Vergangenheit an verschiedenen Arten gezeigt werden (Schermerle et al., 2008; Taddei, 2007).

Die Lage von hoch- und niedrigexprimierten Genen im Hinblick auf ihre Anordnung innerhalb ihres Territoriums wird kontrovers diskutiert und ist Thema des folgenden Abschnitts.

Anfang der 1990er Jahre wurde beobachtet, dass sich Gene generell bevorzugt am Rande eines CTn aufhalten, wohingegen nicht kodierende Sequenzen sich überwiegend innerhalb des Chromosomenterritoriums befinden (Clemson et al., 2006; Kurz et al., 1996; Scheuermann et al., 2004; Zirbel et al., 1993).

Verschure hingegen stellt die allgemeine These auf, dass sich transkriptionell inaktives, kondensiertes Chromatin am Zellkernrand sowie um die Nukleoli anordnet, wohingegen transkriptionell aktives, weniger kondensiertes Chromatin sich im Zentrum des Zellkerns anordnet (Verschure, 2004).

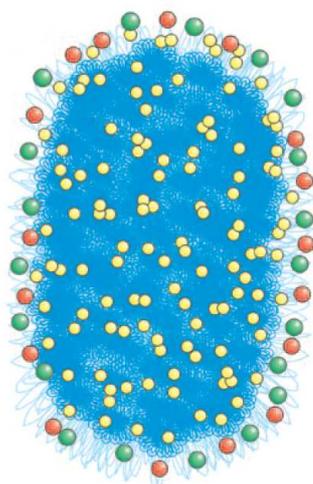
Ein besonderes Beispiel, um den Einfluss von Transkription auf die 3D-Topologie zu untersuchen, sind die humanen weiblichen X-Chromosomen einer gesunden Spenderin. Man kann innerhalb der gleichen Zelle sowohl das aktive als auch das inaktive X-Chromosom untersuchen. In somatischen Zellen unterliegen große Teile des X-Chromosoms der X-Inaktivierung.

Dietzel et al. untersuchten die 3D-Topologie der Gene *ANT2* und *ANT3* (adenine nucleotide translocase genes). *ANT2* ist auf dem aktiven X-Chromosom transkriptionell aktiv und auf dem inaktiven X-Chromosom inaktiv. Das Gen *ANT3* liegt in der pseudoautosomalen Region und unterliegt daher nicht der X-Inaktivierung. Diese unterschiedlich transkribierten Gene nehmen unterschiedliche Positionen innerhalb ihres CTn ein. Auf dem aktiven X-Chromosom befinden sich beide (aktiven) Gene an der CT-Oberfläche, wohingegen *ANT2* im inaktiven X-Chromosom mehr im Inneren des CTn liegt (Dietzel et al., 1999).

Auch Clemson et al. untersuchten die Lage von Genen des X-Chromosoms. Sie unterteilten die Gene in hoch- und niedrigexprimiert und setzten sie in Bezug zu dem Chromosomen-

Territorium. Dabei kamen sie zu dem Resultat, dass der äußere Bereich des Barr-Körpers mit Genen übersät ist. Hierbei spielt der transkriptionelle Status des einzelnen Gens keine Rolle.

Auch die inaktiven Gene, die man in räumlicher Nähe von *Xist* erwarten würde, haben sich an der Oberfläche des X-Chromosomenterritoriums, scheinbar außerhalb des Wirkungsbereichs von *Xist*, positioniert. Die DNS innerhalb des Territoriums schließt Gene aus, denn sie setzt sich ausschließlich aus „Junk“ DNS, d.h. aus Cot-1-DNS und zentromerischer, nicht kodierender, repetitiver DNS zusammen. Besonders interessant ist die identische Lage der Gene des aktiven X-Chromosoms und des Barr-Körperchens. Der einzige Unterschied zwischen ihnen ist die *Xist*-RNS im Zentrum des Barr-Körperchens (Clemson et al., 2006).



**Abb. 11: Barr-Körperchen**

Die Abbildung 11 wurde von Clemson et al. 2006 übernommen und zeigt einen Barr-Körper.

In gelb ist die *Xist*-RNS,  
in grün die aktiven Gene,  
in rot die inaktiven Gene,  
in dunkelblau das Heterochromatin,  
in hellblau Chromatin, welches nicht zum Barr-Körper gehört, dargestellt.

Gegen diese Aussage sprechen die experimentellen Resultate aus der Arbeitsgruppe Professor Cremers. Hier wurden Gene auch innerhalb des inaktiven X-Chromosoms in mehreren unabhängigen Experimenten beschrieben, und zwar unabhängig ihres transkriptionellen Status` und von der Gendichte (Illner, 2007; Teller, 2008; Teller, 2011).

Aktive Gene verändern ihre Eigenschaften und damit ihre Chromatin-Struktur, die Einfluss auf die 3D-Topologie dieser Gene hat. Positionsveränderungen von aktiven Genen können für viele Genloci beschrieben werden. Einige ragen sogar aus ihrem Chromosomen-Territorium heraus, z.B. *MHC-Locus* (Volpi et al., 2000), *c-myc* (Bartova and Kozubek, 2006), *Hox*-Gene (Chambeyron et al., 2005) und der Interleukin-Gencluster (Spilianakis et al., 2005). Aktive Gene sind in der Lage, ihre Position im Zellkern zu verändern, so befinden sich aktive Gene bevorzugt in *transkription factories*. Einige autosomale Gene sind in der Lage, ihr CTs zu verlassen und sich in *transkription factories* zu bewegen. Auch Gene, die mehrere Megabasenpaare voneinander entfernt oder sogar in verschiedenen CTn liegen, kolokalisieren an diesen Replikationsfoci (Osborne et al., 2004).

Chromatin-Bewegung von aktiven Genen konnte in zahlreichen Regionen beobachtet werden, z.B.: transiente Ko-lokalisierung der X-Inaktivierungs-Region während der Initiation der X-Inaktivierung (Bacher et al., 2006; Xu et al., 2006), in der BWS (Beckwith-Wiedemann-Syndrom) assoziierte Region (Mahy et al., 2002a), dem Olfactory receptor gene (Lomvardas et al., 2006),  $\alpha$ -Globulin Locus (Zhou et al., 2006) und der  $\beta$ -globulin Genlokus (Tolhuis et al., 2002).

Die Liste hochrangig publizierter Artikel über Chromatinschleifen und ko-lokalisierte Genen in cis und trans (kissing Gene) ist lang.

Nur wenige Labore machen sich die Mühe, bereits publizierte Daten zu reproduzieren.

So konnten in der Arbeitsgruppe von Cremer keine signifikanten Unterschiede in der Chromatin-Position von aktiven Genen von der BWS-Region (Teller et al., 2007), der *Hox*-Gene (Lanctot et al., 2007), von TRF1 und GREB nach Östrogenstimulation (Zunhammer Anderas, Dissertation 2011) oder des *MHC*-Locus (noch unpublizierte Daten der AG Cremer) gefunden werden.

Bestimmte Krebszellarten, die auf Grund spezifischer Translokationen entstanden sind, deuten auf bevorzugte Nachbarschaften hin. Vor allem in B- und T-Zell-Lymphomen können spezifische chromosomale Umbauten beschrieben werden (Elliott and Jasin, 2002).

Eine transiente Kolokalisation von *BCR* und *ABL1* kann nach Bestrahlung in KG-1-Zellen beobachtet werden (Deininger et al., 1998).

In der Entwicklung von B- und T-Zellen kommen chromosomale Translokationen in der V(D)J Region und der Klassen-Switch-Rekombinationsregion (CSR) vor (Chaudhuri and Alt, 2004). Ein Beispiel hierfür ist in B-Zellen die *c-myc: IgH*-Translokation (Robbiani et al., 2008).

Eine Kolokalisation von Genen spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von hämatopoetischen, malignen Erkrankungen und soliden Tumoren. Ein Gen Kissing, welches zu chromosomalen Translokationen führen kann, wird in vielen Zelltypen beschrieben.

So wurden kissing Genes in Prostata Tumoren beschrieben. Hier fusionieren die Gene *TMPRSS2* mit *ERG* und *ETV1* (Lin et al., 2009). Diese Genfusionsprodukte kommen in 50-70% aller Prostata-Tumore vor (Tomlins et al., 2005).

Viele Tumore sind gewebsspezifisch und werden durch gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren ausgelöst, die zu chromosomalen Bewegungen und zu genspezifischen intra- und interchromosomalen Interaktionen führen können. Ein Gen Kissing alleine reicht jedoch nicht zur Tumorentstehung aus. Damit es zur genomischen Instabilität kommt, sind außer einer Kolokalisation von Genen zahlreiche Enzyme erforderlich, durch die eine chromosomale Translokation ausgelöst werden kann (Peng and Karpen, 2008).

Rezeptoraktivierung und genotoxischer Stress haben einen synergetischen Effekt in der Tumorentstehung (Lin et al., 2009). Sie führen zur Aktivierung von *AID*, eine Cytidine-Deaminase und zur Expression von *ORF2*, einer Endonuklease. Diese LINE-aktivierte Endonuklease führt in transkriptionell aktiven Zellen zu Doppelstrangbrüchen (DSB), die durch nicht *homologes end joining* (NHEJ) repariert werden (Lin et al., 2009). Durch ein Knockdown der Endonuklease, PIWI-L1 und verschiedener Komponenten des NHEJ-Reparatur-Weges konnten die chromosomalen Translokationen trotz Gene Kissing überwiegend verhindert werden.

Wie es zur gezielten Chromatin-Bewegung, d.h. zu Loops, Kissing Genes und einer Ansammlung von aktiven Genen in Transcription Factories kommt, ist nicht aufgeklärt. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsversuche. Für die Chromatin-Bewegungen werden u.a. Insulatoren (spezifische DNS-Sequenz) verantwortlich gemacht (Wallace and Felsenfeld, 2007).

## 1.2 Das Zytoskelett des Zellkerns

Aktin ist ein multifunktionelles Protein. Es interagiert mit mehr als 60 verschiedenen Proteinen. Die Funktion von zytoplasmatischem Aktin ist gut charakterisiert. Hingegen weiß man nur wenig über die Regulation von Aktin im Zellkern. Vor mehr als 40 Jahren wurde Aktin im Zellkern einer Oozyte entdeckt (Lane, 1969). Dieser Befund wurde jahrzehntelang mit Skepsis betrachtet. Erschwerend hinzu kommt die nur geringe Konzentration von Aktin im Zellkern. Seit der Entdeckung von Aktin-Export-Rezeptoren im Zellkern (Stuven et al., 2003) gewinnt das Forschungsgebiet von nuklearem Aktin zunehmend an Bedeutung.

Aktin besitzt kein Kernlokalisierungssignal (NLS). Es hat eine Größe von 43 kDa und kann damit gerade noch passiv über die Zellkernporen in den Zellkern diffundieren. Es gibt jedoch viele Aktin-bindende Proteine, über die Aktin aktiv in den Zellkern importiert werden kann.

Die Funktion von nukleärem Aktin unterscheidet sich erheblich von zytoplasmatischem Aktin. Durch die Gabe chemischer Stoffe<sup>3</sup>, die an Aktin binden, gelang es, einen Teil der Aktin-abhängigen, nukleären Funktion aufzuklären.

Nach der Gabe von Latrunculin können Aktin-abhängige Funktionen inhibiert werden, z. B. der Export von RNS und Proteinen (Hofmann et al., 2001), der Aufbau der Zellkernhülle (Krauss et al., 2003), die Transkription (McDonald et al., 2006), die durch Transkription aktivierte Interaktion von Chromosomen (Nunez et al., 2008) und die Telomerbewegungen in der Meiose (Scherthan, 2006).

---

<sup>3</sup> Latrunculin

In Säugerzellen kommt Myosin in verschiedenen Isoformen vor. Der Zellkern enthält Myosin I und Myosin VI. Die Bedeutung von nuklearem Myosin kann durch die Gabe von 2,3-Butanedion Monoxim (BDM), einem Myosininhibitor untersucht werden.

Es wurde unter anderem beobachtet, dass es eine Rolle bei der Transkription spielt (Vreugde et al., 2006) und es in der Lage ist, chromosomale Bewegungen zu hemmen (Dundr et al., 2007).

### 1.3 Regulation der Transkription

#### 1.3.1 Die Ebene der Gene

Die Transkription von proteinkodierenden Genen erfolgt über die Polymerase II.

Die Expression wird über regulatorische Elemente (= DNS-Sequenzen) beeinflusst.

Es gibt eine Reihe von *cis*-wirkenden Sequenzelementen in der Umgebung eines Gens, die die Transkription ermöglichen. Dazu gehört zum Beispiel die Promotorregion.

Innerhalb eines Promotors gibt es wiederum eine Vielzahl von Elementen.

Im Kernpromotor (-35/+35) gibt es eine TATA-Box, einen Initiator, BRE- (englisch: *transcription factor IIB recognition element*) und DPE-Elemente. Proximal des Promotors sind die CAAT-Box, GC-reiche Regionen und CpG-Inseln zu finden (Gershenson et al., 2005).

Viele Gene sind auch als Genfamilien in Genclustern angeordnet. Diese Cluster bestehen aus Genen mit eng zusammenhängenden Funktionen, wie beispielsweise die Cluster der Hoxgene oder der Histongene. Gencluster werden durch spezifische Elemente, den LCRs (locus control region) reguliert.

#### 1.3.2 Epigenetische Regulatoren

Der Entwicklungsbiologe Conrad Hal Waddington benutzte den Begriff Epigenetik 1942 erstmals. Die Epigenetik ist eine junge Wissenschaft, die sich mit der Vererbung von Eigenschaften, die von der DNS-Sequenz unabhängig sind, beschäftigt.

Die Epigenetik untersucht Modifikationen des Chromatins, die die Genexpression dauerhaft beeinflussen und beschäftigt sich mit dem Wechselspiel zwischen Genen und Umwelt, da die Umwelt die zur Veränderung des Chromatins und damit von Genen führt.

Das epigenetische Profil einer Zelle bestimmt ihre Entwicklung, ihre Zellidentität und die Entstehung von Krankheiten. Hierfür verantwortlich sind non-coding RNAs, Protein- und DNS-Modifikationen.

### 1.3.3 Histonmodifikationen

Histone sind basische Proteine, die in der Lage sind, die negativ geladene DNS zu binden, und bilden dadurch den DNS-Histon-Komplex, das Chromatin. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Es besteht aus 147 bp und den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4 (Kornberg, 1977).

Jedes Histon besteht aus einem N-Terminus, einem C-Terminus und einer mittleren, globulären Domäne. Die globuläre Domäne entspricht dem Inneren des Histons und die terminalen Enden ragen aus der Chromatinfaser heraus und sind für posttranslationale Modifikationen zugänglich, wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung am N-Terminus und Ubiquitinylierung am C-Terminus (Calladine et al. 2006).

Histonmodifikationen findet man überwiegend am N-Terminus. Insgesamt gibt es über 50 histonmodifizierende Enzyme (Kim et al., 2009).

Diese haben einen Einfluss auf die Chromatinstruktur, indem sie die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den Nukleosomen und der DNS ändern und Bindungsstellen für regulatorische Proteine schaffen und dadurch die Transkription von Genen regulieren (Craig, 2005; Gilbert and Ramsahoye, 2005)

Durch Histonmodifikationen kann der genetische Ausdruck enorm erweitert werden. Histonmodifikationen signalisieren Expression oder Repression von einzelnen Genen, Genabschnitten oder ganzen Chromosomen (inaktives X-Chromosom). Histonmodifikationen werden als Teil eines epigenetischen Gedächtnisses an die nächste Zelle weitergegeben. Dies kann zum Beispiel an der klonalen X-Inaktivierung beobachtet werden.

Die Hypothese des Histoncodes steht auf dem Prüfstand. Forscher versuchten anhand von unterschiedlichen Kombinationen von Histonmodifikationen ( $2^{50}$  Möglichkeiten) eine Vorhersage über die zu erwartende Genexpression zu treffen (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000).

### 1.3.4 DNS-Modifikationen

DNS-Methylierung von Adenin und Cytosin ist weit verbreitet. In höheren Eukaryoten beeinflusst die DNS-Methylierung die Genregulation, Chromatinstruktur, Differenzierung, genomisches Imprinting, Gendosiskompensation, Tumorentstehung und komplexe Erkrankungen bis hin zur Alterung.

Bei Säugern wird das fünfte C-Atom der Cytosinbase von CpG-Dinukleotiden methyliert.

Kürzlich wurde die Cystein-Modifikation 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) entdeckt (Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009).

In genomischer DNS von murinen embryonalen Stammzellen wird 5-mC außerhalb von CpG-Dinukleotiden beschrieben. Sie kommt in murinen embryonalen Stammzellen, Purkinje-

Neuronen und granulären Neuronen vor. Die biologische Bedeutung, d. h. der Einfluss auf die Genexpression, die Chromatinstruktur und die Interaktion mit weiteren, epigenetischen Molekülen erst in Ansätzen geklärt.

<b>Histonmodifikationen</b>	
Arginin	Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinylierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung
Lysin	Methylierung
Serin	Phosphorylierung
Threonin	Phosphorylierung
<b>DNS-Methylierung</b>	
C5-Methylcytosin	
C5-Hydroxymethylcytosin	
N4-Methylcytosin (Bakterien)	
N6-Methyladenin (nicht bei Säugern)	

Tabelle 1: Epigenetische Modifikationen – ein Überblick

### 1.3.5 sRNA – Modulatoren der Genexpression

Ein transkribierter DNS-Abschnitt kann, muss jedoch keine Information zur Synthese eines Proteins enthalten. Die transkribierte RNA kann stattdessen eine direkte Rolle bei der Regulation von proteincodierenden Genen spielen. Ein Gen hat nicht zwangsläufig ein Protein zur Folge, da die mRNA durch komplementäre Nucleinsäuren reguliert werden kann. David Baulcombe und Voinnet haben 1997 als erster die Hypothese aufgestellt, dass in transgenen Pflanzen ein Transgen wie auch das homologe Endogen durch Nucleinsäuren unterdrückt werden kann und dadurch die Genexpression reguliert wird.

*„There is a systematic signal that can mediate gene silencing, we infer that the signal molecule is likely to be a nucleic acid“ (Voinnet and Baulcombe, 1997).*

Ein Jahr später entdeckten Andrew Fire und Craig Mello im Fadenwurm *Caenorhaditis elegans* kleine, doppelsträngige, komplementäre RNS-Moleküle (small interfering RNAs) als Ursache dieser RNA-Interferenz (RNAi) (Fire et al., 1998). Dafür erhielten sie 2006 den Nobelpreis für Medizin.

RNA teilt man derzeit in drei Klassen ein, nämlich siRNA, miRNA und piRNA.

Auch deren wichtigste Proteine sind bekannt, nämlich Drosha, Dicer, Argonaut (AGO) und GW182. Im Zellkern schneidet Drosha aus dem Vorläufertranskript der miRNA Hairpinstrukturen heraus. Diese werden mit Exportin ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma scheidet die Ribonuklease Dicer doppelsträngige RNA (dsRNA) in kleine

Stückchen. Diese werden im RISC-Komplex aufgenommen und binden im dort an ihre komplementäre Ziel-mRNA.

Diese Ziel-mRNA wird von Argonaut und Exonukleasen abgebaut (Caplen et al., 2001).

Heute kennt man hunderte von miRNAs in Menschen und Mäusen, die die Expression der komplementären mRNA lahm legen.

Die RNAi-Technik ist heute eine etablierte Methode um in Pflanzen, Tieren und Menschen Gene stillzulegen und anschließend die Auswirkungen auf die Zelle zu untersuchen.

Mit Hilfe der RNA-Interferenz konnten über 21.000 menschliche proteinkodierende Gene einzeln herunterreguliert werden ("knockdown"). Dabei wurde untersucht, ob dass jeweilige Gen eine Auswirkung auf die Zellteilung hat. Die Forscher fanden 600 teilungsrelevante Gene (Neumann et al. 2010).

In Pflanzen hat man tasiRNAs beobachtet, die nicht nur die Translation von mRNA regulieren, sondern auch epigenetisch auf das Genom einwirken, indem sie den Methylierungsgrad eines Gens beeinflussen (Baumberger and Baulcombe, 2005).

In welche biologischen Regelkreise die kleinen RNAs eingebunden sind, ist ein unerschöpfliches Thema und eine der spannendsten Frage der aktuellen Forschung.

#### 1.4 Chromatin-Kondensation

Starke Chromatinkondensation kann unter physiologischen Bedingungen während der Prophase der Mitose beobachtet werden. So findet man kondensiertes Chromatin in der Prometaphase, der Metaphase, der Meiose und in der Apoptose. Charakteristika der Apoptose sind „apoptotic bodies“ mit kompaktem Chromatin.

*In vitro* können in manchen Zelltypen Seneszenz-assoziierte-Heterochromatin-Foci (SAHF) beobachtet werden. Diese entstehen entweder nach dem Erreichen des Replikationslimits oder durch externe Bedingungen, die durch die Inaktivierung von E2F zur Heterochromatisierung führen (Narita et al., 2003).

Ebenso kann Seneszenz und die SAHF-Bildung durch die Gabe von BrdU und Distamycin A (DMA) gezielt herbei geführt werden (Dimri et al., 1995).

Kondensiertes Chromatin kann in lebenden Zellen durch externe Bedingungen verursacht werden, z.B. durch eine hyperosmolare Behandlung (Albiez et al., 2006).

Das Phänomen der vorzeitigen Chromsomen-Kondensation (PPC) führt, wie der Name bereits sagt, zu einer Chromatin-Kondensation außerhalb der Mitose. Dieses Phänomen wird durch viral bedingte Fusionen von Mitosezellen mit Interphasezellen ausgelöst und wurde 1967 erstmals beschrieben (Kato and Sandberg, 1967). Wenn ein Interphasezellkern mit einer mitotischen Zelle fusioniert, dann kondensiert das Chromatin des Interphasezellkerns vorzeitig (Johnson and Rao, 1970).

Auch die Gabe von Chadaensäure oder Calyculin A führt zur vorzeitigen Chromosomen-Kondensation (PPC) in somatischen Säugerzellen (Gotoh, 2009; Gotoh and Durante, 2006). Die Bildung der PPC kann in jedem Stadium der Interphase, also der G1-, S- oder G2-Phase ausgelöst werden.

Heterochromatisierung wird auch durch Bindung von MyoD an Promotoren ausgelöst und führt zu einer erhöhten Methylierung (Gillespie et al., 2009). Weitere Ursachen für Chromatin-Cluster sind der oxidative Stress, eine Erschöpfung des ATP-Vorrats (Lleres et al., 2009), der Anstieg der Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Martin et al., 2007) und einer Behandlung von Zellen mit Chaetocin ausgelöst (Illner et al., 2010). Chaetocin führt zu geklusterem Chromatin und zu einer vorübergehenden Seneszenz. Über die Zellkernarchitektur in Zellen mit geclustertem Chromatin ist bislang wenig bekannt.

### 1.5 Zelluläre Seneszenz in Säugerzellen (*in vitro*)

Der Begriff Seneszenz kommt von lateinisch *senescere* und bedeutet „alt werden“.

Leonard Hayflick und Paul Moorhead konnten 1961 eine limitierte, replikative Lebensspanne von normalen, humanen Zellen in der Zellkultur (*in vitro*) zeigen. In ihrem Experiment mischten sie eine gleiche Anzahl von jüngeren weiblichen (PD10) und älteren männlichen (PD40) Fibroblasten. Die nicht gemischten Fibroblastenkulturen behielten sie als Kontrolle. Als die männliche Fibroblastenkultur ihre Proliferation einstellte, wurde die gemischte Kultur untersucht und das Proliferationsverhalten analysiert (Hayflick and Moorhead, 1961). Sie postulierten, dass es für das replikative Limit von Zellen eine innere Uhr, einen Zählmechanismus geben müsse, der die DNS-Replikationsrunden zählen kann und prägen den Begriff „Hayflick-Limit“, synonym wird „replikative Seneszenz“ verwendet.

Das Hayflick-Limit kann jedoch nur an primären Zellen und *in vitro* beobachtet werden.

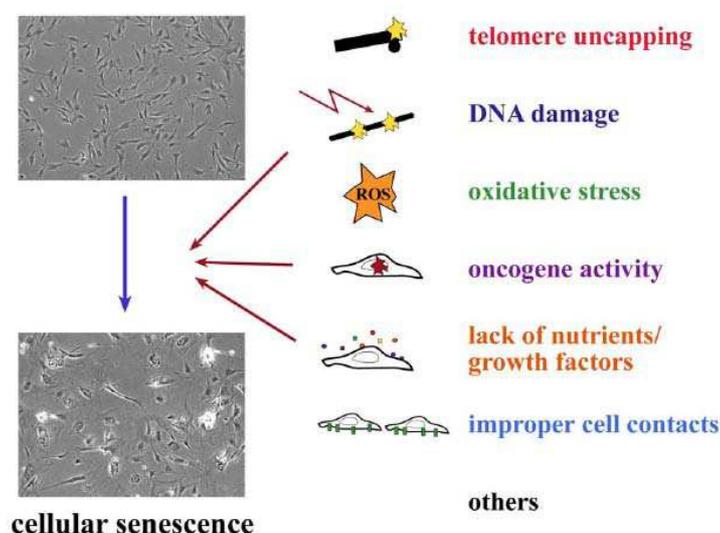
Es gibt Zellen, die nicht altern, diese sind Telomerase-positiv. Hierzu zählen Tumorzellen (Lü et al., 2012), Stammzellen und Keimbahnzellen (Wright et al., 1996).

#### 1.5.1 Formen der Seneszenz

Prinzipiell werden zwei Formen der Seneszenz unterschieden:

1. Die Telomer-abhängige Form, zu der die replikative Seneszenz gehört. Dies sind Zellen, die ihr artspezifisches Hayflick-Limit erreicht haben.
2. Die Telomer-unabhängige Form, die durch akuten Stress induziert wird und auch prämaturne Seneszenz genannt wird.

Es gibt viele Faktoren, die Seneszenz induzieren können. Eine Übersicht bieten der Artikel von Ben-Porath und Weinberg (2005).



**Abb. 12: Signal aktivierte Seneszenz**

Die Abbildung 12 wurde aus Ben-Porath und Weinberg 2005 entnommen.

### 1.5.2 Intrinsische und extrinsische Ursachen der Seneszenz

Die Ursachen für eine Seneszenz sind vielfältig.

Sie können innerhalb einer Zelle entstehen oder von außen induziert werden.

Es gibt Schäden innerhalb einer Zelle, die sich mit der Zeit anhäufen und zur Zellalterung führen. Hierzu gehören Schäden, die durch **freie Radikale** entstehen. Solche Radikale sind das Nebenprodukt der Zellatmung und können andere Moleküle, wie z.B. Lipide (vor allem ungesättigte) und Proteine durch Oxidation verändern (Agarwal and Sohal, 1996). Dadurch kommt es in alten Zellen zur Ansammlung von Lipofuchsin (Brunk and Terman, 2002; Robles, 1978; Sohal and Dubey, 1994; Terman and Brunk, 2006). Außerdem schädigen freie Radikale die DNS. Es wird von 10.000 DNS-Schäden pro Zelle pro Tag ausgegangen (Nakamura et al., 1998), die jedoch problemlos repariert werden können.

Eine weitere Ursache sind defekte **DNS-Reparaturmechanismen**, die durch eine mutationsbedingte, fehlerhafte Replikation entstehen, d.h. das Reparaturenzym ist selbst fehlerhaft kodiert und kann seine Aufgabe in der DNS-Reparatur nicht mehr erfüllen.

Auch **Genetische Faktoren** können zur Seneszenz führen, d.h. es gibt Gene, die am Alterungsprozess beteiligt sind. Die Selektion solcher Gene beruht vermutlich auf pleiotropen Wirkungen. Dabei kann eine früher auftretende, das Überleben und die Fortpflanzung fördernde Mutation positiv selektioniert werden, auch wenn diese Mutation im späteren Verlauf einen Tod aus innerer Ursache bewirken. Diese nachteilige Wirkung ist immer dann selektiv neutral, wenn Individuen einer Spezies unter den gegebenen Umweltbedingungen die nachteiligen Wirkungen nicht erleben, weil sie aufgrund äußerer Einwirkungen ohnedies vorher sterben. Man kann sich leicht viele Mutationen ausdenken, die zu einem vorzeitigen

Tod führen. Solche Mutationen sind für die Seneszenzforschung interessant, wenn sie zu vorzeitig auftretenden, typischen Merkmalen der natürlichen Seneszenz führen (Progerien). Besonders interessant sind Mutationen, die die maximale Lebensspanne einer Spezies verlängern, wie z.B. das Methusalem Gen *FOXO3*, das 2008 bei *Drosophila* entdeckt wurde und zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Willcox et al., 2008).

Es ist jedoch nicht ein einzelnes Gen, sondern ein genetisches Muster, das unsere Lebensspanne beeinflusst. Aktuell wurden 150 Merkmale im Genom identifiziert, die für Langlebigkeit bei Menschen kodieren können. Je mehr Genvarianten ein Individuum davon besitzt, desto höher ist die Lebenserwartung.

Eine andere Ursache stellen Verkürzungen der **Telomere** dar. Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zellteilungen und der Länge der Telomere (Hayflick and Moorhead, 1961). Telomere sind evolutionär konservierte Hexanukleotide. Sie haben beim Menschen und anderen Vertebraten die gleiche Abfolge (TTAGGG)<sub>n</sub> und tragen keine genetische Information, sondern schützen das Ende von Chromosomen. Sind die Telomere nur noch 4-6kb lang, führt dies zur zellulären Seneszenz (Harley et al., 1990), d.h. das Endreplikationsproblem löst die telomerassoziierte Seneszenz aus.

### 1.5.3 Die Seneszenz im Kontext der Evolution

Antagonistische Pleiotropie besagt, dass sich Mechanismen bzw. Gene, die in der Jugend, d.h. während der Reproduktionsphase vorteilhaft sind, im Alter negativ auswirken, d.h. es gibt keinen Vorteil, der nicht auch einen Nachteil mit sich bringt.

Zelluläre Seneszenz ist möglicherweise auch als ein Mechanismus der Tumorsuppression entstanden. Es kommt zu einem irreversiblen Zellzyklus Arrest, dadurch wird die Vermehrung und Ausbreitung der Tumorzellen verhindert. Dabei kann das umliegende Gewebe durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen (wie interstitial Kollagenase, Elastase und Streptomelysin) geschädigt werden (Hornebeck et al. 2003).

#### 1.5.4 Merkmale von replikativer Seneszenz *in vitro*

Die Seneszenz von Zellen ist ein komplexes Geschehen und zeigt einen charakteristischen Phänotyp, der mit einem veränderten Metabolismus einhergeht.

##### 1. Veränderungen in der Zellkern-Morphologie

- vergrößerte Zellkerne (Mitsui and Schneider, 1976)
- Bildung von SAHFs (Narita et al., 2003)
- Meist ein großer Nukleolus (Bemiller and Lee, 1978)
- Degeneration des umliegenden Gewebes (Campisi and di Fagana 2007)

##### 2. Veränderungen im Metabolismus

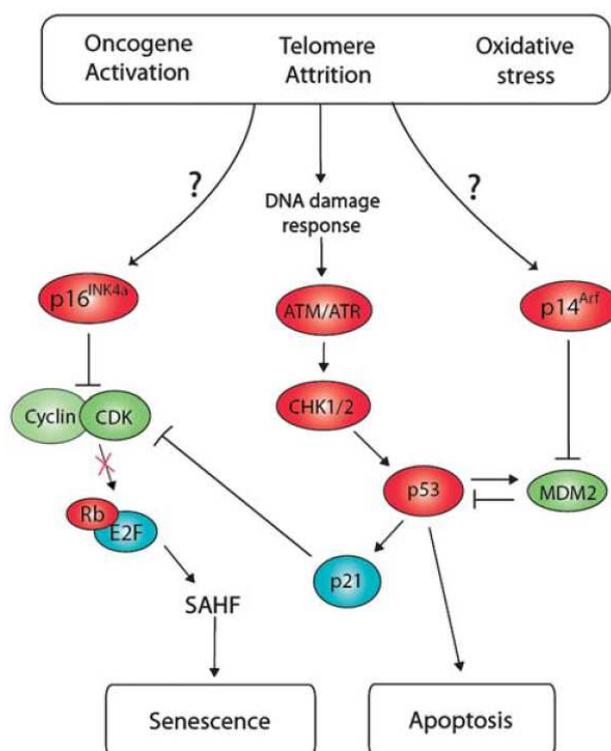
- irreversibler Zellzyklus Arrest (Campisi and di Fagana 2007)
- Apoptose resistent (Campisi and di Fagana 2007)
- Zellen können nicht mehr durch Mitogenen stimuliert werden (Campisi and di Fagana 2007)
- Sekretion von Matrix Metalloproteasen (interstitial collagenase, stromelysin), von inflammatorischen Zytokinen (Interleukin 1) und von einem Wachstumsfaktor (Heregulin).
- Expression der seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ gal), bei einem pH Optimum von 6 (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006)
- Veränderte Genexpression von p53, p16, p21 (Lanigan et al. 2011)
- Anreicherung von nukleärem Aktin (Kwak et al., 2004)
- Anreicherung von Prelamin A (Ragnauth et al., 2009)
- Anreicherung von Lipofuchsin (Jolly et al., 2002)

Eine Übersicht der Seneszenz-assoziierten Marker kann in Kulimann et al. (2010) und Campisi (2007) nachgelesen werden.

#### 1.5.5 Signalwege der Seneszenz

Seneszenz kann durch verschiedene Mechanismen wie Telomer-Verkürzung (Harley et al., 1990) oxidativem Stress (Serrano and Blasco, 2001) und Onkogen-Aktivierung (Serrano et al., 1997) induziert werden. Sie hat genetische Komponenten, deren wichtigste Gene für Schlüsselproteine die Zellzyklusregulatoren Retinoblastomprotein Rb und Protein p53 sind.

Die Seneszenz wird über p53-p21 und p16-Rb induziert.



**Abb. 13: molekulare Mechanismen zellulärer Seneszenz**  
 Diese Abbildung 13 wurde von Lanigan et al. 2011 übernommen.

Telomer-Verkürzung, Bestrahlung, zelltoxische Drogen und Onkogen-Aktivierung lösen replikativen Stress aus. Dieser induziert die *DNS-damage response* (DDR), die zu einer Aktivierung der Kontrollpunkt-Kinasen ATM/ATR und CHK1/2 führt. Dies hat eine Ansammlung von p53 zur Folge. p53 kann auch downstream von p14 und MDM2 aktiviert werden, dadurch wird der Abbau von p53 verhindert. Dies führt zu einer Ansammlung von p53, dadurch wird entweder der Zelltod ausgelöst oder p21 aktiviert.

Der zweite Weg zur Seneszenz führt über das Protein p16 (INK4a), welches in gestressten Zellen herunterreguliert ist. p16 ist ein Zellzyklusinhibitor und inhibiert die Aktivität von Cyclin-D. Dadurch kann pRb nicht phosphoryliert, d.h. aktiviert werden und bleibt an dem Transkriptionsfaktor E2F gebunden. Dies wiederum führt zu einem Proliferationsarrest und zu einer repressiven oder geschlossenen Chromatin-Struktur um E2F Zielgen Promotoren, dies resultiert in der Ausbildung von SAHF.

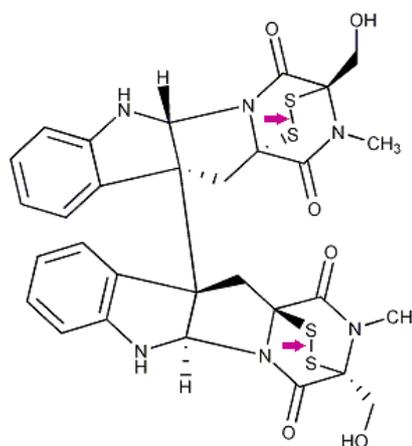
Der Mechanismus der transkriptionellen Regulation von p16INK4a und p14ARF in humanen Zellen ist noch nicht vollständig geklärt (Lanigan et al., 2011).

Über die aktuelle Diskussion der Seneszenz-Signalweg-Aktivierung und deren epigenetischen Komponenten kann in den Reviews von Ben-Porat et al. (2005), Campisi et al. (2007) und Lanigan et al. (2011) nachgelesen werden.

## 1.6 Chaetocin - ein historischer Überblick

Chaetocin ist ein Toxin des Schimmelpilzes *Chaetomium minutum*, dessen Struktur 1970 von Weber und Udagawa aufgeklärt und als Epipolythiodioxopiperazin klassifiziert wurde (Hauser et al., 1970). Außerdem stellten Weber und Mitarbeiter fest, dass Chaetocin antibakterielle und zytostatische Eigenschaften besitzt.

Synonym: Chaetocin  
 CAS Number: 28097-03-2  
 Molecular Formula :  $C_{30}H_{28}O_6N_6S_4$   
 Molecular weight : 696.84



**Abb. 14: Struktur von Chaetocin**

Diese Abbildung 14 wurde aus dem Datenblatt von Chaetocin /Sigma entnommen und modifiziert.

Nachdem Weber et al. 1970 Chaetocin entdeckt haben, ist lange Zeit nichts mehr zu diesem Thema in der Literatur zu finden. Erst 35 Jahre später beschäftigte sich das Labor von Axel Immhof wieder mit diesem Toxin und identifizierte es als spezifischen Inhibitor der Histon-Methyltransferase SUV3-9 in *Drosophila*. Aufgrund seiner Eigenschaften wird Chaetocin als ein exzellentes Mittel für eine Heterochromatisierungs-Studie empfohlen (Greiner et al., 2005).

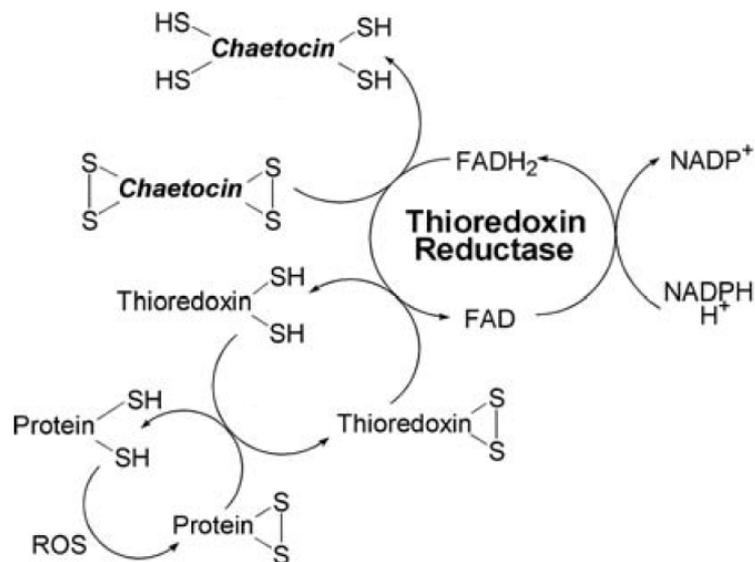
Zinner konnte in seiner Dissertation ein verändertes Histonmuster und eine Chromatin-Kondensation in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung zeigen. Dabei kolokalisieren die Centromersignale nicht mehr mit H3K9me3 (Zinner, 2007).

Weiterhin wird Chaetocin als ein selektives anti-neoplastisches Therapeutikum (Greiner et al. 2005, Isham et al., 2007; Tibodeau et al., 2009) und als ein Inhibitor der Thioredoxin Reductase-1 (TrxR1) in Hela-Zellen (Tibodeau et al., 2009) beschrieben.

Es ist bekannt, dass die Thioredoxin Reductase-1 in verschiedenen Tumorzellen hochreguliert ist und daher einen möglichen Ansatz für eine Therapie bietet (Biaglow et al., 2005).

Die Thioredoxin-Reductase-1 ist ein Enzym, welches in verschiedene Stoffwechselwege eingebunden ist. Sie enthält eine FAD als prosthetische Gruppe und eine NADPH-bindende Domäne. Dadurch katalysiert sie die NADPH-abhängige Reduktion von Thioredoxin.

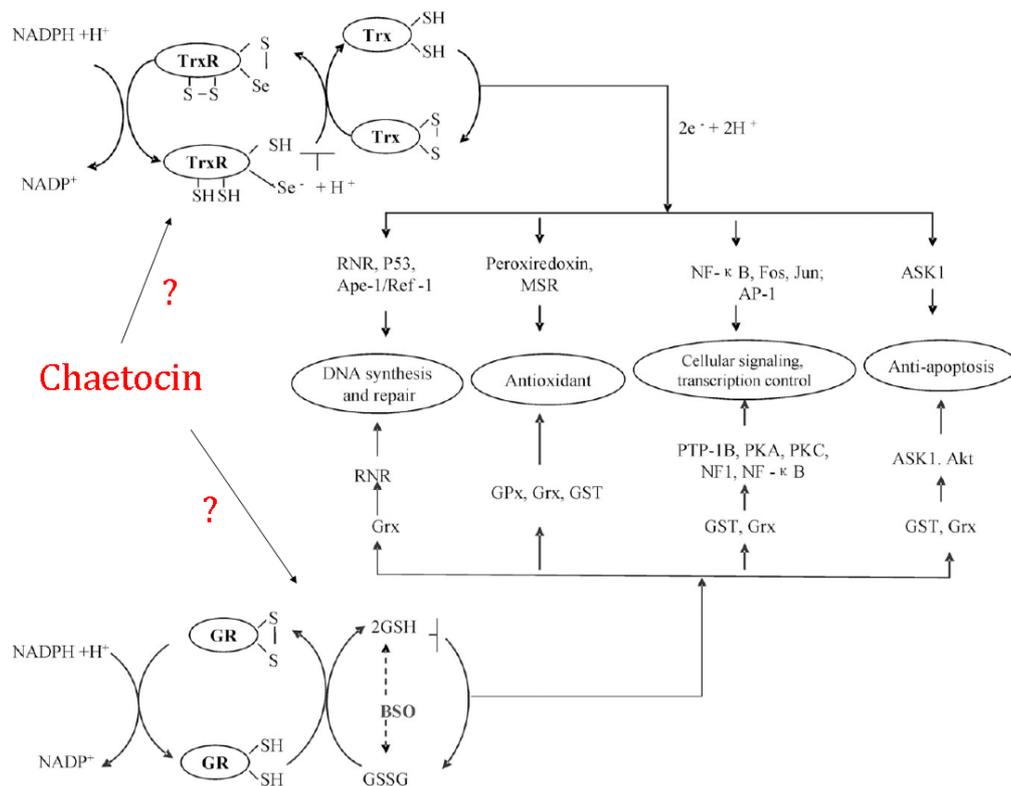
Die Thioredoxin Reduktase ist zusammen mit NADPH in der Lage, Disulfidbindungen zu reduzieren. Hierbei werden NADPH Elektronen entnommen auf Disulfide übertragen.



**Abb. 15: Effekte von Chaetocin auf den Trx/Trx1 Stoffwechselweg**

Abbildung 15 wurde von Tibodeau et al., 2009 entnommen.

Chaetocin konkurriert mit Thioredoxin und ist daher ein kompetitives Substrat der Thioredoxin-Reduktase. Dadurch werden auch die downstream regulierten Stoffwechselwege gehemmt, welche zu einer verminderten Verteidigung gegen oxidativen Stress führen kann.



**Abb. 16: Thiothredoxin Reductase- und Glutathion-Stoffwechselwege**

Das Schema wurde von Lu et al., 2007 entnommen und modifiziert.

Die Abbildung 16 zeigt Stoffwechselwege in Säugerzellen, die durch Chaetocin beeinflusst werden können. Eine Inhibition der Thiothredoxin Reductase (TrxR) und des Glutathion-Stoffwechsels führt zu einer Beendigung der DNS-Synthese, des antioxidativen Schutzes bei Stress, sowie der zellulären Proliferation und Vitalität.

Die Aktivität dieses Enzyms ist wichtig für Zellwachstum und Überleben und bietet daher einen wichtigen Ansatzpunkt für eine Tumorthherapie.

In einer weiteren aktuellen Studie konnte festgestellt werden, dass Chaetocin über den Signalweg caspase-8/caspase-3 Apoptose auslöst (Teng et al., 2011).

Isham und Mitarbeiter (2012) haben an Myeloma-Zellen (OCI-MY-5) und Lungentumor-Zellen (A549) ein NCI-60-Screening durchgeführt und dabei einen pleiotropen Effekt von Chaetocin auf die Genexpression und den damit verbundenen zellulären Metabolismus entdeckt. Sie konnten zeigen, dass solide (adhärente) Tumore in ihrer Zellproliferation mehr gehemmt werden als die hämatopoetische Zell-Linie.

## 1.7 Zielsetzungen dieser Arbeit

### Der Einfluss von Chaetocin auf das Organisationsprinzip von Chromatin in humanen Fibroblasten

Zu Beginn der Dissertation war eine durch Chaetocin ausgelöste Chromatinkondensation bekannt (Zinner, Dissertation 2007), jedoch war die Reorganisation der DNS noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Dissertation soll demnach in humanen Fibroblasten, die mit Chaetocin behandelt werden, die Auswirkungen auf das Chromatin und die radialen Zellkernzonen analysiert werden.

Die Chromatinorganisation von SAHFs ist mittlerweile untersucht, jedoch gibt es noch keine Befunde über die Reorganisation von Chaetocin induced chromatin clustering (CICCs) auf dem subchromosomalen Level; dies ist daher Zielsetzung der vorliegenden Dissertation.

Zunächst soll untersucht werden, ob Zellen, die ihr Chromatin reorganisiert haben, vitale Zellen sind. Anschließend soll der CICC-Phänotyp von weiteren natürlich vorkommenden und induzierten heterochromatisierten Foci (SAHFs) abgegrenzt werden.

Die Seneszenz hat genetische Komponenten, deren wichtigste Schlüsselproteine die Zellzyklusregulatoren Retinoblastomprotein Rb und Protein 53 sind.

Die Seneszenz wird über p53-p21 oder p16-Rb induziert, daher sollen in der vorliegenden Arbeit diese Seneszenz assoziierten Proteine mit IF und Western Bot untersucht werden.

Um den Einfluss von Chaetocin auf den Zellzyklus zu untersuchen, werden Fixierungsreihen im Sechs-Stunden-Intervall durchgeführt und die Frequenz der Zellzyklusmarker pKi67, H3pS10 und BrdU in Kontroll-Fibroblasten sowie in mit Chaetocin behandelten Zellkernen ermittelt.

Des Weiteren soll die Frage geklärt werden, ob Chaetocin oxidativen Stress auslöst.

Hiezu werden wasser- und fettlösliche Antioxidantien vor der Chaetocin-Induktion ins Medium gegeben, sowie Enzym-Inhibitoren getestet, auch ein Färbung mit Dichlorofluorescein (DCF-Staining) soll durch-geführt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, der Frage nach zugehen, welchen Einfluss Chaetocin auf die radiale Organisation des einzelnen Chromosoms sowie auf den gesamten Zellkern hat. Um die Chromatin-Polarität in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion zu untersuchen, werden Immunofluoreszenz- und 3D-FISH-Experimente durchgeführt. In der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Thomas Cremer gibt es bereits etablierte DNS Sonden, um die Zellkernarchitektur eingehend zu studieren. Diese Sonden sollen an Kontroll-Fibroblasten, an Chaetocin behandelten Fibroblasten mit unauffälligem Chromatin und an Zellkernen, die ihr Chromatin zu CICC organisiert haben, getestet werden.

Zusätzlich soll das durch Chaetocin-Induktion extrem erweiterte Interchromatin-Kompartiment, die Perichromatin-Region sowie die radialen Zellkernzonen untersucht werden.

#### Untersuchungen der Chromatin-Organisation in humanen Granulozyten

Humane Granulozyten haben in der DAPI-Färbung stark kondensiertes peripheres Chromatin und im Zentrum des Zellkernsegmentes einen Raum, der sich mit DAPI nicht anfärben lässt. Dieser Raum soll mittels einer 7-AAD-Färbung und einem Antikörper gegen aktives Chromatin untersucht werden.

Des Weiteren sollen Chromosomen-Territorien auf dem subchromosomalen Level im Granulozyten-Zellkern analysiert werden. Die Metaphasechromosomen in humanen Zellen haben einen charakteristischen Aufbau. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe, Form und der Anordnung von repetitiven DNS-Elementen, sowie der Anordnung von genreichen und genarmen Subregionen. Die lineare Organisation humaner Metaphasechromosomen ist mittlerweile gut verstanden, ebenso die Organisation einiger Chromosomen im Interphasezellkern von Fibroblasten, Lymphozyten und Tumorzellen. Einen Beitrag zur Chromatin-Anordnung von Chromosom 1, Chromosom 12 und X-Chromosom leistete das Labor von Thomas Cremer.

Die Anordnung dieser Chromosomen im Interphasezellkern von humanen, unstimulierten segmentierten Zellkernen von neutrophilen Granulozyten ist bislang noch nicht untersucht und ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

Daher befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Chromatin-Polarität in weiblichen Granulozyten. Hierzu werden Immunfluoreszenz- und 3D-FISH-Präparate angefertigt.

Dieser Teil der Arbeit soll sich mit der Frage beschäftigen, inwieweit die Gendichte eines subchromosomalen DNS-Abschnittes die Position dieser DNS in Bezug zum Chromosomen-Territorium und dem Interphasezellkern des Granulozyten beeinflusst. Hierzu sollen die subchromosomalen Regionen von Chromosom 1 und Chromosom 12 untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Drumsticks (= inaktives X-Chromosom) mit DNS-Sonden. Bisher können in der Literatur zu diesem Thema keine Daten gefunden werden. Um den Drumstick zu untersuchen sollen drei Experimente durchgeführt werden:

1. 4 BAC-Pools, die gleichmäßig über das X-Chromosom verteilt sind und unabhängig von ihrer Gendichte oder des Expressionsprofils sind.
2. sowie zwei Gendichte abhängige BAC-Pools.

## 2 MATERIAL UND METODEN

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Chemikalien	Firma
Agar	Sigma-Aldrich, Deutschland
Agarose SeaKem ME	FMC Rockland, Maine, USA
Bovines Serumalbumin BSA	ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
Colcemid (10µg/ml)	Seromed Biochrom, Berlin
Cryo.s 1,8ml	Greiner bio-one
DAPI	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dextranblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dextransulfat	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Diethyl-Ether	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
dNTP-Mix (je 2,5mM)	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, Deutschland
Fötale Kälber Serum (FCS)	Seromed Biochrom, Berlin
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deutschland
Formamid	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gel-loading-Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Heparin	Braun, Melsungen
Histopaque - 1077	Sigma-Aldrich, Deutschland
Histopaque - 1191	Sigma-Aldrich, Deutschland
Immersionsöl	Leica, Wetzlar
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natrium-Citrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Seromed Biochrom, Berlin
Phytohämagglutinin	Seromed Biochrom, Berlin
Polylysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Calbiochem, Darmstadt
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim, Krefeld
Tris-HCl (pH 8,0)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung 10x	Seromed Biochrom, Berlin
Tween 20	Calbiochem, Darmstadt
Yeast extract	GERBU Biotechnik, Gaiberg

<b>Enzyme</b>	<b>Firma</b>
DNS- Polymerase I	Roche, Mannheim
DNase I	Roche, Mannheim
GenomiPhi V2 DNA Amplifikation Kit	GE Healthcare
Pepsin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Taq – Polymerase I	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Trypsin	Seromed Biochrom, Berlin

<b>Toxine, Enzym Inhibitoren, Antioxidanzien</b>	<b>Firma</b>
Arsentrioxid (A <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Deutschland
Chaetocin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Buthionin Sulfoxime (BSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trolox (α-Tocopherol Derivat)	Sigma-Aldrich, Deutschland
α-Lipon Säure	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gluthadion (GSH)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gluthadion-EE reduziert (GSH-EE)	Sigma-Aldrich, Deutschland
N-acetyl-Cystein (NAC)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland

<b>Nukleotide/Primer/DNA</b>	<b>Firma</b>
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
GenomiPhi DNSAmplifications Kit	GE Healthcare
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, Deutschland
BrUTP	Sigma-Aldrich, Deutschland

<b>Antikörper und Fluorochrome</b>	<b>Firma</b>
Antifade Medium Vectashield	Vector, Burlingame CA, USA
Avidin-Alexa-488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat $\alpha$ Avidin-FITC	Sigma-Aldrich, Deutschland
Goat $\alpha$ Mouse-Alexa488	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Goat $\alpha$ Rabbit-Cy5	Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig
Goat $\alpha$ Lamin B	Santa Cruz
Mouse $\alpha$ B23	Sigma, Deutschland
Mouse $\alpha$ I/BrdU	Becton Dickinson, San Jose
Mouse $\alpha$ p53	Sigma, Deutschland
Mouse $\alpha$ SC35	Sigma Deutschland
Mouse $\alpha$ H3K27me3	T. Jenuwein, IMP, Wien (Lachner und Jenuwein, 2010)
Mouse $\alpha$ $\alpha$ -tubulin/clone DM1A	Sigma, Deutschland
Rabbit $\alpha$ cleaved caspase 3	Cell Signaling, USA
Rabbit $\alpha$ Dig	Sigma-Aldrich, Deutschland
Rabbit $\alpha$ H3K27me3	T. Jenuwein, IMP, Wien (Lachner und Jenuwein, 2010)
Rabbit $\alpha$ H4K8ac	Upstate Biotechnology, USA
Rabbit $\alpha$ H4K9m3	Abcam, USA
Rabbit $\alpha$ hTERT	Rockland, USA
Sheep $\alpha$ Dig-FITC	Dianova, Hamburg

Reagenzien für PCR / Nicktranslation	Firma
Cetus-Puffer II	Roche, Mannheim
Detergenz W1	Gibco BRL, Karlsruhe
$\beta$ M-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	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
DAPI-Färbelösung (0,02 $\mu$ g/ml)	DAPI-Stammlösung (500 $\mu$ g/ml)	2 $\mu$ l DAPI-Stammlösung in 50ml 4xSSC/T
Dulbecco`s Kompletmedium MEM	Dulbecco`s MEM Medium FCS Penicillin/Streptomycin	450ml 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 in 4x SSC	<u>1l Ansatz:</u> 500ml Formamid 500ml 4x SSC
Glycerin-Lösung (20%)	Glycerin in 1xPBS	<u>200ml Ansatz:</u> 160ml 1xPBS 40ml Glycerin
HCl-Lösung (0,1N)	1N HCl H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	<u>200ml Ansatz:</u> 20ml 1N HCl 180ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Hybridisierungs-Mastermix	20% Dextransulfat in 2xSSC	8g Dextransulfat in 40ml 2xSSC lösen, vortexen, mit 0,45 $\mu$ m Filter filtrieren
Label-ACG-Mix (2mM each)	je 100mM dATP, dCTP, dGTP	<u>500<math>\mu</math>l-Ansatz:</u> je 10 $\mu$ l ATP, CTP, GTP 470 $\mu$ l PCR-H <sub>2</sub> O
NaCl-Lösung (5M)	5M NaCl	146g NaCl ad 500ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
NT-dNTP-Mix	je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	<u>1ml Ansatz:</u> je 250 $\mu$ l dATP, dCTP, dGTP 50 $\mu$ l TTP 200 $\mu$ l PCR-H <sub>2</sub> O
NT-Puffer	1M Tris-HCl (pH 7,5) 1M MgCl <sub>2</sub> BSA	<u>100ml Ansatz:</u> 50ml 1M Tris-HCl 50mg BSA 45ml H <sub>2</sub> O
Paraformaldehyd-Lösung (4%)	Paraformaldehyd 1x PBS	4g des PFA-Pulver in 100ml PBS lösen, Gefäß dabei auf 60°C (unter dem Abzug) unter ständigem Rühren erwärmen, bis Lösung klar wird, anschließend abkühlen.

PBS-Puffer (pH 7,4)	140mM NaCl 2,7 mM KCL 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<u>20xPBS:</u> 320g NaCl 8g KCl 57,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9,6g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 2l H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> mit HCl auf pH 7,4 einstellen 1x PBS Aliquots autoklavieren
RPMI 1640 Komplettmedium	RPMI 1640 Medium FCS Penicillin/Streptomycin	450ml RPMI 50ml 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 <sub>2</sub> O <small>bidest</small> 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 <sub>2</sub> O <small>bidest</small>
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
Autoklav	Varioklav	Heraeus, Hanau
CO <sub>2</sub> -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	Heraeus, Hanau
	Rotanta/S	Hettich, Tuttlingen
	Vacuumconcentrator	Bachhofer, Reutlingen

sonstige Geräte	
Abzugshaube	Gefrierschrank -20°C
Bunsenbrenner für die Sterilbank	Gefrierschrank -80°C

Eismaschine	Hot Block
Kühlschrank +4°C	kleine Tischzentrifuge
pH-Meter	Stickstofftank
Präzisionswaage	Vortexer
Rotator	UV-Lampe für die Sterilbank
Schüttler	Wasserbäder (37°C-72°C)

Hilfsmittel	Anmerkung	Hersteller
Deckgläser	18x18mm, 22x22mm	Superior
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 Gewebekultur- flaschen	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
Glaspipetten	1ml, 5ml, 10ml, 20ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Küvetten	für 10 Objektträger	Schubert & Weiss, München
Objektträger	76x26mm	R. Langenbrink
Pipettenspitzen	Weiß	Molecular Bio ProduCTn
Pipettenspitzen	gelb und blau	Greiner Labortechnik
Pipettierhilfe	accu-jet® BRAND	Schubert & Weiss, München
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	Rührfische

Mikroskope/Zubehör	Typ	Hersteller
<b>Durchlicht-/ Phasenkontrastmikroskop</b>	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	
Photoapparat	Power Shot G5	Canon
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	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	
Fluoreszenz filter	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
<b>Confocales Laser- Scanning-Mikroskop</b>	Leica TCS AOBS SP5	Leica, Heidelberg
Objektiv	Plan-ACHROMAT 63x oil / 1,4	

Fluoreszenzfilter	<b>Ar-Laser:</b> 458nm ; 5mW 476nm ; 5mW 488nm ; 20mW 496nm ; 5mW 458nm ; 5mW <b>DPSS-Laser:</b> 561nm ; 10mW <b>HeNe-Laser :</b> 594nm; 2,5mW 633nm; 10mW	
-------------------	---	--

Bildverarbeitende Software	Hersteller
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems, Inc.
Amira	TGS
DistAngles	von <i>Tobias Thormeyer</i>
EDMT (eADS)	von <i>Tobias Thormeyer</i>
Microsoft Excel	Microsoft
ImageJ	Public Domain by Wayne Rasband
Leica Confocal Software	Leica Microsystem
Sigma Stat 3.00	SPSS

## 2.4 Zellkultur

### 2.4.1 verwendete Zelltypen

- Die humanen Lymphozyten wurden einer gesunden weiblichen Spenderin entnommen.
- Die humanen Granulozyten wurden aus frisch entnommenem, heparinisierem Vollblut einer gesunden Probandin gewonnen.
- Bei den Fibroblasten handelt es sich um humane, weibliche, diploide Zellen einer gesunden Spenderin aus Amsterdam.

#### 2.4.1.1 Humane Lymphozyten (HLy)

Humane Lymphozyten wurden aus dem Vollblut gesunder Personen isoliert. Lymphozyten sind kleine, runde Zellen mit einem Kerndurchmesser von 6-10µm. Im peripheren Blut sind sie in der G0-Phase arretiert. Unstimulierte Lymphozyten haben ein stark kondensiertes Chromatin und sie besitzen sehr wenig Zytoplasma. Um die Lymphozyten von den anderen Blutzellen zu trennen wurde die Methode des Ficoll-Dichte-Gradienten angewandt.

Nach der Zentrifugation befinden sich die Lymphozyten im „*buffy-coat*“ dieser wird abgesaugt und gereinigt. Durch Zugabe von 1% Phytohämagglutinin (PHA), ein Lektin werden besonders T-Zellen zur Zellteilung angeregt (Ceuppens et al., 1988).

Nach ca. 72 Stunden haben die Lymphozyten ca. drei Mitosen durchlaufen und ein Großteil befinden sie sich am Anfang einer weiteren Mitose.

Dieser Zeitpunkt ist besonders geeignet zur Herstellung von Metaphasepräparate, da stimulierte Lymphozyten werden zur Herstellung von Metaphasepräparate benötigt.

Benötigtes Material	
Akku Jet	Kulturflasche 250ml
Brutschrank 37°C und 5% CO <sub>2</sub>	Pasteurpipetten
Falcontube 15ml	Phytohämagglutinin
Falcontube 50ml	Pipetten 10ml
Falcontube mit Filter (LeucoSEP) 50ml	Pipette zum Absaugen
FCS	RPMI
Ficoll®-Plaque	Zentrifuge
Heparin-Na	

Methode:

1. pro Slide werden 0,5-1ml frisches, heparinisieretes Blut verwendet
2. Ficoll-Plaque auf Raumtemperatur erwärmen
3. 15 ml Ficoll in LeucoSEP-Tube füllen und 30s bei 3000rpm zentrifugieren
4. maximal 25ml Blut in das Tube füllen und 15 Minuten bei 2000rpm zentrifugieren

5. 250ml-Kulturflasche mit 40ml RPMI + 20%FCS + 5ml Penicillin/Streptomycin vorbereiten
6. 0,4ml PHA hinzugeben (1% Endkonzentration)
7. buffy coat mit einer Pasteurpipette absaugen, mit RPMI waschen und
8. in die Kulturflasche überführen
9. 72h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% relativer Luftfeuchtigkeit bis zur Zellfixierung kultivieren

#### 2.4.1.2 Humane Granulozyten

Zellphysiologie: Granulozyten sind Teil der angeborenen Immunität. Sie zirkulieren zunächst im Blut und können über ihre Oberflächenrezeptoren chemotaktisch an den Entzündungsherd gelockt werden und wandern über aktiviertes Endothel in das infizierte Gewebe ein. Ihre Lebensdauer beträgt nur wenige Tage, ihre Funktionen in der Immunabwehr sind vielfältig.

Basophile Zellen setzen lokal IL-4, IL-5 und inflammatorische Mediatoren frei und degranulieren durch C5a<sup>4</sup>, C3a<sup>1</sup> sowie durch Rantes. In ihren Speichervesikeln sind auch Heparin, Histamin und Peroxidase enthalten (by K Murphy, 2009).

Eosinophile haben Rezeptoren für alle IgG-Subklassen, IgE und IgA. Dadurch besitzen sie auch die außergewöhnliche Fähigkeit antigenbehaftete Parasiten zu eliminieren. Außerdem sind sie auf die Phagozytose von Bakterien spezialisiert (by K Murphy, 2009).

Morphologie: Granulozyten sind Abkömmlinge des roten Knochenmarks.

Sie werden auch auf Grund ihres Zellkernes als polymorphkernige Lymphozyten bezeichnet. Durch ihre deutlich anfärbbaren Granula im Zytoplasma können sie in drei Untergruppen differenziert werden.

Man unterscheidet sie innerhalb des Differentialblutbildes in:

- Neutrophile Granulozyten 60-70%
- Eosinophile Granulozyten 2-3%
- Basophile Granulozyten 0,1-1%

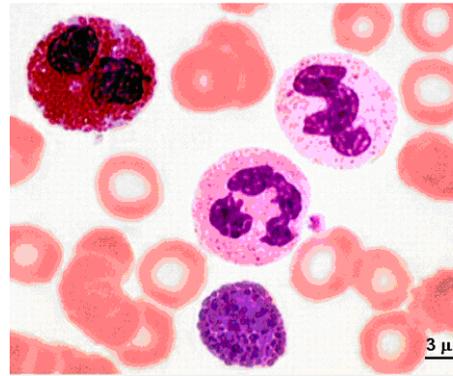
---

<sup>4</sup> Sind kleine Spaltprodukte des Komplementsystems

**Abb.17:  
Histologie verschiedener  
Granulozyten**

Die Abbildung 17 wurde von Groscurth 2004 entnommen.

Oben links: ein eosinophiler Granulozyt  
Mitte: zwei neutrophile Granulozyten  
Unten: ein basophiler Granulozyt  
Zusätzlich sind Erythrozyten markiert



**Isolierung humaner Granulozyten:**

Die Granulozyten wurden aus frisch entnommenem heparinisiertem Vollblut einer gesunden Spenderin gewonnen. Um die Granulozyten von weiteren Leukozyten (Monozyten und Lymphozyten), Erythrozyten und Thrombozyten zu trennen wird die Methode des Ficoll-Dichtegradienten verwendet. Dieser sortiert die Zellen nach ihrer Größe und Dichte. Die Granulozyten befinden sich in einer sehr schmalen Schicht zwischen Histopaque 1077 (oben) und Histopaque 1119 (unten).

Benötigtes Material
6ml frisch Blut (pro Gradient)
Heparin-Na
Histopaque 1191 und 1077
Falcon-Tube 15ml
Sarstedt-Röhrchen
Pasteurpipetten
1x PBS (37°C)
RPMI (10% FCS, 5ml P/S)
Zentrifuge

**Methode:**

1. in ein Sarstedt-Röhrchen wird zunächst 3ml Histopaque 1191 vorgelegt und vorsichtig mit 3ml Histopaque 1077 überschichtet
2. 6ml des frischen heparinisierten Blutes darauf gegeben und 45 Minuten bei 700g (ungefähr 2200rpm) zentrifugieren.
3. mit einer Transferpipette die Granulozyten abnehmen, in 12ml HANKS Medium aufnehmen und in ein 15ml Falcon-Tube überführen
4. 3 mal 10 Minuten waschen und 10 Minuten bei 1200rpm abzentrifugieren
5. Überstand bis auf einen kleinen Rest abnehmen und verwerfen, Pellet im Rest resuspendieren und mit 1xPBS auffüllen.
6. nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in ca. 2-4ml RPMI (10%FCS, 5ml P/S) aufgenommen, auf Polylsytin beschichteten Deckgläsern aufgetragen und für 45

Minuten bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte, die für die Zellfixierung notwendig sind entsprechen der Zellfixierung von Lymphozyten. Die Granulozyten werden für 1 Minute je nach Fragestellung mit 0,3xPBS oder 1xPBS behandelt.

#### 2.4.1.3 Humane Fibroblasten (HFb)

Hierbei handelt es sich um primäre humane Fibroblasten einer gesunden Spenderin (aus dem Klinikum Amsterdam, Niederlande). Nach dem Auftauen werden die Zellen in frisches Medium umgesetzt und im Inkubator kultiviert.

Benötigtes Material	
AkkuJet	Pipetten, 10ml
Falconröhrchen, 15ml	Sterilbank
FCS, 100ml	Streptomycin/Penicillin, 5ml
Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>	Wasserbad 37°C
Kulturflaschen, 75cm <sup>2</sup>	Zentrifuge
DMEM 500ml Medium, 100ml FCS, 5ml Streptomycin/Penicillin	

#### Methode:

1. Medium auf 37°C vorwärmen
2. 10ml Medium in ein 15ml Falconröhrchen geben
3. aufgetaute Zellen aus Kryoröhrchen direkt nach dem Auftauen dazu geben und kurz mischen
4. 10 Minuten bei 1000rpm abzentrifugieren
5. Überstand (mit DMSO) abnehmen und Zellen in 10ml neuen Medium resuspendieren
6. Zellsuspension in 75cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführen und für einige Tage im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% relativer Luftfeuchtigkeit wachsen lassen.

#### 2.4.1.4 Zellfixierung

Ziel der 3D-Fixierung ist der Erhalt der dreidimensionalen Morphologie des Zellkerns. Sie dient der Untersuchung der Zellkernarchitektur und sollte möglichst nahe an der *in vivo* Morphologie sein (Solovei et al., 2002).

### Zellfixierung von humanen Fibroblasten

Fibroblasten sind adhärent wachsende Zellen und können direkt auf Deckgläsern kultiviert werden bis sie die gewünschte Zelldichte haben. Eine hypotone Behandlung ist aufgrund ihrer ellipsoiden, flachen Form unnötig. Nach dem Waschen mit 1x PBS werden sie mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Paraformaldehyd führt zu einer Quervernetzung der Proteine am N-Terminus, wodurch die Sekundärstruktur der Proteine erhalten bleibt.

Paraformaldehyd muss vor der Fixierung stets frisch zubereitet werden, da es sich in Lösung langsam in Ameisensäure umwandelt.

Benötigtes Material	
AkkuJet	4% Paraformaldehyd in 1 x PBS
Deckgläser 18x18mm, 22x22mm	1x PBS
Ethanol/Ether	Phasenkontrastmikroskop
50% Formamid in 2x SSC	Pipetten
Glasküvetten	RPMI + 50%FCS (37°C)
20% Glycerin in 1x PBS	2x SSC
0,1N HCl	Stickstoff, flüssig
H <sub>2</sub> O bidest	0,05 TritonX-100 in 1x PBS
Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>	0,5 TritonX-100 in 1x PBS

### Methode:

Nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA werden die Zellen in frischem DMEM aufgenommen und bis zur Fixierung direkt auf Deckgläsern kultiviert.

1. Abgelöste Zellen mit DMEM aufnehmen (3ml pro Deckglas)
2. Deckgläser 18x18mm in 6-Well-Platten geben und mit 3ml DMEM beschichten
3. 3ml der Zellsuspension dazugeben
4. bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% relativer Luftfeuchtigkeit inkubieren
5. Medium wechseln:
  - Medium absaugen
  - 2x mit 1x PBS waschen
  - 4ml neues Medium auftragen

### Zell-Fixierung:

1. die mit Zellen bewachsenen Deckgläser 3x kurz in 1x PBS schwenken
2. 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS fixieren und während der letzten 2 Minuten 0,5% TritonX-100 in 1x PBS zugeben
3. 3 x 5 Minuten in 0,05% TritonX-100-Lösung waschen
4. 10 Minuten in 0,5% TritonX-100-Lösung bei RT inkubieren
5. Die Zellen können wenige Tage in PBS/T 0,05% gelagert werden.

#### 2.4.2 Chaetocin Behandlung

Die humanen Fibroblasten wurden wie in 2.4.1.3 beschrieben kultiviert.

Um die Auswirkungen von Chaetocin auf den Zellkern zu beurteilen, ist es wichtig die Anzahl der Chaetocin Moleküle pro Zelle in etwa einzuhalten. Daher wurden  $2 \times 10^5$  Zellen mit 4ml  $0,01\mu\text{M}$  Chaetocin induziert. Die Dauer der Chaetocin Behandlung orientierte sich an der Fragestellung. Anschließend wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenz oder für 3D FISH Experimente fixiert.

#### 2.4.3 Antioxidanzien und spezifische Enzym-Inhibitoren

Es wurde getestet, ob Antioxidanzien die Wirkung von Chaetocin aufheben können.

Antioxidanzien werden in die Gruppe der wasserlöslichen und fettlöslichen eingeteilt.

Zu den wasserlösliche zählen Glutathion (GSH), Glutathion Ethyl Ester reduziert (GSH-EE), N-acetyl-Cystein (NAC) und Dithiotreitol (DTT). Diese wurden eine Stunde vor der Chaetocin Behandlung ins Medium gegeben. Zu den fettlöslichen gehören Troxol und  $\alpha$ -Lipon Säure, diese wurde 12-16 Stunden vor der Chaetocin Induktion in Medium gegeben.

Des weitem wurden Enzym-Inhibitoren getestet;

L-buthionine Sulfoximin (BSO), ein Inhibitor der Glutamyl-Cystein-Synthetase (Carey et al., 2010; Cuzzocrea et al., 1998) und damit des Thioredoxin Reduktase (TrxR1) Systems, wurden die Zellen 5 Tage lang behandelt.

Arsentrioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) ein Inhibitor der Thioredoxinreduktase, wurde mit dem empfohlenen Wirkungsbereich von  $1\text{-}50\mu\text{M}$  für 48 Stunden den Zellen zugegeben.

Alle Substanzen wurden von Herrn Dr. Marcus Conrad und Alexander Seiler freundlicher weise zur Verfügung gestellt.

#### 2.4.4 Induktion von Seneszenz

In humanen Fibroblasten kann mit  $50\mu\text{M}$  BrdU und  $20\mu\text{M}$  Distamycin A (DMA) gezielt Seneszenz induziert werden. Hierzu wurden die Zellen 6-8 Tage lang mit BrdU und DMA inkubiert und das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt (Suzuki et al., 2002).

#### 2.4.5 Induktion von Apoptose

Staurosporine ist ein Stoffwechsel Produkt von dem Bakterium *Streptomyces staurosporeus* (Omura et al., 1995; Sasaki et al., 1991). Staurosporin ist ein Inhibitor der Proteinkinase und wird als potenter Apoptose-Induktor beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde Staurosporin verwendet, um in humanen diploiden Fibroblasten Apoptose einzuleiten. Hierzu

wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  (Endkonzentration) Staurosporine für 3-6 Stunden induziert (Kabir et al., 2002).

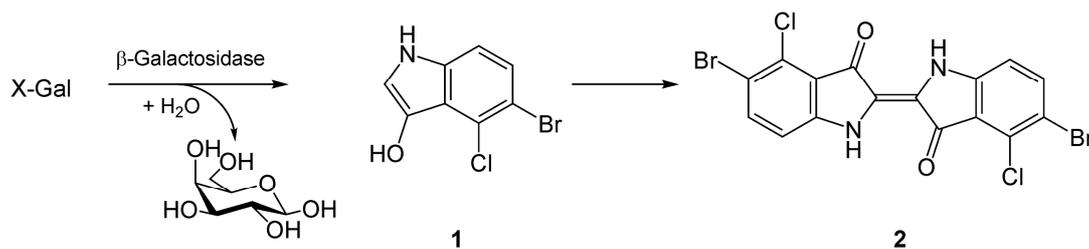
## 2.4.5 Zellbasierte Assay

### 2.4.5.1 $\beta$ -Galactosidase Assay

Der  $\beta$ -Galactosidase Assay (pH6) ist ein Nachweis für Seneszenz (Dimri et al., 1995).

Die  $\beta$ -Galactosidase (Syn.  $\beta$ -D-Galactosid-Galacto-Hydrolase) ist ein physiologisch vorkommendes Enzym. Es spaltet  $\beta$ -D-Galactoside in Galactose und die entsprechende Alkoholverbindung. Ein wichtiges physiologisches Substrat ist die Lactose, diese wird zu Galactose und Glucose hydrolysiert.

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) ist ein unphysiologisches chromogenes Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase. Die enzymatische Spaltung von X-Gal führt zur Bildung von 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl (1). Das abgespaltene Indoxyl wird oxidiert, dimerisiert und bildet den unlöslichen blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo (2).



**Abb. 18:  $\beta$ -Galaktosidase Test**

Zunächst wird ein X-Gal Färbepuffer mit folgenden Endkonzentrationen hergestellt:

- 10mM Kalium Ferricyanid:  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$
- 10mM Kalium Ferricyanid Trihydrat:  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$
- 40mM citric acid
- 12mM Sodium Phosphat
- 150mM NaCl
- 2mM  $\text{MgCl}_2$
- 1mg/ml X-Gal

Zellfixierung:

- Zellen werden zweimal kurz mit 1xPBS gewaschen
- 3 Minuten mit 3% PFA/1xPBS fixiert
- dreimal mit 1xPBS gewaschen

- mit X-Gal Färbepuffer überschichtet
- Inkubation 4-10 Stunden bei 37°C im Wasserbad

Nach der X-Gal Färbung wurden die Zellen mit DAPI gegengefärbt und mit Antifade Medium eingedeckelt und am Mikroskop quantifiziert.

#### 2.4.5.2 Vitalitätstest durch eine 7-AAD-Lebendfärbung

Mit einer 7AAD (7-Amino-Actinomycin) Lebendfärbung ist es möglich vitale Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden (Lecoeur et al., 1997). Vitale Zellen haben eine intakte Zellmembran und nehmen daher kein 7-AAD auf. Im Laufe der Apoptose verändert sich jedoch die Zellmembran, so dass 7-AAD in das Zellinnere diffundieren und in die DNSinterkalieren kann. Dadurch ist es möglich apoptotischen Zellen von vitalen zu unterscheiden.

Benötigtes Material
Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>
1xPBS
PBS/5%FCS/ 7AAD 8µg/µl
PBS/5%FCS/ 7AAD 8µg/µl / 0,02% Triton
4%PFA in 1xPBS
0,02µg/ml DAPI in 1xPBS

Methode:

1. Humane Fibroblasten wurden wie üblich auf Deckgläsern 22x22mm kultiviert und mit 0,01µM Chaetocin/48Std. induziert.
2. 2 mal kurz mit 1xPBS waschen
3. lebende Zellen mit 1xPBS/5%FCS/ 7AAD 8µg/µl 20 Minuten bei 37°C inkubieren,
4. 2 mal kurz mit 1xPBS waschen
5. 4%PFA in 1xPBS, 10 Minuten
6. mit 1xPBS waschen
7. 5 Minuten 0,5% Triton/PBS
8. mit 1xPBS waschen
9. 0,02µg/ml DAPI in PBS

Als Kontrollen wurden humane Fibroblasten ohne Chaetocin verwendet, diese wurden einmal mit Triton 0,02% (=Positivkontrolle) und einmal ohne Triton inkubiert (=Negativkontrolle).

### 2.4.5.3 Visualisierung von neu gebildeter RNS

Nascente RNS wurde durch die *scratch labeling* Methode dargestellt (Schermelleh et al., 2001). Dazu wurden die Zellen mit 30µl frischem Medium, welches 5mM Br-UTP enthält beschichtet und mit einer dünnen Nadel gekratzt, dadurch werden die Zellen kurzfristig permeabilisiert und sie können die markierten Nukleotide aufnehmen. Die Nukleotide werden für die neu synthetisierte RNS verwendet. Die Zellen wurden nach dem *scratch labeln* zwischen 8 und 30 Minuten inkubiert, anschließend 2x kurz mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA fixiert, mit 4%BSA geblockt und eine Antikörperfärbung gegen BrU durchgeführt.

### 2.4.6 S-Phasen Nachweis

Die S-Phasen Markierung wurde wie in (Schermelleh et al., 2001) beschrieben durchgeführt. Für den S-Phasen Nachweis erhalten die Zellen 40 Minuten vor der Fixierung 50µm BrdU. Bietet man der replizierenden Zelle das Thymidinanalogon 5-Bromo-2` deoxyuridin (BrdU) im Überschuss an, konkurriert es mit Thymidin und wird in den neu synthetisierten Strang inkorporiert und mit einem Antikörpern gegen BrdU (M-α-BrdU und G-α-M-Alexa488) nachgewiesen. Anschließend wurde die Anzahl der BrdU positiven Zellen am Epifluoreszenzmikroskop ermittelt.

### 2.4.7 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden wie in 2.4.1.3 und 2.4.2 beschrieben kultiviert.

Anschließend wurden die Zellen 2x mit 1xPBS gewaschen, mit 4%PFA fixiert, mit 0,5% Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert und 20 Minuten mit 4%BSA geblockt. Der primäre Antikörper wurde je nach Fragestellung gewählt.

Ausschluss von Apoptose:

anti cleaved caspase 3, anti Lamin-B, anti SC35, ,  
anti α-tubulin Klon DM1a, Phalloidin –Cy3

Analyse der Zellzyklusphasen:

anti pKi67, anti H3S10-p, anti I/BrdU

Analyse von Chromatin Kompaktierung:

anti H3K9m3, anti H3K27m3, anti H4K8ac,  
anit-Zentromer, anti-TRF2  
anti Macro H2A1.1 / 1.2

Die fixierten Zellkerne wurden für 30 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen.

Anschließend wurden die Präparate am Epifluoreszenzmikroskop beurteilt.

## 2.5 Isolation von Proteinen

Die Expression der Proteine p16, p21, und p53 wurde mit einem Wester Blot untersucht.

Dazu wurden die Proteine aus einem Gesamtzelllysat verwendet, von Kontroll Zellen und Zellen, die ein und zwei Tage lang mit Chaetocin behandelt wurden.

Das Protokoll für die Zusammensetzung des Probenpuffers wurde von PhD Karolin Klement zur Verfügung gestellt.

Benötigtes Material
Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>
Phasenkontrastmikroskop
Zählkammer
1xPBS
Trypsin EDTA
SDS
Glycerin
TrisHCl
DTT 1,4-dithiotreitol Roth 69082
Millipore-Wasser

### Zusammensetzung des 4 x Probenpuffers

20ml 10% SDS (= 4%)

20ml 100% Glycerin (= 40%)

3,25ml 1M Tris pH 6,8

2,5ml 1M DTT (Dithiothreitol, reduzierend) = 50mM

1 Spatelspitze Bromphenolblau

ad 50ml H<sub>2</sub>O bidest auffüllen. Anschließend können die Aliquots bei -20°C lagern.

### Methode:

1. Zellen 2x mit 1xPBS waschen
2. trypsinieren, in 1xPBS aufnehmen, waschen und 10 Minuten bei 1000rpm zentrifugieren
3.  $3 \times 10^5$  Zellen in 100µl Probenpuffer (2x)
4. Proteine denaturieren für 10 Minuten bei 100°C
5. Die Proteine können bei -20°C mehrere Monate gelagert werden
6. Für den Western Blot werden  $3 \times 10^4$  Zellen in ca. 10µl Puffer benötigt.

## 2.6 Zellpräparation für die Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH)

### 2.6.1 Chromosomenpräparation für die 2-D-in-situ-Hybridisierung

Um ein Metaphasepräparat herzustellen benötigt man humane Lymphozyten einer gesunden Frau, die durch Zugabe von 1% Phytohämagglutinin zur Proliferation angeregt werden. Nach drei Tagen wird den Lymphozyten Colchicin zugesetzt. Colchicin ist das Gift der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), es bindet an freiem Tubulin, stabilisiert es und bewirkt dadurch eine Depolymerisation der Mikrotubuli (Alberts, 2011).

Dadurch werden die Zellen in der Mitose im Metastadium arretiert.

Das Metaphasen Chromosom ist etwa um den Faktor 10.000 verkürzt. Dadurch ist das humane Chromosom 22 in der Mitose 2µm groß.

Anschließend werden die Zellen zentrifugiert und vorsichtig einer hypotonen Behandlung mit 0,6 M KCl unterzogen, wodurch die Zellen und das Chromatin aufquellen, so dass sie später beim Auftropfen auf den Objektträger platzen.

Im nächsten Schritt werden die Zellen mit Fixativ, einem Gemisch aus Methanol und Eisessig (3:1), fixiert. Durch die extreme pH-Wert-Senkung werden chromosomale Proteine zum Teil extrahiert, wodurch die DNS für FISH-Sonden zugänglicher wird.

Die Zellen werden mehrmals (bis zu acht Mal) in Fixativ aufgenommen, resuspendiert und abzentrifugiert. Zuletzt werden sie je nach Zelldichte in wenigen ml Fixativ aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetropft. Die Qualität der Metaphasen wird unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Sie ist entscheidend für den Erfolg der Hybridisierung.

Benötigtes Material	
0,56%ige KCl-Lösung, vorgewärmt auf 37°C	Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>
AkkuJet	Pipetten
Abzug	Plastikeinmalpipetten
Colcemid (10µg/ml)	Vortexer
Falconröhrchen 15ml/50ml	Zentrifuge
Fixativ (3:1 Methanol/Eisessig)	

#### Methode:

##### 1. Colcemidbehandlung

- 10µl/ml Colcemid zugeben, das Spindelgift für 40-60 Minuten einwirken lassen.
- 0,1ml pro 10ml Medium

##### 2. Hypotonische Behandlung

- Medium mit Zellen in ein 50ml-Falconröhrchen überführen
- 8 Minuten bei 1100 rpm zentrifugieren und Überstand bis auf 4ml abnehmen

- Zellen resuspendieren
- Tropfenweise, vorsichtig 10ml der 0,56%igen KCl-Lösung zugeben
- mit 0,56%iger KCl-Lösung auf 45ml auffüllen
- Inkubation bei 37°C für 16 – 20 Minuten
- vor dem Abzentrifugieren ein paar Tropfen Fixativ dazugeben

### 3. Zellfixierung

- Zellen im hypotonen Medium für 8 Minuten bei 1100rpm abzentrifugieren und den Überstand bis auf 5ml abnehmen
- Zellen vorsichtig resuspendieren
- tropfenweise 10ml Fixativ zugeben
- mit Fixativ auf 30ml auffüllen
- Fixativ 30 Minuten bei RT einwirken lassen
- 10 Minuten zentrifugieren bei 1000rpm, Überstand bis auf 5ml abnehmen
- Zellen resuspendieren
- Wiederholen der Fixierungsschritte mindestens 2 mal (bei Bedarf bis 8 mal)
- Überführen der Zellsuspension in ein 15ml Falconröhrchen
- Die Zellsuspension kann mehrere Monate bei -10°C lagert werden

### 4. Auftropfen

der Zellen nach der Methode von Deng aufgetropft (Deng et al., 2003).

Der Grad der Metaphasenspreitung wird von Faktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit bestimmt.

Benötigtes Material
11x13 cm Metalbox
Objektträger
Phasenkontrastmikroskop
Plastikpipette
Wasserbad 55°C mit 3cm Abstand zwischen Wasseroberfläche und Deckel

### Methode:

1. Objektträger mit 100% EtOH reinigen und
2. in eine in 55°C Wasserbad schwimmende Metallbox legen
3. Deckel schließen, um die gewünschte Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu erhalten
4. Zellsuspension aus ca. 3 cm Höhe auf den Objektträger auftropfen
5. Fixativ verdampfen lassen
6. nach ca. 2 Minuten Objektträger herausnehmen

7. unter dem Phasenkontrastmikroskop die Spreitung und Dichte der Metaphasen überprüfen
8. Lagerung der Chromosomenpräparate in 70% EtOH für mehrere Tage im Kühlschrank

#### 5. Pepsinieren

Damit die DNS-Sonde gut an die komplementäre DNS des Metaphasechromosoms binden kann, muss das Präparat enzymatisch von Cytoplasmaresten befreit werden. Hierzu inkubiert man die Präparate mit Pepsin. Anschließend werden sie durch eine steigende Ethanolreihe von Fixativ- und Pepsinresten befreit.

Alterung der Chromosomenpräparate für mehrere Tage bei RT oder bei 60°C für 1-2 Stunden im Trockenschrank.

Benötigtes 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 8 Minuten bei 37°C in Pepsin-Lösung inkubieren
3. Objektträger 10 Minuten in 70%igen Ethanol stellen, dann in 90%igen und anschließend in 100%igen Ethanol geben und bei Raumtemperatur trocknen lassen
4. Backen der Präparate bei 60°C für 1-2 Stunden

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

#### 2.6.2 Präparate für die 3D-*in-situ*-Hybridisierung

Die Chaetocin Experimente wurden an humanen Fibroblasten durchgeführt.

Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet und parallel dazu, Zellen die mit 0,01µm Chaetocin behandelt wurden.

Ziel der 3D-Fixierung ist der Erhalt der dreidimensionalen Morphologie des Zellkerns.

Sie dient der Untersuchung der Zellkernarchitektur und sollte möglichst nahe an der *in vivo* Morphologie sein. Deshalb muss bei allen Schritten ein Austrocknen der Präparate verhindert werden (Solovei et al., 2002). Die Zellen werden wie in 2.4.1.3 beschrieben kultiviert und mit 4%PFA 1xPBS fixiert und nach dem Protokoll von Cremer M. die drei 3D-FISH durchgeführt (Cremer et al., 2008).

Benötigtes Material	
AkkuJet	4% Paraformaldehyd in 1 x PBS
Deckgläser 18x18mm, 22x22mm	1x PBS
Ethanol/Ether	Phasenkontrastmikroskop
50% Formamid in 2x SSC	Pipetten
Glasküvetten	RPMI + 50%FCS (37°C)
20% Glycerin in 1x PBS	2x SSC
0,1N HCl	Stickstoff, flüssig
H <sub>2</sub> O bidest	0,05 TritonX-100 in 1x PBS
Inkubationsschrank 37°C / 5% CO <sub>2</sub>	0,5 TritonX-100 in 1x PBS

### Zell-Fixierung:

6. die mit Zellen bewachsenen Deckgläser 3x kurz in 1x PBS schwenken
7. 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS fixieren und während der letzten 2 Minuten 0,5% TritonX-100 in 1x PBS zugeben
8. 3 x 5 Minuten in 0,05% TritonX-100-Lösung waschen
9. 20 Minuten in 0,5% TritonX-100-Lösung bei RT inkubieren
10. Deckgläser direkt in 20% Glycerin in 1x PBS überführen und mindestens 30 Minuten bei RT stehen lassen (am besten über Nacht)
11. in flüssigem Stickstoff gefrieren ⇒ auftauen lassen ⇒ in 20% Glycerin tauchen ⇒ 3x wiederholen
12. 3 x 5 Minuten in 0,05% TritonX-100-Lösung waschen
13. Küvette kurz mit 0,1N HCl ausspülen und anschließend exakt 6 Minuten bei RT in 0,1 N HCl stehen lassen
14. zweimal kurz mit 2x SSC waschen
15. in 50% Formamid in 2x SSC für mindestens 30 Minuten stehen lassen (besser mehrere Tage)
16. die Zellen können mehrere Wochen gelagert werden

Im Anschluss an die Fixierung der Zellen wird evtl. ein Verdau mit Pepsin durchgeführt.

Nach der Chaetocin Behandlung haben die Zellen ein stark kondensiertes Chromatin. Durch eine Pepsin Behandlung ist die DNS für DNS-Sonden leichter zugänglich.

Benötigtes Material
50mg/ml Pepsin in 1xPBS
MgCl <sub>2</sub> Lösung (190ml 1xPBS, 10ml 1M MgCl <sub>2</sub> )
1% PFA (1g PFA in 100ml 1x PBS)

Methode:

- Präparate 5 Minuten in 1xPBS äquilibrieren
- 2-10 Minuten Pepsinbehandlung bei 37°C (Kontrolle am Phasenkontrastmikroskop)
- Reaktion mit PBS/MgCl<sub>2</sub> stoppen
- 5 Minuten nachfixieren mit 1% PFA
- Mit 1xPBS waschen und in 50%FA/2xSSC lagern

## 2.7 DNS-Sonden für die Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung kurz FISH macht man sich die Eigenschaft einzelsträngiger DNS oder RNS, sich mit ihrem komplementären Gegenstrang zu binden, zu nutze. Dabei bilden die auf dem Objektglas fixierten Metaphasen oder Zellen die „Matrix“, an der die Reaktion stattfinden soll. Mit dieser Methode können ganze Chromosomen, sowie chromosomale Subregionen nachgewiesen werden.

Die DNS-Sonde ist mit Fluorochromen oder Haptenen markiert. Somit kann man eine spezielle Ziel-DNS nachweisen. Bevor die Sonde an die Ziel-DNS binden kann, müssen beide durch Erhitzen denaturiert werden. Anschließend wird das Präparat bei 37°C inkubiert, so dass komplementäre DNA-Stränge aneinander binden können.

Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wäscht man das Präparat unter stringenten Bedingungen mit 0,1x SSC bei 62°C.

Indirekt durch Haptene markierte Sonden müssen durch Antikörper, die mit Fluorochromen gekoppelt sind nachgewiesen werden.

### 2.7.1 Amplifikation der BAC-DNS über GenomiPhi (Whole Genome Amplification)

GenomiPhi ist eine sehr effiziente Methode, um DNS zu amplifizieren.

Sie wurde verwendet um die DNS Konzentration der BACs zu erhöhen.

Sie basiert auf einer DNS-Polymerase, die aus dem *Bacillus subtilis* Phagen Phi29 gewonnen wird. Die DNS-Amplifikation findet unter isothermen Bedingungen statt und ist sehr akkurat, da die Polymerase über eine proofreading-Aktivität besitzt (Dean et al., 2001).

Die Primer sind unspezifische Hexanukleotide, die zufällig an genomischer DNS binden.

Aus einer geringen Ausgangs-DNS (<1µg) können große Mengen neu synthetisierte DNS (20µg) gewonnen werden. Die GenomiPhi wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

### 2.7.2 Markierung der DNS über Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine Methode der DNA-Markierung. Die DNS kann direkt oder indirekt markiert werden. Nick ist das englische Wort für Einzelstrangbruch und darauf beruht das Prinzip der Nick-Translation. Es werden mit Hilfe des Enzyms DNase I zufällig offene Phosphodiester Bindungen, so genannte Nicks, in einer doppelsträngigen DNS erzeugt.

Diese offenen Stellen, 3'-Hydroxyl-Gruppen, sind das Startsignal eines weiteren Enzyms, der DNA-Polymerase I. Sie hat eine 5'→3' Polymerase- und eine 5'→3' Exonuclease Aktivität. Das bedeutet, sie entfernt Nukleotide aus der DNS und fügt gleichzeitig neue ein. Dabei schiebt sie den Nick Richtung 3' Ende vor sich her.

Für die direkte Markierung wird TAMRA oder TexasRed und für die indirekte Digoxigenin und Biotin verwendet.

Benötigtes Material	
DNase-I (1:250 verdünnt mit H <sub>2</sub> O bidest)	β-Mercaptoethanol (0,1M)
dNTP-Mix	10x NT-Puffer
Eppendorf-Tubes 1,5ml	Polymerase I
Hapten- bzw.	EDTA
Fluorochrom-modifiziertes dUTP	Wasserbad 15°C
H <sub>2</sub> O bidest	

Methode:

1. Reaktionsgemisch auf Eis ansetzen:

- x µl DNS (2 µg auf 100 µl Ansatz)
  - 5 µl NT-Puffer
  - 5 µl 0,1 M β-Mercaptoethanol
  - 5 µl dNTP-Mix
  - 2 µl des modifizierten dUTPs
  - 1 µl DNase I
  - 1 µl Polymerase I
- ⇒ ad 30 µl H<sub>2</sub>O bidest

2. 90 Minuten 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
5. eine zu große Sonde kann mit DNase I nach verdaut werden
6. Durch die Zugabe von EDTA werden dem Enzym 2-wertige Kationen, die es für ihre Aktivität benötigt, entzogen.

### 2.7.3 Markierung der Paint-Sonden durch DOP-PCR

Die primären und sekundäre Amplifikate der Paint-Sonden für die menschlichen Chromosomen waren bereits im Labor vorhanden, so dass nur noch eine Label DOP-PCR mit 6MW Primern geführt werden musste. Die DOP-PCR-Primer sind partiell degenerierte Oligo-Nukleotid-Primer, mit definierten Sequenzen am 3'- und am 5'- Ende. Dazwischen sind zufällige Nukleotide eingebaut. Dadurch können sie an möglichst vielen Sequenzkombinationen binden.

Diese Methode der DNA-Amplifikation wurde für alle paint-Sonden verwendet.

In dieser Arbeit wurden 6MW-DOP-Primer von Europhin verwendet

Benötigtes Material
6MW Primer: 5`CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-`3
PCR Amplifikat aus der sekundären PCR
10x CETUS II-Puffer (Perkin Elmer)
dNTPs-Mix (je 5mM dATP, dCTP, dGTP und 2mM dTTP)
MgCl <sub>2</sub>
Markierte dUTP
H <sub>2</sub> O bidest
Taq-Polymerase
0,5ml Eppendorf-Tubes
Thermocycler

Methode:

1. Reaktionsgemisch in Eppendorf-Tube ansetzen

10µl Puffer

10µl 6MW-Primer (17µM)

4µl dNTP-Mix

2µl DNS

34µl Wasser

1µl Taq-Polymerase

2. je 30µl in ein Eppendorf-Tube geben.

3. Die PCR nach folgenden Bedingungen laufen lassen:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3Minuten
8	Denaturierung	94°C	1Minuten
	Primeranlagerung	30°C	1Minuten
	Extension	72°C	2Minuten
30	Denaturierung	94°C	1Minuten
	Primeranlagerung	30°C	1Minuten
	Extension	72°C	2Minuten
1	Schluß-Extension	72°C	5Minuten

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 1µl 6x Gel-Ladepuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient  $\lambda$ /HindIII-DNA, von dem ebenfalls 2µl aufgetragen wird.

#### 2.7.4 Markierung von *Alu*-Sequenzen durch Primern

*Alu*-Sequenzen gehören zu den repetitiven DNS-Elementen, genauer gesagt zu den short interspersed nuclear elements (LINEs). Sie liegen bevorzugt in den Introns von Genen.

Aus genomischer DNS wurden nach dem Protokoll von (Lengauer et al., 1992) *Alu*-Sequenzen vervielfältigt.

Benötigtes Material
Primer mit folgenden Sequenzen CL1: (5´ TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G 3´) CL2: (5´CTG CAC TCC AGC CTG GG 3´)
genomische DNS
10x CETUS II-Puffer (Perkin Elmer)
dNTPs, Roche
MgCl <sub>2</sub>
TAMRA-dUTP
Taq-Polymerase
0,5ml Eppendorf-Tubes
Thermocycler

1. Alu-PCR (sekundäre PCR ohne Markierung)

Ansatz für den 1. Mastermix:

CETUS II-Puffer (Perkin Elmer)	5,0µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,0µl
CL1 (20µM)	2,5µl
CL2 (20µM)	2,5µl
dNTP (5mM)	2,0µl
DNS	2,0µl
Taq Pol	0,5µl
H <sub>2</sub> O	35µl
-----	
Endvolumen	Σ 50µl

PCR Bedingungen für die 1. PCR:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3Minuten
30	Denaturierung	94°C	1Minuten
	Primeranlagerung	56°C	1Minuten
	Extension	72°C	2Minuten
1	Schluß-Extension	72°C	5Minuten

2. Alu-label-PCR

Ansatz für den Mastermix:

CETUS II-Puffer (Perkin Elmer)	5,0µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4,0µl
CL1 (20µM)	3,0µl
CL2 (20µM)	3,0µl
ACG-Mix (2mM)	2,5µl
dUTP (1mM)	4,0µl
TAMRA-dUTP (1mM)	3,0µl
DNS aus der 1.PCR	2,0µl
Taq Pol	0,5µl
H <sub>2</sub> O	23µl
-----	
Endvolumen	Σ 50µl

PCR Bedingungen für die 2. PCR:

Zyklen	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Start-Denaturierung	96°C	3Minuten
30	Denaturierung	94°C	1Minuten
	Primeranlagerung	56°C	1Minuten
	Extension	72°C	30sec
1	Schluß-Extension	72°C	5Minuten

Im Anschluss an die PCR werden jeweils 2µl Amplifikat mit 1µl 6x Gel-Ladepuffer auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Marker dient λ/HindIII-DNA, von dem ebenfalls 2µl aufgetragen wird.

#### Ansetzen des *Alu*-Hybridisierungsmixes

Benötigtes Material
<i>Alu</i> -Markierungs-PCR-Produkt
humane Cot DNS
Formamid
Mastermix (= 20% Dextransulfat in 2xSSC)
Vacuumkonzentrator
heizbarer Schüttler

50µl des *Alu*-PCR-Produktes mit 5µl Cot DNS und dem 2,5 fache Volumen 100% EtOH Fällen. Das Pellet in dem Vakuumkonzentrator trocknen, in 6µl FA resuspendieren und 6µl Mastermix (20%Dextransulfat in 2xSSC) zugeben.

#### 2.7.5 Ethanolfällung der DNS für FISH

Für ein 2D-FISH-Experiment werden 400ng, für ein 3D-FISH Experiment 600ng der nicktranslatierten DNA-Sonde benötigt. Zum besseren Ausfällen der DNS-Sonde wird Salmon Sperm als Träger-DNS dazugegeben, die repetitiven Sequenzen werden mit Cot1-DNA abgedeckt. Bevor die markierte Sonden-DNS hybridisiert werden kann, reinigt man sie durch eine Ethanolfällung auf. Nach dem Ausfällen wird die DNS zentrifugiert, das Pellet im Vakuum getrocknet und in Formamid gelöst. Dadurch sinkt die Denaturierungstemperatur. Um das Volumen zu vergrößern ohne die DNS-Konzentration zu verändern, gibt man Dextransulfat hinzu.

benötigtes Material
Bluestain
Humanes Cot-1-DNA
Ethanol (100%)
Formamid (100%) Gefrierschrank $-20^{\circ}\text{C}$
Mastermix (20% Dextransulfat in 2x SSC)
Salmon Sperm DNA
markierte Sonden DNA (in 10 $\mu\text{l}$ Hybridisierungsmix $\sim 250$ ng DNA)
Thermoschüttler $40^{\circ}\text{C}$
Vakuumentrifuge Zentrifuge

#### Methode:

1. nicktranslatierte Sonden-DNS je nach Konzentration zugeben
2. Cot1-DNA zur Absättigung repetitiver Sequenzen in 20 – 50fachem Überschuss zugeben
3. eventuell 1 $\mu\text{l}$  Salmon Sperm DNS zugeben
4. eventuell 1 $\mu\text{l}$  Bluestain hinzugeben, um Pellet leichter sichtbar zu machen
5. 2,5fache Menge an 100% Ethanol hinzugeben ([Sonden+SS+Cot1] $\times 2,5$ )
6. den Ansatz für mindestens 30 Min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fällen
7. 20 Minuten bei 13000rpm zentrifugieren und Überstand vorsichtig abnehmen
8. Pellet in Vakuumentrifuge trocknen lassen
9. 2,5 $\mu\text{l}$  Formamid hinzugeben und auf dem Thermoschüttler bei  $40^{\circ}\text{C}$  lösen
10. 2,5 $\mu\text{l}$  Mastermix hinzugeben und vortexen

Der Hybridisierungsmix kann für mehrere Monate bei  $-20$  gelagert werden.

#### 2.7.6 Chromosomen in situ Suppressions-Hybridisierung (CISS)

Alle Experimente wurden unter Suppressionsbedingungen (CISS **C**hromosomen **i**n **s**itu **S**uppressions-Hybridisierung) durchgeführt. Da es im menschlichen Genom viele unspezifische Sequenzen gibt, vor allem Satelliten-DNS (zentromerische alphaide DNS), SINEs (z.B. *Alu*-repeats) und LINEs (z.B. L1-Familie), müssen diese durch Vorhybridisierung mit unmarkierter  $C_0t1$ -DNS unterdrückt werden.  $C_0t1$ -DNS ist eine Fraktion all dieser repetitiven Sequenzen. Sie wird im Überschuss dazugegeben und bindet aufgrund ihrer raschen Reaktionskinetik zuerst.

## 2.8 2D-FISH

Hier hybridisiert man die Sonden-DNS auf Metaphase-Chromosomen.

<b>Benötigtes Material</b>	
<b>Denaturierung und Hybridisierung:</b>	<b>Waschen und Detektion:</b>
Deckgläser (15x15mm/20x20mm)	Lichtschutz für Küvette
Fixogum	Antikörper (je nach Detektionsschema)
Hotblock 75°C	BSA-Blocklösung (4% BSA in 4x SSC/T)
Hybridisierungsmix	Objektglas mit Metaphsen
Metallbox	DAPI-Lösung (5 µg/ml)
Metaphasepräparate	Glasküvette
Phasenkontrastmikroskop	Nagellack
Pinzette	Pinzette
Wasserbad 37°C	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 gespreiteten Metaphasen suchen
2. 3µl Hybridisierungsmix auftragen
3. Deckglas auflegen und mit Fixogum versiegeln
4. Fixogum an einem dunklen Ort vollständig trocknen lassen
5. Präparate für 2 Minuten bei 76°C auf dem Hotblock denaturieren
6. Inkubation über Nacht in Metallbox bei 37°C im Wasserbad
7. Fixogum und Deckglas mit einer Pinzette entfernen
8. nicht gebundene DNA-Sonden abwaschen:
  - 3x 5 Minuten in 2x SSC bei 37°C auf dem Schüttler waschen
  - 2x 5 Minuten in 0,1x SSC bei 62°C waschen
  - kurz in 4x SSC/T geben
9. mit einer 4% BSA-Blocklösung für 10 Minuten blocken

- 
10. Detektion erster Layer:
    - Antikörper in 2% BSA-Blocklösung verdünnen
    - 200µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben
    - 30 Minuten inkubieren
  11. Antikörper durch 3x 5 Minuten Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen
  12. Detektion zweiter Layer
    - Antikörper in BSA-Blocklösung verdünnen
    - 200 µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben
    - 30 Minuten inkubieren
  13. Antikörper durch 3x 5 Minuten Waschen in 4x SSC/T bei 37°C entfernen
  14. DAPI-Gegenfärbung:
    - DAPI-Lösung herstellen: 0,02µg/ml 4x SSC/T
    - 200µl der DAPI-Lösung auf den Objektträger geben 5 Minuten inkubieren
    - unter destilliertem Wasser gut abspülen
    - vollständig trocknen lassen (im Dunklen)
    - mit einem Tropfen Vectashield beschichten
    - Deckglas auflegen und mit Nagellack versiegeln

## 2.9 3D-FISH

Hier hybridisiert man die Sonden-DNS an Ziel-DNS in Interphasekernen. Die Zellen müssen hierfür speziell fixiert werden, damit die dreidimensionale Struktur im Zellkern erhalten bleibt. Im Großen und Ganzen ist das Protokoll für 3D-FISH das Gleiche wie für 2D-FISH, man muss nur darauf achten, dass die Präparate nicht austrocknen.

<b>Benötigtes Material</b>	
<b>Denaturierung und Hybridisierung:</b>	<b>Waschen und Detektion:</b>
Deckgläser mit den fixierten Zellen in 50% Formamid in 2x SSC	Lichtschutz für Küvette
Deckgläser 18x18mm	Antikörper
Fixogum	(je nach Detektionsschema)
Hotblock 75°C	BSA-Blocklösung
	4% BSA in 4x SSC/T und
	4% BSA in 1xPBS/0,01% Tween
Hybridisierungsmix	DAPI-Lösung (5 µg/ml)
Kleenex	Deckglas 24x60mm
Metallbox	Feuchte Kammer
Phasenkontrastmikroskop	Glasküvette
Pinzette	Nagellack
Quadriperm	Objektträger
Wasserbad 37°C	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

### Methode:

1. Auftragen der Sonde auf ein 3D-Präparat
2. 4,5µl HybMix auf das Slide geben, das Zellareal umgekehrt darauf legen und die Flüssigkeit um das Deckglas herum abtupfen
3. mit Fixogum versiegeln und an einem dunklen Ort vollständig trocknen lassen
4. 3 Minuten auf dem Hotblock bei 76°C denaturieren
5. Inkubation für mindestens 2 Nächte in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad

6. nicht gebundene DNA-Sonden abwaschen
  - 3x 5 Minuten in 2x SSC bei 37°C auf dem Schüttler waschen
  - 2x 5 Minuten in 0,1x SSC bei 62°C waschen
  - kurz in 4x SSC/T geben
7. 10 Minuten mit 4% BSA-Blocklösung (in 4x SSC/T) blocken
8. Detektion erster Layer
  - Antikörper in BSA-Blocklösung (in 4xSSC/T) verdünnen
  - 200 µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben
  - 30 Minuten inkubieren
9. nicht gebundene Antikörper durch 3x 5 Minuten Waschen in 4x SSC/T bei 37°C abwaschen
10. Detektion zweiter Layer
  - Antikörper in BSA-Blocklösung (in 4xSSC/T) verdünnen
  - 200µl der Antikörperverdünnung auf den Objektträger geben
  - 30 Minuten inkubieren
11. nicht gebundene Antikörper durch 3x 5 Minuten Waschen in 4x SSC/T bei 37°C abwaschen
12. DNS-Gegenfärbung mit DAPI Lösung mit 0,02µg/ml DNS in 4x SSC, 15 Minuten einwirken lassen, kurz in 4xSSC/T tauchen
  - Sofort mit einem Tropfen Vectashield beschichten
  - Deckglas auflegen und mit Nagellack versiegeln

## 2.10 Mikroskopie

### 2.10.1 Phasenkontrasmikroskopie

Im Phasenkontrastmikroskop können lebende Zellen mikroskopiert werden.

Axiover 40 Zeiss wurde in der Zellkultur verwendet, um das Zellwachstum zu kontrollieren.

Adhärent wachsende Zellen, die sich in der Mitose befinden runden sich ab, die Anordnung der Chromosomen in der Metaphasenplatte und die Zytokinese kann beobachtet werden.

Ebenso ist es möglich in lebenden Zellen den Nukleoli zu sehen.

Nach der Chaetocin Behandlung ist es möglich die Veränderungen des Zytoplasmas und CICC II Chromatin zu erkennen.

Die Zelldichte ist der entscheidende Faktor, ob Zellen mit Chaetocin behandelt werden.

Die Einschätzung des Zellzykluses und des Zellwachstums der Zellpopulation wurde vor der Fixierung durchgeführt. Axiovert 25 fand Anwendung zur Überprüfung der Qualität der Fixierung, zur Beobachtung der Pepsinierung und der Wahl eines möglichst guten Metaphasen Areal.

### 2.10.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Das Epifluoreszenzmikroskop wurde dazu verwendet, um die Qualität der DNS-Sonden auf einer Metaphase und in einem Interphasezellkern zu beurteilen und um 3D-Präparate zu quantifizieren.

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie werden Fluorochrome mit Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Fluorochrome können nur ein definiertes Energiequantum aufnehmen, dadurch gelangen sie auf ein höheres Energieniveau. Beim Rückfall in das ursprüngliche Energieniveau haben die emittierten Photonen eine niedrigere Energie (längere Wellenlänge).

Das Fluoreszenzmikroskop hat zwei Sperrfilter und einen zweifarbigen Spiegel. Um die verschiedenen Fluoreszenzsignale von einander trennen zu können, benötigt man mehrere Filter. Der Anregungsfilter lässt nur Licht mit der gewünschten Wellenlänge durch. Dieses Licht wird über einen dichromatischen Strahlenteiler auf das Präparat reflektiert. Über den Emissionsfilter gelangen emittierte Photone mit einer definierten Wellenlänge zum Detektor. Liegen die emittierten Photone im sichtbaren Bereich, dann kann das Präparat direkt im Okular betrachtet werden, infrarotes Licht hingegen (Cy5) kann nur am Bildschirm visualisiert werden.

TAMRA und TexRed konnte im Okular im Cy3 Kanal unterschieden werden, allerdings werden beide Rottöne in einem Bild abgespeichert.

Fluorochrom	Anregungs- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Anregungsfilter (BP) Strahlenteiler (FT) Emissionsfilter (LP)
DAPI	355nm	450nm	BP365 FT395 LP450-490
FITC	495nm	520nm	BP450-490 FT510 LP515-565
Cy3/TAMRA	550nm	570nm	BP546 FT580 LP590
Cy5	649nm	670nm	BP575-625 FT645 LP660-710

Die Bilder wurden im 8-Bit Format abgespeichert und in Adobe Photoshop 6.0 weiter bearbeitet. Über das Fluoreszenzmikroskop kann man einen dreidimensionalen Eindruck über eine Zelle und deren Zellkern bekommen. Jedoch ist diese Methode ungenau, auch wenn man das Mikroskop auf eine bestimmte Z-Ebene einstellt, werden immer auch andere Teile unterhalb und oberhalb der Fokusebene beleuchtet. Das Licht, das aus diesen Ebenen zurückkommt macht das Bild unscharf. Dieses Problem wird in der konfokalen Mikroskopie umgangen, in dem es emittierendes Licht aus anderen Ebenen ausblendet. Dies geschieht durch eine *konfokale* Anordnung zweier Lochblenden.

### 2.10.3 konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Das konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop (CLMS) wurde zur Analyse der komplexen dreidimensionalen Anordnung von Chromosomen, Genen, Histonmarkern und Zellkernorganellen in humanen Fibroblasten und in humanen Granulozyten verwendet.

Die Optik eines CLMS entspricht der eines Fluoreszenzmikroskops. Es gibt jedoch zwei bedeutende Unterschiede – das Licht wird durch 2 Lochblenden geschickt und es ist heller (bzw. hat mehr Energie), da Laser eingesetzt werden.

Eine Lochblende befindet sich direkt hinter dem Laser, sie fokussiert das Licht auf einen einzigen Punkt (Fokuspunkt) in einer bestimmten Tiefe des Präparates. Da nur ein ganz kleiner Punkt beleuchtet wird, muss das Licht besonders hell sein.

Die zweite Lochblende befindet sich direkt vor dem Detektor und sie ist zur ersten *konfokal*, d.h. sie ist brennpunktsgleich zum fokussierten Lichtstrahl. Über die zwei Lochblenden wird sichergestellt, dass nur ein Punkt im Präparat beleuchtet wird und auch nur das emittierende, fluoreszierende Licht aus diesem Fokuspunkt den Detektor erreicht. Licht unter- oder überhalb der Fokusebene wird nicht erfasst. Auf diese Weise wird eine Fokusebene Punkt für Punkt abgerastet und die Daten der einzelnen Punkte als 2-D Bild rekonstruiert. Die Fokusebene kann in der z-Richtung verschoben werden, die Auflösungsgrenze ist bei 400nm erreicht. Die Serie solcher optischen Schnitte, aus verschiedenen Tiefen des Zellkerns wurde in ImageJ zu einem komplexen dreidimensionalen Bild rekonstruiert.

Das Besondere an diesem Mikroskop ist, dass es über verschiedene Laser mit verschiedenen Anregungsmaxima verfügt, die gleichzeitig über akustooptische Ablenkung auf das Präparat gelenkt werden. Es kann das emittierte Licht mehrere verschiedener Fluorochrome gleichzeitig aufgenommen werden. Liegt die Emissionswellenlänge zweier Fluorochrome nahe beieinander, kann das Spektrum der Bandbreite reduziert werden. Außerdem kann die Laserstärke manuell stufenlos eingestellt werden. Man sollte allerdings darauf achten, dass sie möglichst gering ist. Auch die Empfindlichkeit des Detektors kann verändert werden, so dass störender Hintergrund minimiert wird.

#### Angewandte Parameter:

Die **Accumulation (Average)** beschreibt die Anzahl der Rasterdurchgänge pro Fokusebene. Je höher die Average ist, desto besser ist die Auflösung und desto mehr bleicht das Präparat aus. Deshalb wurde bei den meisten Präparaten eine Average von zwei Durchgängen gewählt. Die Filter wurden je nach verwendeten Fluorochromen gewählt und die Intensität individuell eingestellt. Es wurde eine Sequentiell Scanning eingestellt. Das bedeutet, es werden alle Fluorochrome einer Schärfenebene aufgenommen und dann der Z-Tisch ein wenig weiter verschoben.

Angewendete **Filter**:

Fluorochrom	Laser	Wellenlänge
DAPI	UV-Laser	405nm
FTIC	Argon-Laser	488nm
Cy3/Tamra	Ar-Laser	568nm
TexasRed	HeNe-Laser	594nm
Cy5	HeNe-Laser	633nm

Als **Format** wurde 512x512 Pixel gewählt.

Die Helligkeit (PMT) und der Kontrast (Offset) wurden für jeden Zellkern einzeln eingestellt. Dadurch werden störende Hintergrundsignale minimiert.

Als **Objektiv** wurde immer ein Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv verwendet.

Der Scan-Speed ist das Maß für die Belichtungszeit.

Als **Schnittdicke** wurden 200nm und die **xy-Voxelsize** wurde mit 50nm gewählt.

## 2.11 Software für die Bildverarbeitung

### 2.11.1 ImageJ

ImageJ wurde zur Erstellung von RGB-Projektionen, zur Vorbereitung von eADS-Stacks und zur Ermittlung von BAC-Zentren verwendet. Die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bilder liegen in einem Stapel für alle Kanäle vor. Diese Bilderserie wird über die Funktion Plugins - StackGroom - Shift Corrector in einzelne Fluoreszenzkanäle geteilt, der chromatische Shift korrigiert und separat abgespeichert.

Das Signal / Hintergrund Verhältnis wurde durch Image - Adjust - Brightness/Contrast und Prozess - Filter - Gaussian Blur optimiert. RGB-Projektionen und Montagen wurden mit Plugin - StackGromm - 3 channels erstellt.

Die RGB-Projektionen wurden in Adobe Photoshop 7.0 zu Bildgalerien weiter verarbeitet.

Um die BAC-Signale in Bezug zum Chromosomen Territorium zu messen, wurden die CTn und ihre BAC Signale großzügig voneinander separiert. Hierzu wurde die Signale großzügig eingekreist und über Edit - clear outside separiert.

Das eADS Programm arbeitet Threshold abhängig, dieser wurde über ImageJ - Adjust - Threshold ermittelt und notiert.

Anschließend wurden Masken für den Zellkern und die Territorium erstellt. Dadurch wird die Pixelzahl verringert, dies führt zu einer geringeren Datenmenge und somit zu einem schnelleren Ergebnis. Außerdem wurde der zuvor ermittelte Threshold eingegeben und der jeweilige Kanal mit einem Gitter gleicher Slide-Anzahl multipliziert.

Nach dem konfokalen LSM wurde die Bilderserie mit Hilfe des ImageJ Programms in einzelne Stacks zusammengefasst. Dabei entspricht ein Stack einem Fluoreszenzsignal.

Wenn man die Strecke zwischen zwei BAC Signalen ermitteln will, kann man dies nicht mit dem Programm Distangles berechnen lassen. Die Strecke zwischen zwei BAC Signalen wurde mit ImageJ und Excel ermittelt. Zuvor musste das aktive vom inaktiven X-Chromosom getrennt werden, in dem die Signale vom Drumstick von denen im Granulozyten Zellkern getrennt wurden. Anschließend wurde das dreidimensionale Zentrum (x,y,z) eines Fluoreszenzsignals mit ImageJ ermitteln und die Koordinaten von Xp11 und Xq25 in einer Excel Tabelle gesammelt.

Diese Originaldaten wurden in ImageJ geöffnet, ein Threshold gesetzt und über die Funktion 3D-Objekt Zähler das Zentrum eines BACs (xyz Koordinaten).

Über die x/y/z-Koordinaten (=Vektoren) konnte und mit einer programmierten Excel-Tabelle wurden die tatsächlichen physikalische Distanz zwischen den Zentren der BACs ermittelt.

Wenn man über die nuklären Distanzen verfügt, ist es möglich den Winkel zwischen den BACs zu ermitteln. Hierzu wurde die folgende Formel verw  $\cos \beta = \frac{a^2 + b^2 + c^2}{2 \times a \times b}$

### 2.11.2 Adobe Photoshop 7.0

Mit Adobe Photoshop hat man sehr viele Möglichkeiten, Bilder zu bearbeiten.

Mit Adobe Photoshop 7.0 können Falschfarben neu zuordnen, Helligkeit und Kontrast optimiert werden, wodurch ist es möglich ist, das Verhältnis von Signal und Hintergrund zu optimieren. Diese Software wurde hauptsächlich, für die Nachbearbeitung von 2D-Metaphasenbildern verwendet, sowie zur Erstellung von 3D –Bildgalerien.

### 2.11.3 Amira

Mit dem Programm Amira (Version 3.0 TGS) wurden von ausgewählte Zellkernen 3D-Rekonstruktionen erstellt. Die Zellkerne konnten von allen Seiten betrachtet werden und mit den erhaltenen eADS Daten verglichen werden.

## 2.12 Quantitative Auswertungsmethoden

### 2.12.1 Auswertung mit ADS (absolute distances to surface) EDMT v.1.07a

Um das Programm starten zu können, muss zunächst eine Parameterdatei für das Experiment erstellt werden. Ein Beispiel einer Parameterdatei befindet sich im Anhang.

Die Parameterdatei wird mit eADS-Filemaker erstellt und enthält die Parameter:

Pfad zu den Bildern, Speicherpfad, Kernbilderzahl, Voxeldimension, Signalschwelle, Schalendicke, Objekt Threshold, Anzahl und Definition einzelner Kanäle, Referenzkanal, Skalierung der Klassen, Präfix und Suffix für die Kanäle und den Startkern.

Nach dem Start des Programms werden aus der Parameterdatei die für das Experiment spezifischen Daten eingelesen. Anschließend werden sequenziell die Bildstapel (Kerne) eingelesen und die Bilddaten in eine Matrix zwischen gespeichert. Auf diese Matrix wird die zuvor eingegebene Parameterdatei angewendet.

Die ADS-Software ermittelt den kürzesten Abstand eines Signals zur Oberfläche eines beliebigen Objektes, dieser kann sowohl innerhalb als auch außerhalb der Gegenfärbung liegen. Es wurde verwendet um die Lage von BAC-Sonden, Histonmodifikationen und Zellkernorganelle in Bezug zum Zellkernrand, zu den Territorien, zu den CICC's und zu den CTn quantitativ zu bestimmen. Entwickelt wurde es von *Dr. J. v. Hase* (Kirchhoff Institut für Physik, Heidelberg). Das Programm wurde in C++ geschrieben und läuft unter Linux in der Khoros Software Umgebung. Später wurde es von *Tobias Thormeyer* optimiert, so dass bereits nach wenigen Stunden Ergebnisse vorlagen. Das eADS Programm wurde in der Entwicklungsumgebung von MATLAB v7 (Mathworks) in C/C++ geschrieben, es ist unter Windows, Linux und Macintosh lauffähig. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte erklärt.

Hintergrundreduzierung: Dieser kann über einen Schwellwert (TH) und über eine Mindestobjektgröße reduziert werden. Das eADS-Programm arbeitet Schwellwert abhängig. Dieser wurde vom Anwender für jedes Objekt in ImageJ über die Funktionen Image-Adjust - Brightness/Contrast selbst festgelegt.

Weiterhin kann der Hintergrund durch die Angabe einer Mindestobjektgröße reduziert werden, d.h. alle Voxel, deren Wert unterhalb dieses Wertes liegen werden gelöscht, d.h. ihre Voxel werden auf Null gesetzt.

Parameterdatei: Das eADS Programm liest die Parameterdatei ein und bereitet die Stacks der einzelnen Kanäle vor, in dem er den Threshold setzt und alle Objekte, die kleiner als die Mindestobjektgröße sind löscht. Von den nun erkannten Objekten wird der Abstand zueinander gemessen, indem der kürzeste Abstand aller Voxel eines Fluoreszenzkanals zur Oberfläche (Zellkern, CT) gemessen wird. Das Signal kann sowohl innerhalb, als auch

außerhalb der Gegenfärbung liegen. Außerdem werden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Alle Ergebnisse sind in einer Auswertungsdatei *asc* zu finden. Diese kann mit Excel geöffnet werden und die erhaltenen Datensätze mit Sigma Stat 3.0 auf Signifikanz überprüft werden.

### 2.12.2 Auswertung mit Distangles

Das Programm Distangles wurde von Tobias Thormeyer entwickelt und wird in der Dissertation von Grasser Florian (2008) beschrieben. Um das Programm starten zu können muss eine Parameterdatei erstellt werden. Ein Beispiel hierfür befindet sich im Anhang.

Distangles misst Distanzen zwischen zwei Kanälen, indem es zuerst die Intensitätsschwerpunkte der Signale (eines BACs oder eines BAC-Pools) bestimmt und anschließend die Strecke zwischen ihnen misst. Um das Programm anwenden zu können, müssen für alle Kanäle/Stacks Schwellwerte gesetzt werden und diese und die Voxeldimensionen in einer Parameterdatei (Beispiel im Anhang) gesammelt werden. Das Programm berechnet die Distanzen und die Winkel zwischen den Kanälen.

### 2.13 quantitative Auswertung und Statistik

Das Programm Sigma Stat 3.0 (Aspire Software International, Leesburg, Virginia, USA) wurde verwendet, um die durch eADS erhaltenen Datensätze, sowie die durch Distangles erhaltenen physikalischen Distanzen zwischen den BACs auf Signifikanz zu überprüfen.

Die einzelnen Kanäle von unbehandelten Fibroblasten wurden mit denen von Chaetocin behandelten Fibroblasten, das aktive X-Chromosom mit dem inaktiven X-Chromosom (=Drumstick) und das genreiche mit dem genarmen Chromatin verglichen. Hierbei wurde der *Rank Sum Test* (=U-Test) verwendet, dabei wurde prinzipiell angenommen, die Daten seien nicht normal verteilt. Der U-Test basiert auf dem Vergleich von Rangsummen, in dem Werte einer Gruppe der Größe nach zugeordnet werden und mit einem kritischen Wert verglichen werden. Wurden 3 Kanäle innerhalb eines CTn verglichen, wurde *ANOVA on Ranks* verwendet.

Der **P-Wert** (= Irrtumswahrscheinlichkeit) gibt an, ob zwischen Parametern (z.B. Gendichte und Lokalisation im Zellkern) ein Zusammenhang besteht oder nicht.

Um einen statistischen Test durchzuführen braucht man zuerst eine Nullhypothese, d. h. es besteht kein Zusammenhang. Habe ich nun einen P-Wert von 0,001 erhalten, dann bedeutet dies, würde die Nullhypothese existieren, müsste der Test 1000 mal durchgeführt werden, um ein weiteres mal die gleiche radiale Verteilung von genreichen und genarmen Regionen zu erhalten. Daraus kann geschlossen werden, dass die Verteilung dieser Regionen im Zellkern nicht zufällig ist.

P-Werte die nicht unter, aber nahe an  $p=0,05$  liegen, deuten auf einen biologischen Effekt hin. In diesem Fall ist es angebracht noch mehr Daten zu sammeln. Dadurch kann sich die Signifikanz bestätigen oder endgültig von dem Signifikanzniveau wegbewegen.

Ein P-Wert unter 0,05 wird als signifikant und unter 0,01 als hochsignifikant bezeichnet.

Sigma Stat 3.0 gab das Resultat in Textform aus und gab an, wie sich die Datensätze zum Signifikanzniveau  $p=0,05$  verhalten. Das Ausgabeergebnis von SigmaStat wurde als .txt Datei gesichert.

## **3 E R G E B N I S S E**

### **3.1 Zusammensetzungen der DNS-Sonden**

Für die vorliegende Doktorarbeit wurden ausschließlich BAC-Sonden verwendet, welche bereits in der Arbeitsgruppe Cremer etabliert sind, d.h. es wurden bereits vorhandene DNS-Sonden verwendet, um die Chromatinanordnung in Zellkernen mit einem CICC-Phänotyp zu untersuchen. Außerdem wurden dieselben DNS-Sonden auf segmentierten, unstimulierten, weiblichen Granulozyten-Zellkernen getestet, um deren radiale Chromatin-Organisation zu beurteilen.

Deshalb wird die Zusammensetzung der BAC-Pools in kurz zusammengefasster Form dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der BAC-Pools kann in den Dissertationen von Dorothee Biener (für das Chromosom 1), Kathrin Teller (für das Chromosom X) und Katrin Küpper (für das Chromosom 12) nachgelesen werden.

#### **3.1.1 BAC-Sonden für das Chromosom 1**

BAC-Pool Nummer	Chromosomen Bereich	Verwendete BACs Interne Nummer	Größen des Pools	Gene	Gendichte Pro Mb
1 (genarm)	1p31.3 – p31.1	28, 29, 30, 31,32	21Mb	ca. 85	4,0
2 (genarm)	1p31.1 – p31.3	61, 62, 63, 64	11Mb	ca. 30	2,7
3 (genreich)	1p36.21 – p35.2	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	17Mb	ca. 270	15,9
4 (genreich)	1p13.3 – p13.1	39, 40, 41, 42, 43, 44	8Mb	ca. 140	17,5
5 (genreich)	1q21.2 – q23.3	48, 49, 50, 51, 52, 53	12 Mb	ca. 360	30

#### **3.1.2 BAC-Sonden für das Chromosom 12**

BAC-Pool Nummer	Chromosomen Bereich	Verwendete BACs Interne Nummer	Größen des Pools	Gene	Gendichte Pro Mb
1 (genarm)	12p12.3 – p11.22	9, 10, 11, 12, 13, 14	15Mb	ca. 100	6,7
2 (genarm)	12q21.1 – q21.33	30, 31, 32, 33, 34, 35	21Mb	ca. 110	5,2
3 (genreich)	12p13.31 – q12.3	3, 4, 5, 6, 7, 8	10,5Mb	ca. 400	38,1
4 (genreich)	12q13.11 – q13.3	21, 22, 23, 24, 25, 26	11Mb	ca. 345	31,4
5 (genreich)	12q24.11 – q24.32	40, 41, 42, 43, 44, 45, 46	18Mb	ca. 250	13,9

### 3.1.3 BAC-Sonden für das X-Chromosom

Eine Liste der verwendeten BAC-Sonden des X-Chromosoms befindet sich im Anhang und die detaillierte Beschreibung der BAC-Sonden für das X-Chromosom kann in der Dissertation von Teller Katrin 2007 nachgelesen werden.

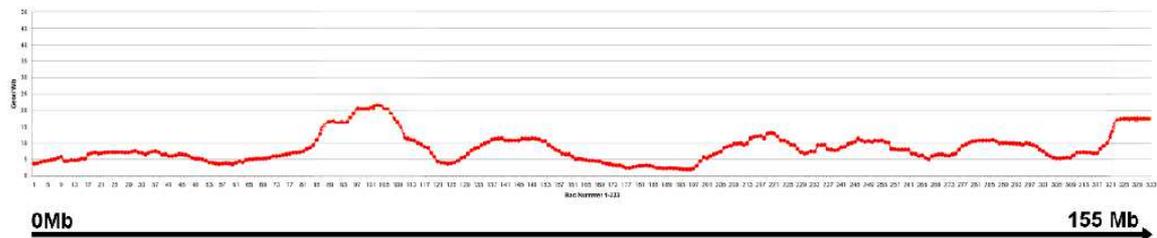


Tabelle 2: Verteilung der BAC-Sonden auf dem X-Chromosom.

Diese Übersicht wurde der Dissertation von Teller Katrin entnommen. Dargestellt ist die 10Mb-Gendichte der einzelnen BACs (rote Linie).

#### BAC – Pool 1,2,3,4

Das erste Experiment betrachtet die Struktur und den Kondensationsgrad des X-Chromosoms unabhängig von der Gendichte und des Expressionsprofils. Hierzu wurden der p-Arm und der q-Arm in gleich große Teile untergliedert. Dieses Experiment wurde von Kathrin Teller an humanen Fibroblasten durchgeführt. Daher waren die 10Mb-Pools in Form von isolierter DNS bereits vorhanden.

Der P-Arm besteht aus Pool 1 und Pool 2, jeder Pool beinhaltet ca. 30Mb. Der Q-Arm besteht aus Pool 3 und Pool 4, jeder Pool beinhaltet ca. 50Mb. Im Anhang befindet sich eine Auflistung der einzelnen BACs mit ihrer internen ID-Nummer.

BAC-Pool	Chromosomen Bereich	Größen des Pools
1	1-30Mb	30Mb
2	31-60Mb	30Mb
3	61-100MB	50Mb
4	101-155mB	50Mb

### Radiale Verteilung der RIDGES und genarmer Bereiche des X-Chromosoms

In diesem Experiment wurden die radiale Verteilung der beiden RIDGES sowie zwei genarme Regionen untersucht.

Verteilung der BAC-Pools: genarm tail (1-20Mb)  
Xp-RIDGE (31-40Mb)  
Xq-RIDGE (Telomer-Region)  
genarm Mitte (61-120Mb)

BAC-Pool	Chromosomen Bereich	Größen des Pools	Gendichte Pro Mb
Genarm p-Arm	1-20Mb	20Mb	6,2
RIDGE p-Arm	31-40Mb	9Mb	18,4
Genarm q-Arm	61-120Mb	59Mb	5,8
RIDGE q-Arm	Telomer-Region	6MB	16,2

### Xp11 und Xq25

Untersucht werden soll die radiale Verteilung einer extrem genreichen und extrem genarmen Region. Die genreiche Region befindet sich auf Xp11 (von 46.52Mb bis 49.46Mb), sie liegt innerhalb des RIDGE und besteht aus acht BACs. Die genarme Region befindet sich auf Xq 25 (von 121.31Mb bis 125.90Mb) und beinhaltet ebenfalls acht BACs.

### Durchführung der Experimente

Die in dieser Arbeit verwendeten BACs waren bereits im Labor von Professor Cremer vorhanden, meist in Form von isolierter DNS. Diese wurden zunächst mit GenomiPhi amplifiziert (2.7.1) und durch eine Nick Translation (2.7.2) markiert.

Um die Qualität der Sonden zu testen und eventuelle Kreuzhybridisierungen auf andere Chromosomen auszuschließen, wurde eine 2D-FISH-Testhybridisierung auf humanen Metaphasen menschlicher Lymphozyten durchgeführt. Um ausreichend starke Signale zu erreichen, wurden ca. 200ng DNS pro Hybridisierungsmix eingesetzt.

## **CHAETOCIN EXPERIMENTE**

### **3.2 Chaetocin-induzierte Chromatin-Reorganisation der Zellkernarchitektur**

Der erste Teil der Doktorarbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Chaetocin, einem Epipolythio-Dioxopiperazin auf die Zellkernarchitektur von humanen Fibroblasten.

Dieser Teil untergliedert sich in zwei weitere Bereiche:

Teil I: Es wird der Phänotyp von Chaetocin induzierten Veränderungen der Zelle von der Apoptose, dem oxidativen Stress und der Seneszenz abgegrenzt.

Teil II: Im zweiten Teil wird untersucht, wie der Zellkern organisiert ist, d.h. es werden die Fragen beantwortet, „welche funktionellen Räume entstehen nach einer Chaetocin-Induktion?“, d.h. „was befindet sich innerhalb bzw. außerhalb der CICC?“ und „wie ist das Chromatin in Bezug zum Cluster und zum Zellkernrand organisiert?“

## **CHAETOCIN Teil I**

### **3.2.1 CICC-Induktion**

Chaetocin induziert in humanen Fibroblasten eine Chromatin-Kondensation.

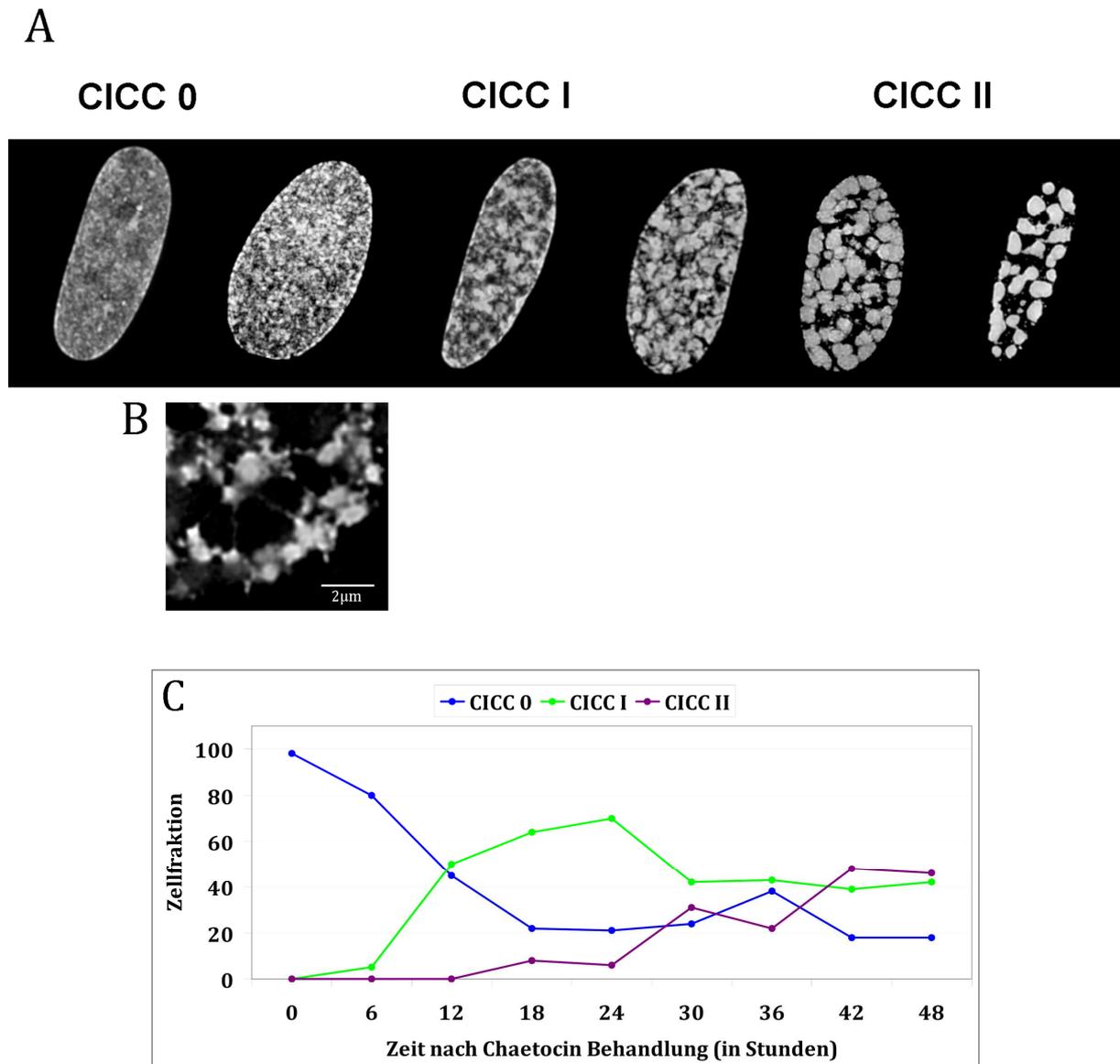
Diese ist zeit- und dosisabhängig. Um den Verlauf der Clusterbildung nachzuvollziehen, mussten Standardbedingungen entwickelt werden.

Die Zellen wurden in einem 6-well-chamber auf Deckgläschen 22x22mm kultiviert, bis sie 70% konfluent waren, dies entspricht einer Zellzahl von ca.  $2 \times 10^5$  Zellen.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit 1xPBS gewaschen und mit 4ml neuem Medium versetzt, welches  $0,01 \mu\text{M}$  Chaetocin enthielt.

Nach einer zweitägigen Toxinbehandlung wurden die Zellen fixiert und mit DAPI ( $0,02 \mu\text{g/ml}$ ) gefärbt. DAPI hat eine hohe Affinität zu AT-reicher, genamer DNS (Crissman and Hiron, 1994). Anschließend wurden (Abb. 19.A) exemplarisch Zellkerne mit unterschiedlich stark kondensiertem Chromatin an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SP5) mit einer Voxelgröße (xyz) von  $50 \times 50 \times 200 \text{nm}$  aufgenommen, mit ImageJ prozessiert und eine Z-Gesamtprojektion erstellt.

Außerdem wurden Experimente mit Fixierungsintervallen (Abb. 19.C) durchgeführt, d.h. nach der Chaetocin-Behandlung wurden alle 6 Stunden Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und am Epifluoreszenzmikroskop in zufälligen Arealen das Chromatin beurteilt. Hierzu wurden pro Zeitpunkt mindestens 300 Zellkerne ausgezählt, diese in einer Excel-Tabelle übertragen und ein Liniendiagramm erstellt.



**Abb. 19: Hypothetischer Verlauf der Clusterbildung und Klassifizierung der CICCs**

A) In obiger Abbildung 19 handelt es sich um verschiedene Zellkerne, die nach ihrem Kondensierungsgrad geordnet sind. Die DAPI-Färbung ist im ersten Bild unauffällig, im zweiten ist die Heterochromatisierung mit hunderten kleinen Foci (=CICC I) gleichmäßig über den Zellkern verteilt, im dritten und vierten Bild sind deutlich Cluster zu erkennen, die durch Chromatinbrücken miteinander verbunden sind. Im vierten und fünften Bild gibt es keine Chromatinbrücken zwischen den einzelnen Clustern. Im letzten Bild sind einige Cluster miteinander verschmolzen. Je stärker die Heterochromatisierung ist, desto größer wird der „interchromatin space“ in der DAPI-Färbung.

B) Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines lichtoptischen Schnitts durch den Zellkern eines humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion. Die DAPI-Cluster sind durch DNS-Brücken miteinander verbunden. Eine DNS-Fiber kann bis zu 2µm lang sein. Innerhalb der Cluster ist die Intensität der DAPI-Signale unterschiedlich stark ausgeprägt. Die stärkste

Signal-Intensität befindet sich im Zentrum der Cluster und nimmt graduell bis zur Peripherie (=CICC-Oberfläche) ab.

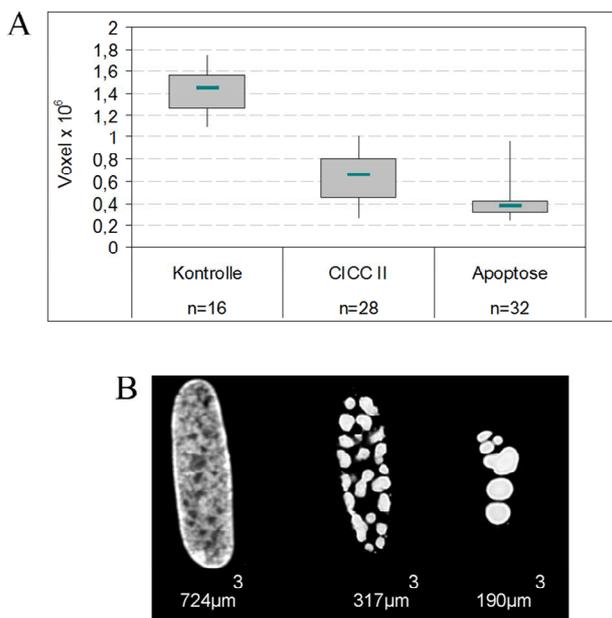
C) Die Fixierungsreihe<sup>5</sup> zeigt die Frequenz der Zellen mit unterschiedlichen Chromatinzuständen (CICC 0, I und II) in Abhängigkeit der Zeit. Zu Beginn der Chaetocin-Behandlung ist das Chromatin unauffällig. Je länger die Toxin-Inkubation andauert, desto stärker ist die Heterochromatisierung. Nach 48 Stunden haben 16% unauffälliges Chromatin, 40% CICC-I- und 44% CICC-II-Chromatin.

### 3.2.2 Volumen des Chromatins

Humane Fibroblasten wurde wie in 2.4.1.3 beschrieben kultiviert und mit 0,01 $\mu$ M Chaetocin zwei Tage lang behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen, bei denen Apoptose mit 1 $\mu$ M (Endkonzentration) Staurosporin (4 Stunden) induziert wurde (Kabir et al., 2002). Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA in 1xPBS fixiert, mit DAPI gefärbt und am Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SP5) lichts optische Schnitte aufgenommen.

Der 3D-Bildstapel wurde mit ImageJ prozessiert, hierbei wurde darauf geachtet, dass nur Zellkerne ausgewählt wurden, bei denen kein Schwellenwert gesetzt werden musste.

Über die Funktion *3D-objects counter* wurde die Voxelzahl ermittelt und diese in eine Excel-Tabelle eingetragen, die Werte einzelner Zellen aufsummiert, der Median und die Standardabweichung errechnet und mit Excel ein Box-plot erstellt. Durch Multiplikation der Voxel mit dem Voxelvolumen wird das Volumen eines Zellkerns errechnet. Ein Voxel mit der XYZ-Größe von 50x50x200nm hat ein Volumen von 0,05x 0,05 x 0,2 $\mu$ m = 0,0005 $\mu$ m<sup>3</sup>.



**Abb. 20: Chromatin-Volumen**

Die Abbildung 20 zeigt das Chromatin-Volumen von humanen Fibroblasten mit unterschiedlichem Kondensierungsgrad.

A: Ordinate: Voxel Zahl pro Zellkern  
Abszisse: das Chromatinvolumen von unbehandelten humanen Fibroblast, Fibroblasten mit CICC-II-Chromatin und von Apoptose  
grün Querblaken: Mediane

B: Median des Voxel Volumens von humanen Fibroblasten, Zellen mit CICC-II-Chromatin und Apoptosen.

N ist die Anzahl der Zellkerne

<sup>5</sup> Die Fixierungsreihe wurde mit Unterstützung von Frau Dr. Marion Cremer und Frau Heidi Jahn-Henninger durchgeführt.

A) Wird die Verteilung der einzelnen Messwerte und ihre Mediane betrachtet, so ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolle, Zellen mit CICC-II-Chromatin und der Apoptose vorhanden.

B) Das Chromatinvolumen in humanen Fibroblasten beträgt  $724\mu\text{m}^3$ , nach einer Chaetocin-Behandlung  $319\mu\text{m}^3$  und in apoptotischen Zellen  $190\mu\text{m}^3$ .

#### Statistische Auswertung:

Die Signifikanz der Unterschiede des Chromatin Volumens wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test analysiert. Er ergab folgende Werte:

Zellkerne	P-Werte
unbehandeltes Chromatin vs. Chaetocin behandeltes Chromatin	P < 0,001
unbehandeltes Chromatin vs. apoptotisches Chromatin	P < 0,001
Chaetocin behandeltes Chromatin vs. apoptotisches Chromatin	P < 0,001

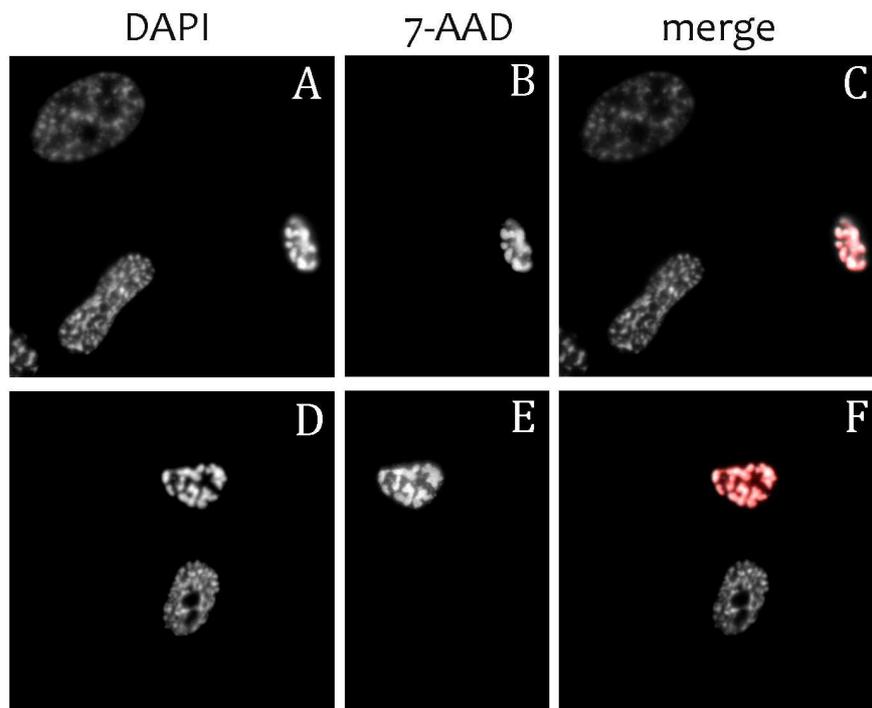
Die in rosa dar gestellten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <1% statistisch signifikant.

### 3.2.3 Abgrenzung zur Apoptose

#### 3.2.3.1 7-AAD (7-Amino-Actinomycin)-Lebendfärbung

Die 7-AAD-Lebendfärbung ist ein Vitalitätstest auf der Basis einer Einzellzellanalyse (Lecoeur et al., 1997). Um die Chaetocin verursachte Kondensation des Chromatins von toten Zellen (Apoptose und Nekrose) abzugrenzen wurde ein 7-AAD-Test wie in 2.4.5.2 beschrieben durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt und das Präparat am Epifluoreszenzmikroskop beurteilt.



**Abb. 21: 7-AAD-Lebend-Färbung**

Die Abbildung 21 zeigt Epifluoreszenzaufnahmen von humanen Fibroblasten nach zweitägiger Chaetocin-Induktion. (A und D) DAPI-Färbung, (B und E) 7-AAD-Färbung, dies entspricht den toten Zellen. (C und F) Überlagerung von DAPI- und 7-AAD-Signalen.

Nur Zellen mit defekter Zellmembran nehmen 7AAD auf, diese interkaliert in die Zellkern-DNS. Da Chaetocin behandelte Zellen eine intakte Zellmembran haben, nehmen sie kein 7-AAD auf. Etwa 5% aller Zellen sind nach einer Chaetocin-Behandlung 7-AAD-positiv. Dabei handelt es sich um Apoptosen oder um sehr späte CICC-II-Stadien. Durch die 7-AAD-Färbung kann eine Apoptose in Zellen, die CICC<sub>2</sub> zeigen, eindeutig ausgeschlossen werden.

### 3.2.3.2 Cleaved-Caspase-3-Markierung

Chaetocin induzierte CICC<sub>2</sub> haben in ihrer Form und Größe Ähnlichkeit mit apoptotischen Zellen; um diese von der Apoptose abzugrenzen, wurde ein weiterer, spezifischer Test, eine Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Cleaved-Caspase-3 durchgeführt (Reis and Edgar, 2004).

Die Zellen wurden wie in 2.4.1.3 beschrieben kultiviert und mit Chaetocin induziert.

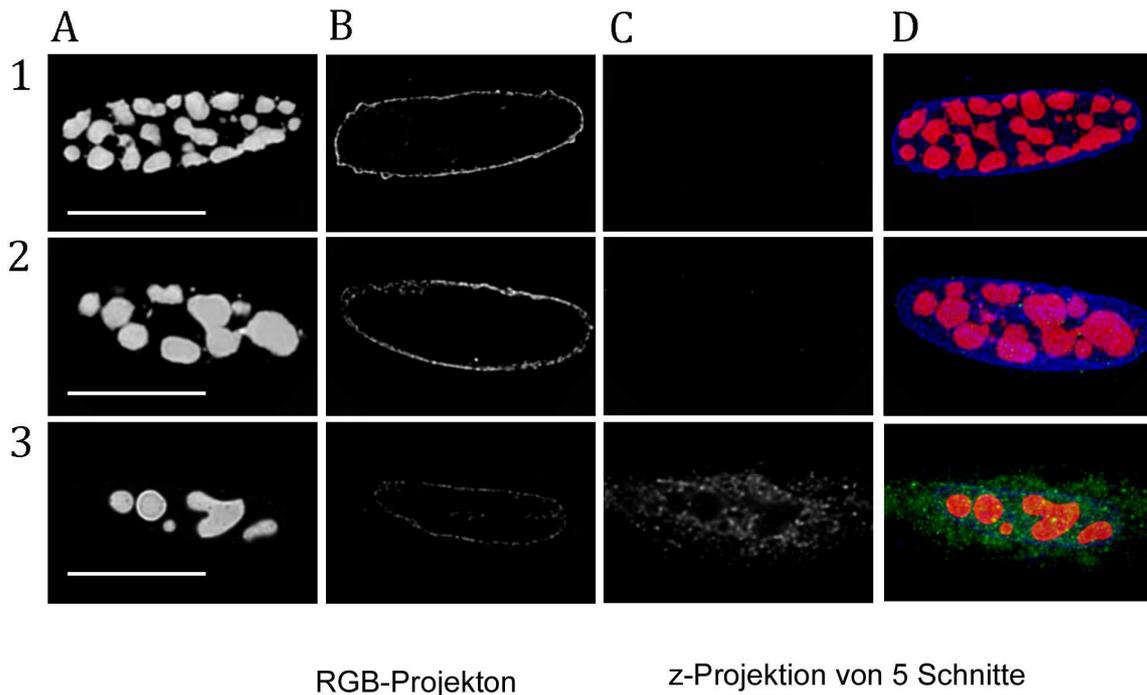
Als Kontrolle wurde in humanen Fibroblasten Apoptose mit Staurosporin (1  $\mu$ M Endkonzentration) 4 Stunden lang eingeleitet.

Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit folgendem Detektionsschema durchgeführt.

An einem Laserscanning Mikroskop wurden exemplarisch Zellkerne aufgenommen, die Daten mit ImageJ prozessiert und RGB-Z-Projektionen erstellt.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
R $\alpha$ cleaved caspase-3	D $\alpha$ R-FITC
G $\alpha$ Lamin-B	D $\alpha$ G-Cy3



**Abb. 22: IF Cleaved-caspase-3**

In der Abbildung 22 sind humane Fibroblasten mit kondensiertem Chromatin zu sehen.

(A-C) Z-Projektion von fünf lichtoptischen Schnitten, die einem  $\mu\text{m}$  entsprechen.

Die Spalte D zeigt eine Gesamtzellprojektion.

In der Spalte A wird die DAPI-Färbung in grau dargestellt, die Spalte B zeigt Lamin-B, die Spalte C die Cleaved-Caspase-3,

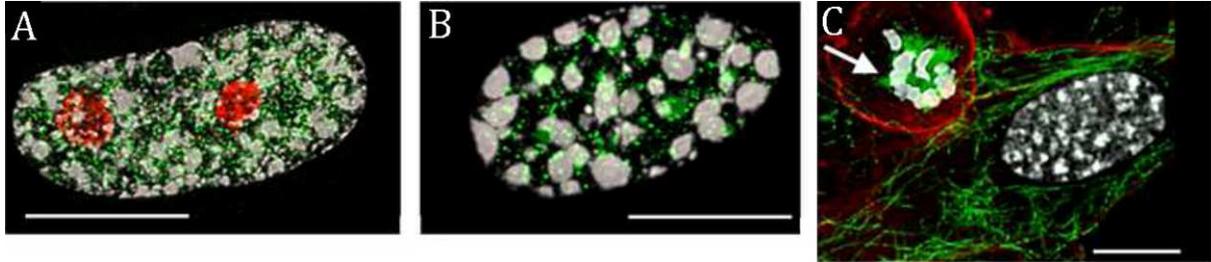
Spalte D Überlagerung der Z-Projektionen des gesamten Zellkerns, Chromatin in rot, Lamin-B in blau und Cleaved-Caspase-3 in grün. Die Zeilen 1 und 2 zeigen Zellkerne, die mit Chaetocin induziert wurden. Die Zeile 3 zeigt eine Apoptose eines humanen Fibroblasten, welcher mit Staurosporin behandelt wurden. Der Scale bar entspricht  $10\mu\text{m}$ .

Wie auf der Abbildung 22 zu sehen ist,

1. sind humane Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion Lamin-B positiv und Cleaved-Caspase-3 negativ. Das bedeutet, dass die Zellen vital sind.
2. sind humane Fibroblasten nach vierstündiger Staurosporin-Behandlung Cleaved-Caspase-3 positiv und beginnen Lamin-B abzubauen.

### 3.2.3.3 Immunfluoreszenz-Markierung von neu gebildeter RNS, Nukleolus, Splicing Speckles, Aktin und Tubulin

Für vitale Funktionen in einer Zelle mit CICC-Phänotyp sprechen auch die Ergebnisse der folgenden Immunfluoreszenz.



#### **Abb. 23: CICC Phänotyp und Zell-Vitalität**

In der obigen Abbildung 23 kann man die Anordnung von RNS und dem Nukleolus in Fibroblasten mit stark kondensiertem Chromatin betrachten.

A-B: humane primäre Fibroblasten (HFb) nach zweitägiger Chaetocin-Behandlung.

A) Markierung von neu gebildeter RNS (grün) und Nukleolus (rot)

B) Darstellung von SC35-Speckles (grün) zwischen geclustertem Chromatin

C) Aktin (rot), Tubulin (grün), der Pfeil markiert eine Mitose.

Der Scale bar entspricht einer Länge von 10µm.

Zellen, die ihr Chromatin in CICC organisiert haben, sind vitale Zellen.

Sie sind überraschenderweise trotz kondensiertem Chromatin weiterhin in der Lage, RNS zu synthetisieren und haben in Form, Größe und Lokalisation scheinbar intakte Nukleoli. Sie besitzen unspektakuläre Splicing Speckles und haben ein Zytoskelett.

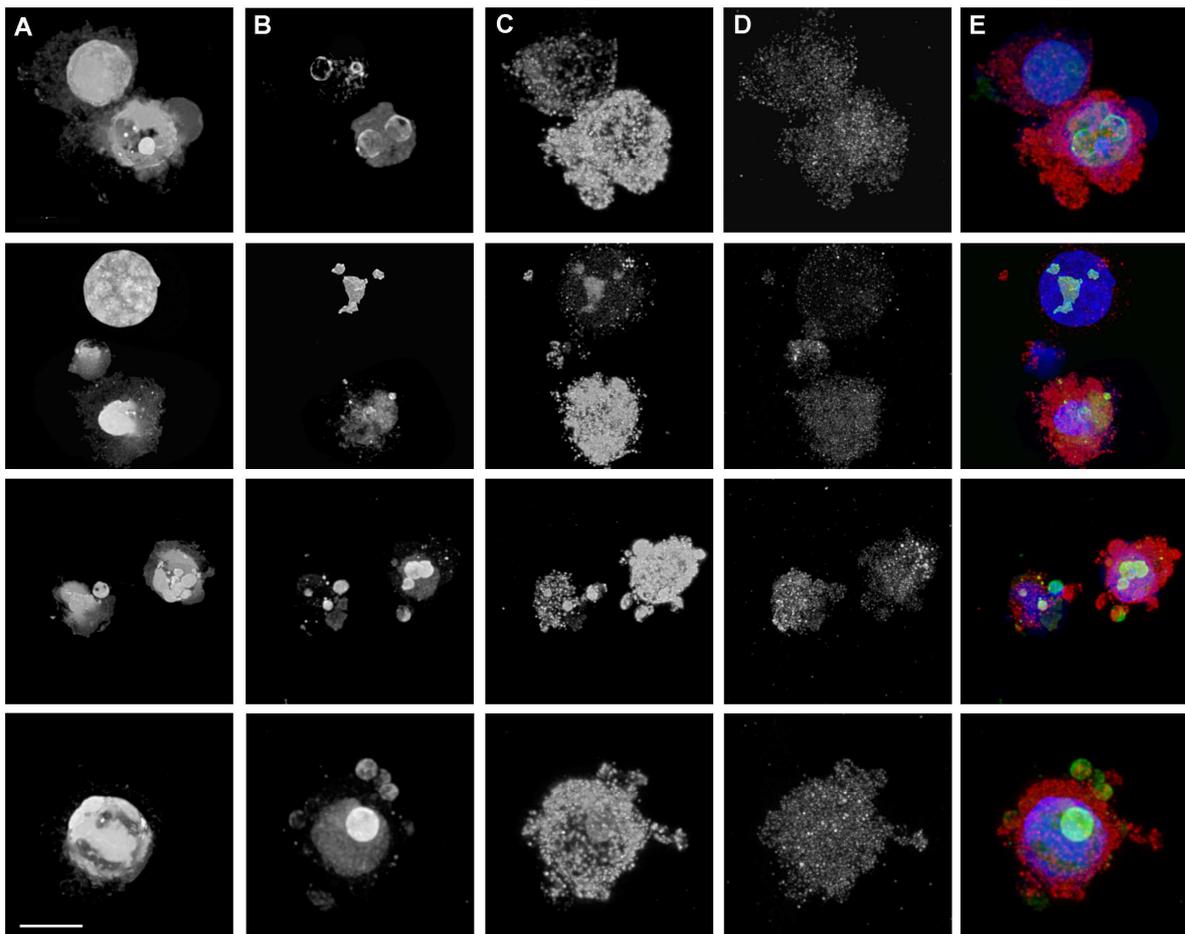
### 3.3 Sensitivitäten verschiedener Zelllinien

Isham und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei Myelomzellen Chaetocin Apoptose auslöst, vermutlich als Folge von oxidativem Stress (Isham et al., 2007).

Daher wurde untersucht, ob Myelom-Zellen (Zelllinie RPMI 8226) ihr Chromatin zu CICC reorganisieren. Es wurden  $2 \times 10^5$  Myelom-Zellen 24 Stunden mit  $0,04 \mu\text{M}$  Chaetocin (in 4ml Medium) induziert, eine Stunde auf Polylysin-beschichteten Slides inkubiert und mit 4%PFA in  $0,3 \times \text{PBS}$  fixiert.

Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz mit folgendem Detektionsschema durchgeführt.

1. Antikörper	2. Antikörper
R $\alpha$ Cleaved-Caspase-3	G $\alpha$ R-FITC
H $\alpha$ Nuc	D $\alpha$ Hum-Cy3
M $\alpha$ B23	G $\alpha$ M-Cy5



**Abb. 24: Gesamtzellprojektionen von Myelomzellen (RPMI 8226) nach Chaetocin Behandlung**

Die Abbildung 24 zeigt eine Gesamtzellprojektion (von 6 $\mu$ m) von Myelomzellen nach konfokaler Mikroskopie.

A) DAPI-Färbung, B: B23/Nucleophosmin, C: Nukleoli, D: Cleaved-caspase-3, E) Überlagerung von Nukleoli in rot, B23 in grün, DAPI in blau.

Balken repräsentieren eine Länge von 5 $\mu$ m.

Die Zelllinie RPMI 8226 reagiert, wie bereits von Isham und Mitarbeitern berichtet, nach einer Chaetocin-Behandlung (0,04  $\mu\text{M}$ ) mit Apoptose. Die nuklearen Proteine Nucleophosmin und Nucleolin befinden sich im Cytoplasma und die Zellen sind Cleaved-Caspase-3 positiv.

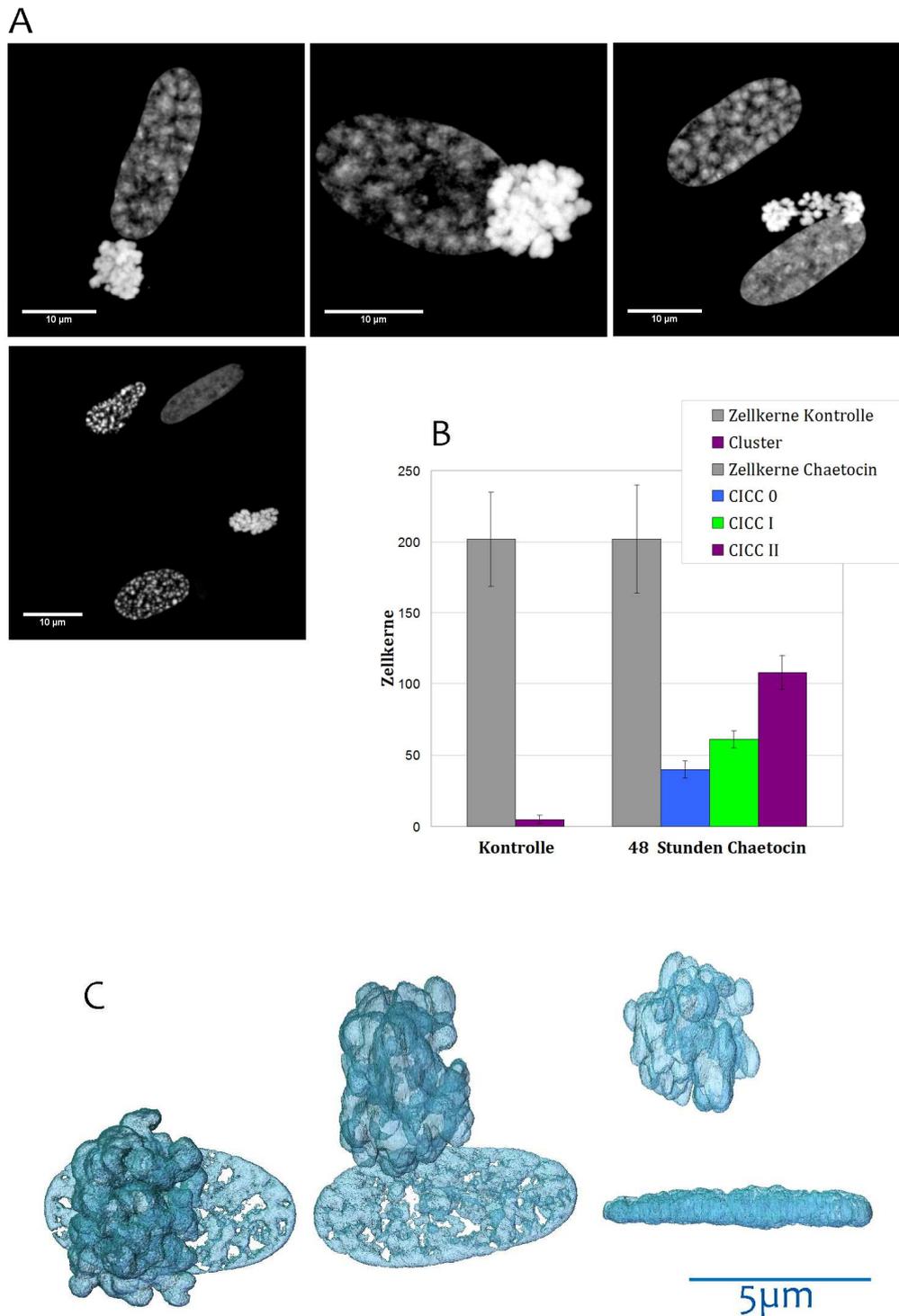
Obwohl Myelomzellen sensitiv gegenüber Chaetocin sind, kann keine CICC-Bildung beobachtet werden. Um festzustellen, ob die „*Chaetocin induced chromatin clustering*“ zellspezifisch ist, wurden 25 verschiedene humane Zell-Linien mit unterschiedlichen Chaetocin-Konzentrationen getestet. Im Anhang (S. 190) befindet sich eine Tabelle der getesteten Zell-Linien. Aus dieser Testreihe wird deutlich:

1. CICC-Bildung ist zelltypspezifisch.
2. Sie kann nur in adhärennten Zell-Linien und in Fibroblasten beobachtet werden. Einen CICC-Phänotyp zeigen humane Fibroblasten einer gesunden Spenderin, HGPS-Fb, HFB H1, MRC5 Fibroblasten, SV40 immortalisierte Fibroblasten, hTERT-BJ1 (telomerase kompetenten Zellen) und in RPE1.
3. Die CICC-Bildung ist von der Telomerase unabhängig.
4. Es kann keine CICC-Bildung in den getesteten adhärennten Tumor-Zelllinien und auch nicht in hämatopoetischen Zellen, unabhängig davon, ob sie bösartig sind oder nicht, nachgewiesen werden.

### 3.4 Zellzyklusanalyse

#### 3.4.1 CICC-Frequenz

Nachdem primäre Fibroblasten für 48 Stunden mit Chaetocin (0,01 $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, kommen in einem Präparat alle Chromatin-Stadien (CICC 0, CICC I, CICC II) gleichzeitig vor. In dem nachfolgenden Experiment soll die Frequenz verschiedener CICC-Phänotypen ermittelt werden.



**Abb. 25: Chromatin-Stadien**

A) Nach Chaetocin-Induktion kommen verschiedene Chromatin-Stadien gleichzeitig vor. Ein Fibroblast mit unauffälligem Chromatin liegt neben einem Fibroblasten, der sein Chromatin zu CICCs umorganisiert hat. Auf einem Zellkern, der bereits CICCs ausgebildet hat, befindet sich eine Mitose.

B) Der Excel-Graph zeigt die Quantifizierung der Chromatin-Stadien; Gesamtzellzahl (grau), Zellkerne mit unauffälligem Chromatin nach Chaetocin-Behandlung CICC 0 (blau), CICC I (grün), CICC II (lila).

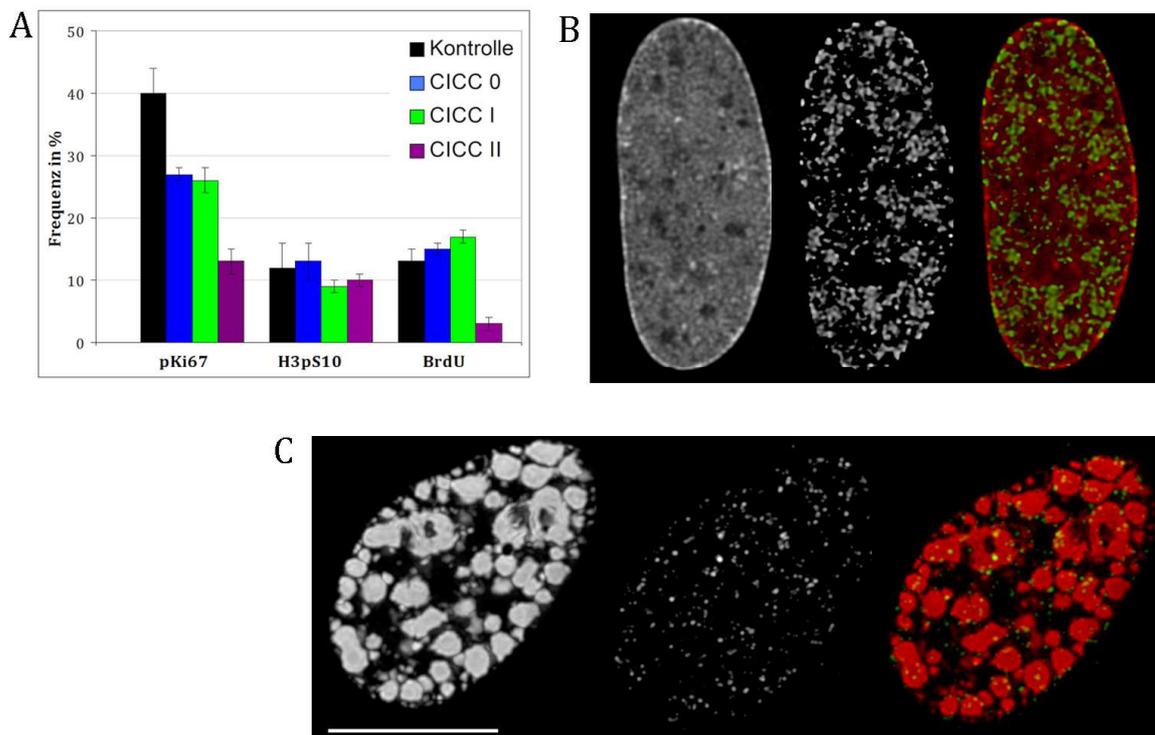
C) Amira-Rekonstruktion eines Zellkerns mit CICC-II-Chromatin und einer direkt benachbarten Mitose aus verschiedenen Perspektiven.

### 3.4.2 Immunfluoreszenz-Markierung von pKi67, H3pS10 und BrdU

Des Weiteren wurde die Frequenz der Zellzyklusmarker in Abhängigkeit der CICC-Klassifizierung ermittelt. CICCs haben eine Ähnlichkeit mit einer Prometaphase, daher wurde untersucht, ob Chaetocin zu einem Prometaphase-Arrest führt und welchen Einfluss Chaetocin auf den Zellzyklus hat. Hierzu wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Eine Stunde vor der Fixierung erhielten die Zellen 50µM BrdU, anschließend wurden sie 3x kurz mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA in 1xPBS fixiert und für eine Immunfluoreszenz vorbereitet, mit Antikörpern gegen die Proteine pKi67, H3pS10 und BrdU für 30 Minuten inkubiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundärem Antikörper nachgewiesen und an einem Epifluoreszenzmikroskop je Chromatin-Stadium 200 Zellen gezählt.

Detektionsschema:

Layer	1. Antikörper
1. Layer	R α pKi67
2. Layer	G α R-TR Rabbit Serum
3. Layer	R α H3pS10, M α I / BrdU
4. Layer	G α M-FITC, G α R-Cy3



**Abb. 26: Zellzyklusmarker in Kombination mit verschiedenen Chromatin-Phänotypen**

Die Abbildung 26 zeigt humane Fibroblasten nach einer zweitägigen Chaetocin-Behandlung in Kombination mit den Zellzyklusmarkern pKi67, BrdU und H3pS10. Balken repräsentieren eine Länge von 5µm.

A) Frequenz der Zellzyklusmarker pKi67, H3pS10 und BrdU in unbehandelten Kontroll-Zellen (schwarzer Balken) und nach Chaetocin-Behandlung, klassifiziert nach CICC 0 (blau), CICC I (grün), CICC II (lila).

B und C) Replikationsmuster nach Chaetocin-Behandlung. B) CICC-0-Zellkern mit unauffälligem Chromatin und einem typischen Muster einer frühen-mittleren S-Phase.

C) CICC-II-Zellkern mit einem reduzierten Replikationsmuster. Die Replikationssignale sind außerhalb und an der Oberfläche der CICCs. Für eine Z-Projektion wurden jeweils 3 mittlere optische, konfokale Schnitte, die 600nm entsprechen, verwendet.

Nach Chaetocin-Induktion kommen weiterhin alle Zellzyklusmarker vor.

Je stärker das Chromatin kondensiert, desto mehr nehmen die Zellzyklusmarker ab.

In den CICC-II-Zellen haben nur 12% pKi67 angereichert und es sind nur noch 3% der Zellen BrdU positiv, wohingegen der Marker für die Prometaphase H3pS10 nur geringfügig abnimmt.

### 3.5 Löst Chaetocin oxidativen Stress aus?

#### 3.5.1 Testung von Antioxidanzien und Enzym-Inhibitoren

Chaetocin inhibiert die Thioredoxin-Reductase-1 (TrxR1) (Tibodeau et al., 2009) und dadurch die downstream-regulierten Stoffwechselwege, u.a. den antioxidativen Schutz bei Stress (Lu et al., 2007). Daher soll im nachfolgenden Versuch untersucht werden, ob Antioxidanzien eine Chromatin-Kondensation verhindern können. Hierzu wurden wasserlösliche und lipidlösliche Antioxidanzien verwendet, die von Marcus Conrad und Alexander Seiler freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden sind. Zunächst wurden die Zellen wie üblich kultiviert, vor der Chaetocin-Behandlung erhielten die Zellen Antioxidanzien. Die fettlöslichen wurden 16 Stunden und die wasserlöslichen 1-2 Stunden vor der Chaetocin-Behandlung dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen 48 Stunden lang mit Chaetocin behandelt, einmal mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA in 1xPBS fixiert, mit DAPI gefärbt und anschließend am Epifluoreszenzmikroskop das Chromatin beurteilt.

Des Weiteren wurden Enzym-Inhibitoren getestet:

- L-buthionine Sulfoximin (BSO) ist ein Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase und damit des Thioredoxin-Reduktase-1(TrxR1)-Systems (Carey et al., 2010; Cuzzocrea et al., 1998). Die Zellen wurden fünf Tage lang mit BSO behandelt.
- Arsenitoxid ( $As_2O_3$ ) ist ein weiterer Inhibitor der Thioredoxin-Reduktase-1. Damit wurden die Zellen mit dem empfohlenen Wirkungsbereich von 1-50 $\mu$ m für 48 behandelt.

Antioxidanz	Konzentration	CICC inhibiert	Bemerkung
GSH (Glutathion)	2,5mM, 5mM	ja	S-Phasen Zunahme
GSH-EE	2,5mM, 5mM, 7,5mM	ja	S-Phasen Zunahme
N-ac-Cytein	5mM	ja	S-Phasen Zunahme
$\beta$ -Mercapto	800 $\mu$ m, 1000 $\mu$ m	ja	S-Phasen Zunahme
$\alpha$ -LA	1 $\mu$ M, 5 $\mu$ m	nein	
Vitamin E	1 $\mu$ M, 2 $\mu$ m	nein	
Trolox	250 $\mu$ M, 500 $\mu$ m	nein	
Enzym Inhibitoren	Induction von CICC Phänotyp		Bemerkung
L-Buthionine Sulfoxim (BSO)	100 $\mu$ m	Ja	
Arsenitoxid ( $As_2SO_3$ )	50 $\mu$ m	nein	defekte Zellkerne

Tabelle 3: Effekte von Antioxidanzien und Enzym-Inhibitoren

Aus der obigen Tabelle ist zu entnehmen, dass wasserlösliche Antioxidantien

- die Frequenz der S-Phase erhöhen und
- die Wirkung von Chaetocin durch GSH, GSH-EE, N-ac-Cytein (und  $\beta$ -mercaptoethanol) vollkommen unterbunden wird.

Der Enzym-Inhibitor BSO wird gewöhnlich verwendet, um die Effekte einer GSH-Eerschöpfung *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen (Carey et al., 2010; Cuzzocrea et al., 1998). Mit BSO, einem Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein-Synthetase können Chromatin-Cluster induziert werden, welche einer CICC- Formation entsprechen. Diese Daten sprechen dafür, dass es unter einer Chaetocin-Behandlung zu einer Erschöpfung des Glutathionvorrates kommt.

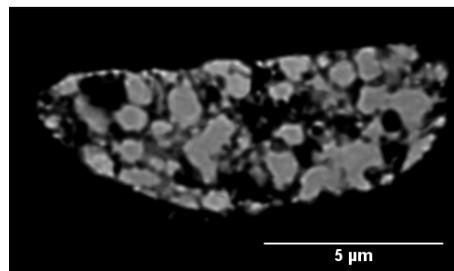


Abb. 26 D: Zum Vergleich mit dem durch Chaetocin induzierten Zellkern-Phänotyp (siehe Abb. 26A-C) zeigt diese Abbildung 26 D den Zellkern eines humanen Fibroblasten nach fünftägiger Inkubation in Medium mit L-Buthionine Sulfoxim (BSO, 100 $\mu$ m). BSO induziert eine Chromatin-Kondensation, die dem CICC-Phänotyp ähnelt. Balken: 5 $\mu$ m.

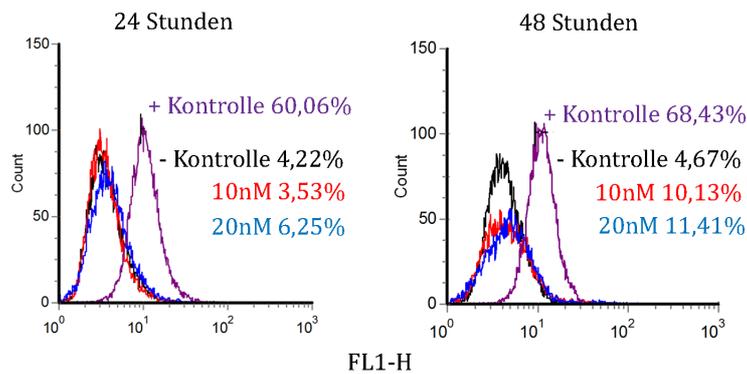
### 3.5.2 DCF-Färbung

Um oxidativen Stress in Zellen nach Chaetocin-Behandlung zu detektieren, wurde ein DCF<sup>6</sup> Färbung gewählt. Es handelt sich hierbei nicht um einen Antikörper, sondern um eine chemische Reaktion. Das Ausgangsmolekül H<sub>2</sub>DCFDA es ist ein chemisches, nicht fluoreszierendes Molekül, wohingegen das deacetylierte und oxidierte Produkt DCF fluoresziert.

2x10<sup>5</sup> Zellen wurden in 4ml Medium, welches 0,01 $\mu$ M oder mit 0,02 $\mu$ M Chaetocin enthielt, für 24 Stunden oder für 48 Stunden kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und als Positivkontrolle Zellen, die eine Stunde mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) inkubiert wurden.

Anschließend wurden die Zellen wie in Seiler et al. (2008) beschrieben von Alexander Seiler für die DCF-Färbung vorbereitet und die FAC-Analyse durchgeführt.

<sup>6</sup> Zellkultivierung und Induktion durch Doris Illner, FACS Analyse durch Alexander Seiler.



**Abb. 27: DCF FAC-Analyse**

Die Abbildung 27 zeigt das FACS Ergebnis der DCF-Färbung. Die Positivkontrolle ist in lila, die Negativkontrolle ist in schwarz, Chaetocin behandelte Zellen sind in rot bzw. in blau dargestellt.

Nach 24 Stunden zeigen 3,53% der Zellen oxidativen Stress, wenn sie 0,01 $\mu$ M Chaetocin erhielten. Wurden die Zellen mit 0,02 $\mu$ M Chaetocin behandelt, dann steigt der oxidative Stress auf 6,25% an. Nach 24 Stunden kam es zu keinem Zellverlust. Die Zellzahl der Negativkontrolle entspricht ca. der Zellzahl, die mit Chaetocin behandelt wurden.

In der Kontrolle (positiv) zeigen 60,06% aller Zellen oxidativen Stress.

Nach 48 Stunden haben 10,13% der Zellen oxidativen Stress, wenn sie 0,01 $\mu$ M Chaetocin erhielten; bekamen die Zellen 0,02 $\mu$ M Chaetocin, steigt der oxidative Stress auf 11,41%. Nach 48 Stunden kommt es zu einem starken Zellverlust von ca. 50%.

Die DCF-Daten sprechen für einen leichten oxidativen Stress von humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion.

### 3.6 Seneszenz-Marker

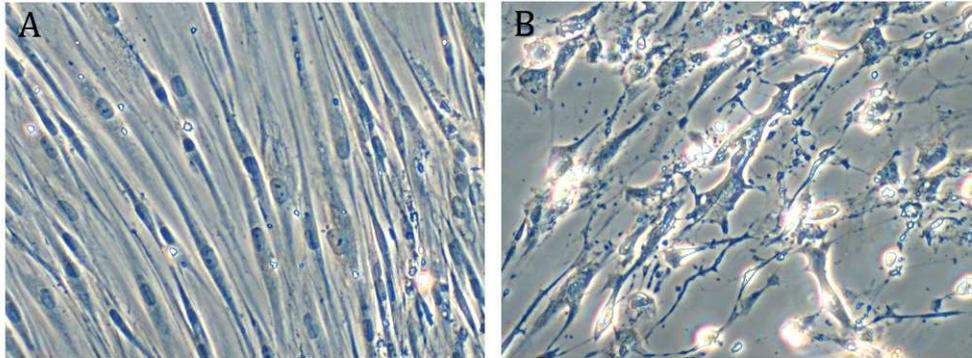
Chaetocin induzierte Cluster ähneln in der DAPI-Färbung in Form und Größe den SAHFs. Ebenso erinnert die Aufhebung des für Fibroblasten typischen Zellverbands an seneszente Zellen. Um zu überprüfen, ob Zellen nach Chaetocin-Induktion die mit Seneszenz assoziierten Markern aufweisen, wurden Lipofuchsin, p16, p21, p53 und SA- $\beta$ -Galaktosidase (pH-6) untersucht (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Lanigan et al., 2011).

#### 3.6.1 Zytoplasma-Organisation

Die Seneszenz in Fibroblasten ist ein komplexes Geschehen, das zu morphologischer und funktioneller Veränderung führt. Seneszente Fibroblasten produzieren im Vergleich zu gesunden Zellen vermehrt proteolytische Enzyme. Durch die Sekretion von proteolytischen

Enzymen (wie interstitial Kollagenase, Elastase und Streptomelysin) wird die extrazelluläre Matrix zerstört (Hornebeck et al. 2003).

Um einen Eindruck über den Zellverband von Chaetocin behandelten Zellen zu erhalten, wurden diese wie üblich induziert und fixiert. Anschließend wurden am Phasenkontrastmikroskop mit einem Photoapparat (Canon G5) Übersichtsbilder aufgenommen.



**Abb. 28: optische Struktur des Zytoplasmas von unbehandelten Zellen vs. Chaetocin behandelten Zellen**

A) zeigt die Kontrolle-Zellen; humane Fibroblasten 100-fache Vergrößerung.

Die Zellen liegen dicht gepackt und geordnet nebeneinander, dadurch bilden sie einen Monolayer. Die Filopodien suchen Kontakt zur nächsten Zelle. Bei 100% Konfluenz ist die Gestalt der Fibroblasten spindelförmig.

B) zeigt humane Fibroblasten nach 48-stündiger Chaetocin-Behandlung in 100-facher Vergrößerung. Die Zellen wirken ungeordnet und zufällig verteilt. Das Zytoplasma hat sich verringert und der Monolayer ist aufgelöst. Es sind zahlreiche, abgelöste Zellen zu erkennen, welche sich in einer anderen Fokusebene befinden und die Gesamtzellzahl hat stark abgenommen.

### 3.6.2 Lipofuchsin

Eine intrazelluläre Akkumulation von Lipofuchsin ist ein Zeichen für postmitotisches Altern.

Lipofuchsin ist ein unspezifisches Proteinaggregat mit auto-fluoreszierender Eigenschaft.

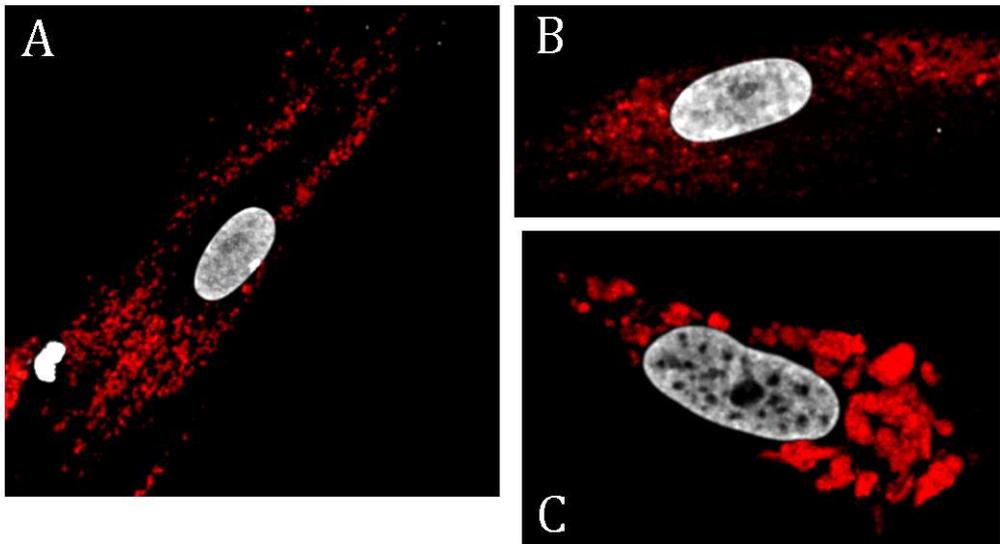
Bei Lipofuchsin, umgangssprachlich auch als „Alterspigment“ bezeichnet, handelt es sich um oxidierte und quervernetzte Aggregate, die aus oxidierten Proteinen (30-58%) und Fetten (19-51%) bestehen (Jolly et al., 2002).

Dieses Protein-Aggregat ist unlöslich und kann auch nicht mehr durch lysosomale Proteine oder durch das Proteasom abgebaut werden (Valko et al., 2005).

Lipofuchsin besitzt die Eigenschaft der Autofluoreszenz und lässt sich daher auch ohne eine Antikörperfärbung leicht feststellen. Das typische Emissions-Spektrum von Lipofuchsin liegt bei 570-605 nm (Eldred et al., 1982).

Um festzustellen, ob humane Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung Lipofuchsin anreichern, wurden sie wie in 2.4.2 beschrieben kultiviert.

Für die Positivkontrolle wurde in humanen Fibroblasten Seneszenz induziert, indem sie zwei Wochen lang alle 2-3 Tage ein neues Medium mit 50µM BrdU erhielten.



**Abb. 29: Lipofuchsin-Anreicherung in der Positivkontrolle**

Die Abbildung 29 zeigt humane Fibroblasten nach induzierter Seneszenz.

Das Chromatin ist in grau und das Lipofuchsin ist in rot dargestellt.

A) Z-Projektion des gesamten Zellkerns; links unten eine Mitose, Zellkern mit Barr- Körperchen, starke Lipofuchsin-Anreicherung im Zytoplasma und in den Filopodien, der Zellkern und das endoplasmatische Retikulum ist frei von Lipofuchsin.

B) Z-Projektion des gesamten Zellkerns; zu erkennen sind das inaktive X-Chromosom in der DAPI-Färbung und eine Anhäufung von Lipofuchsin im Zytoplasma.

C) ein konfokaler, lichteoptischer Schnitt der 200µm entspricht; im Zytoplasma ist eine massive Anreicherung von Lipofuchsin zu erkennen.

In der Positivkontrolle kam es zur Lipofuchsin-Akkumulation im Zytoplasma. Jedoch ist der Zellkern frei von Lipofuchsin. In Chaetocin behandelten Fibroblasten kann kein Lipofuchsin beobachtet werden (keine Abbildung beigefügt).

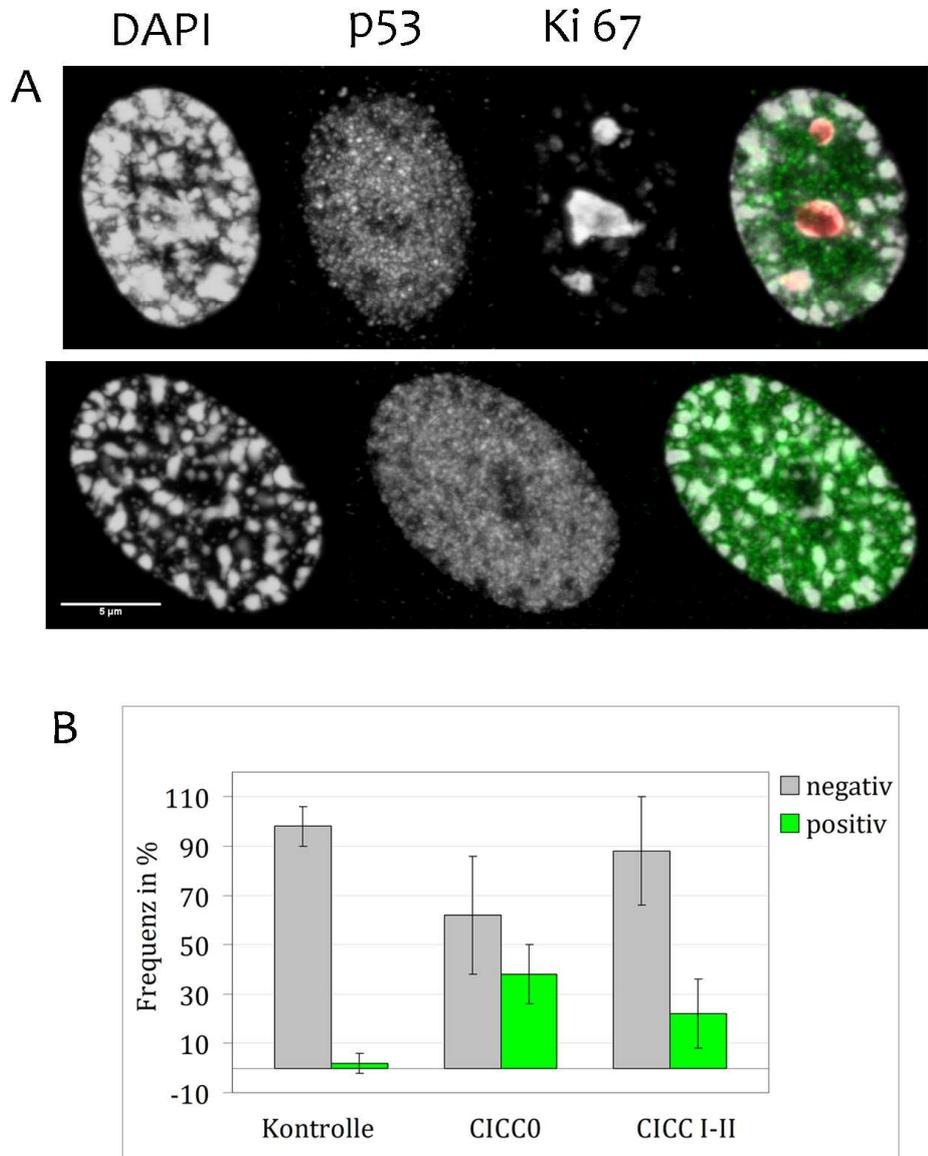
### 3.6.3 p53-Markierung

p53 ist ein Zellzyklusmarker, er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Seneszenz (Lanigan et al., 2011) und der Apoptose. p53 reguliert zwei Kontrollpunkte, nämlich den G1-Restriktionspunkt und den G2/M-Kontrollpunkt. Wird während des Zellzyklus` ein Fehler in der DNS entdeckt, z. B. Doppelstrangbrüche, so wird p53 posttranslational stabilisiert und es kommt zur Arretierung des Zellzyklus`.

Im nächsten Versuch wurde geklärt, ob Chaetocin zu einer Anreicherung von p53 führt.

Dazu wurden die Zellen wie 2.4.2 beschrieben induziert und anschließend eine Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen p53 durchgeführt.

Die fixierten Fibroblasten-Zellkerne wurden für 30 Minuten mit einem Antikörper gegen dieses Protein inkubiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen und die Daten von 200 Zellen ausgewertet und in Abbildung 30 dargestellt.



**Abb. 30: IF Färbung mit p53**

Die Abbildung A zeigt humane Fibroblasten nach einer Chaetocin-Behandlung. Zu sehen sind die Z-Projektionen von DAPI, p53 und pKi67.

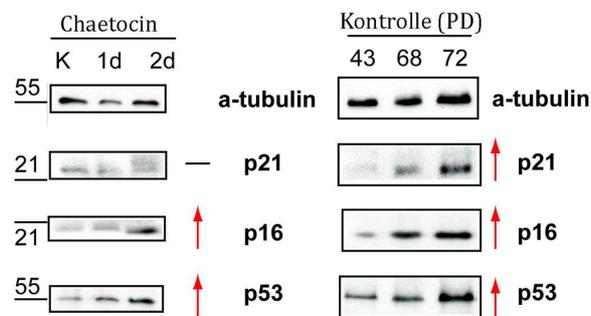
Eine Überlagerung von DAPI, p53 (grün) und Ki67 (rot) von drei mittleren, lichteptischen Schnitten, die 600nm entsprechen. Die Abbildung B zeigt den Excel-Graph, der die Frequenz der Anreicherung von p53 in humanen Fibroblasten darstellt. Die p53-negativen Zellen sind durch graue Balken dargestellt und die p53-positiven Zellen durch grüne Balken. Die Ordinate zeigt die Frequenz in % bezogen auf 200 Zellkerne, die Abszisse zeigt die Kontrolle, CICC0 und CICC I-II.

Wie in der Abbildung 30 zu erkennen ist, reichern humane Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion p53 im Zellkern an. Zellkerne, die scheinbar ein unauffälliges Chromatin (CICC0) haben, sind zu 38% p53-positiv und Zellen, die bereits ein auffälliges Chromatin (CICC I-II)

zeigen, sind zu 22% p53-positiv, dies bedeutet, dass mit der Dauer der Chaetocin-Behandlung und dem Anstieg der Heterochormatisierung p53 abnimmt. Außerdem kann p53 überwiegend im „*interchromatin space*“, d.h. im DAPI-freien Raum beobachtet werden.

### 3.6.4 Western-Blot von p16, p21 und p53

Seneszenz kann über den p16-pRB oder über den p21-Signalweg induziert werden. Daher wurden die Expression der Zellzyklus-Proteine über einen Western-Blot untersucht. Hierzu wurden Zellen wie in 2.5 beschrieben mit Chaetocin induziert, als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und Zellen mit verschiedenen PD verwendet. Die Zellkultivierung, die Induzierung mit Chaetocin sowie die Proteinisolation wurden von Doris Illner und die Western-Blot-Durchführung wurde von Karolin Klement durchgeführt.



**Abb. 31: Western Blot p16, p21, p53**

Links Fibroblasten (Kontrolle und nach Chaetocin-Induktion) und rechts die Positivkontrollen (PD 43, 68 und 72). Vergleicht man die Ansammlung von Proteinen nach 24-stündiger und 48-stündiger Chaetocinbehandlung, so ist eine Zunahme von p16 und p53 festzustellen, wohingegen p21 nicht nachgewiesen werden kann. In der Kontrolle nehmen p16, p21 und p53 mit der Populations-Verdopplung (PD) zu.

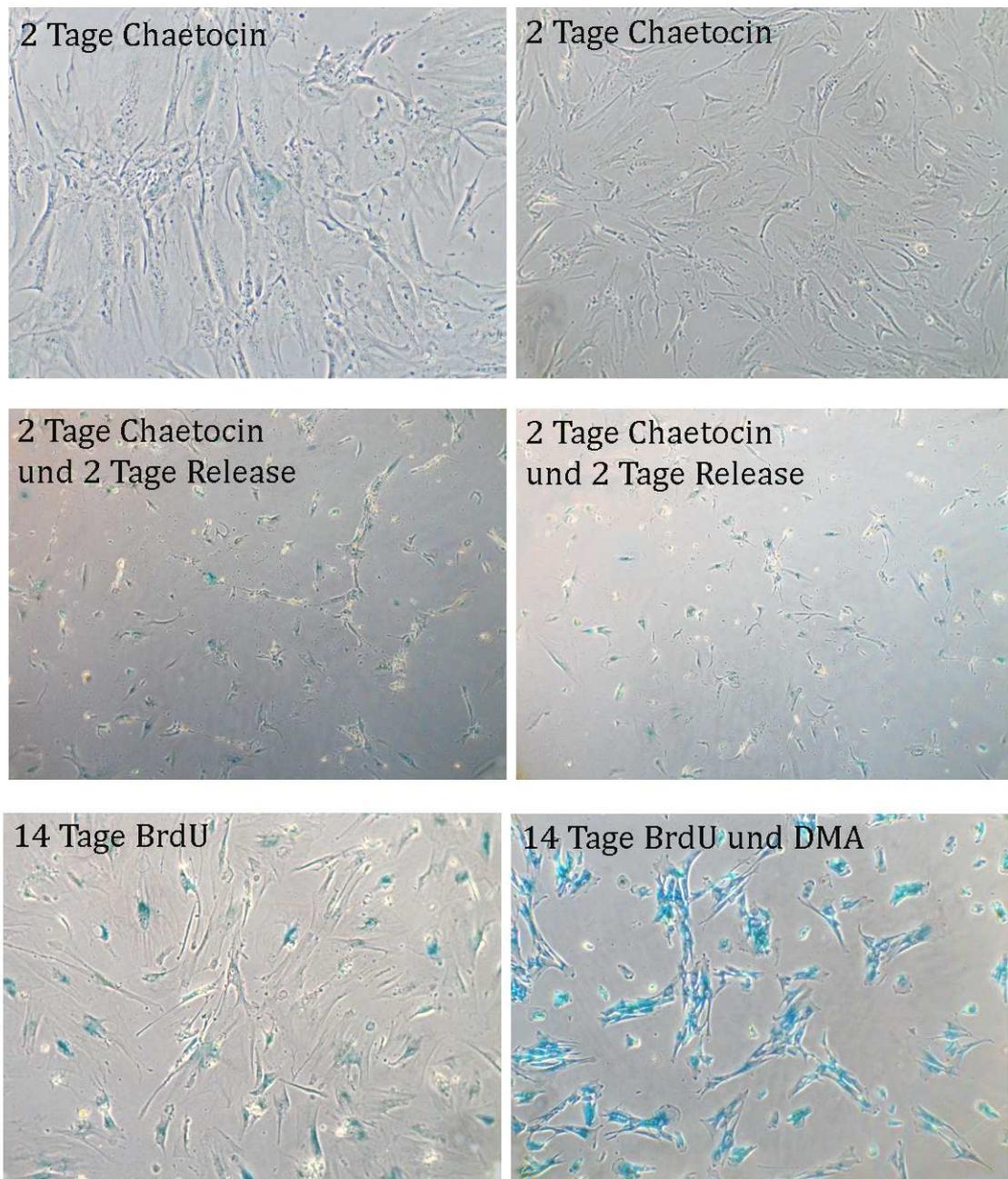
Im Western-Blot kann man sehen, dass nach einer Chaetocin-Behandlung p53 und p16 hoch reguliert sind; daraus kann man auf eine induzierte Seneszenz über den p16-pRB Signalweg schließen.

### 3.6.5 SA- $\beta$ -Galaktosidase

Senescente Zellen ändern ihr Expressionsprofil. Die Expression der SA- $\beta$ -Galaktosidase (pH Optimum von 6) ist ein klassischer Seneszenzmarker (Dimri et al., 1995).

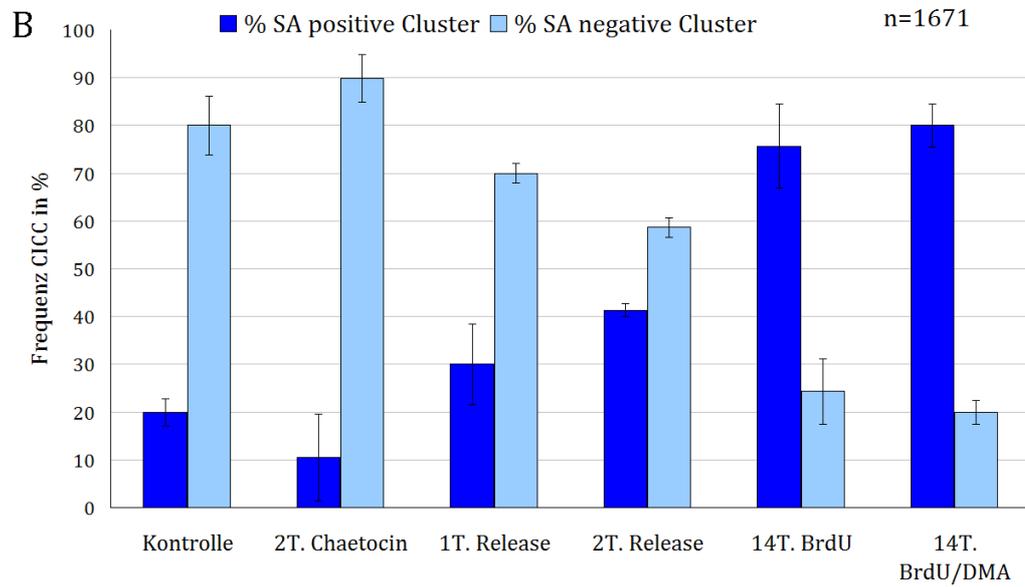
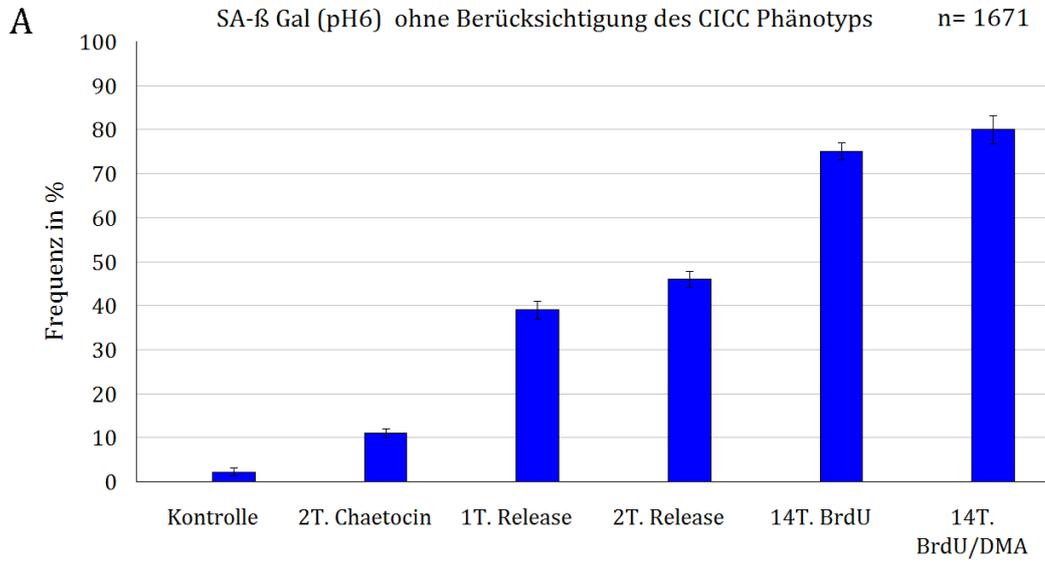
Humane Fibroblasten wurden mit Chaetocin induziert, als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen und Zellen, die mit 50 $\mu$ M BrdU oder 50 $\mu$ M BrdU und 20 $\mu$ M DMA behandelt wurden verwendet (Suzuki et al., 2002). Anschließend wurden die Zellen für den SA- $\beta$ -Gal-Test vorbereitet (siehe Punkt 2.4.5), die Präparate am Phasenkontrastmikroskop beurteilt und mit einem Photoapparat (Canon G5) Übersichtsbilder aufgenommen.

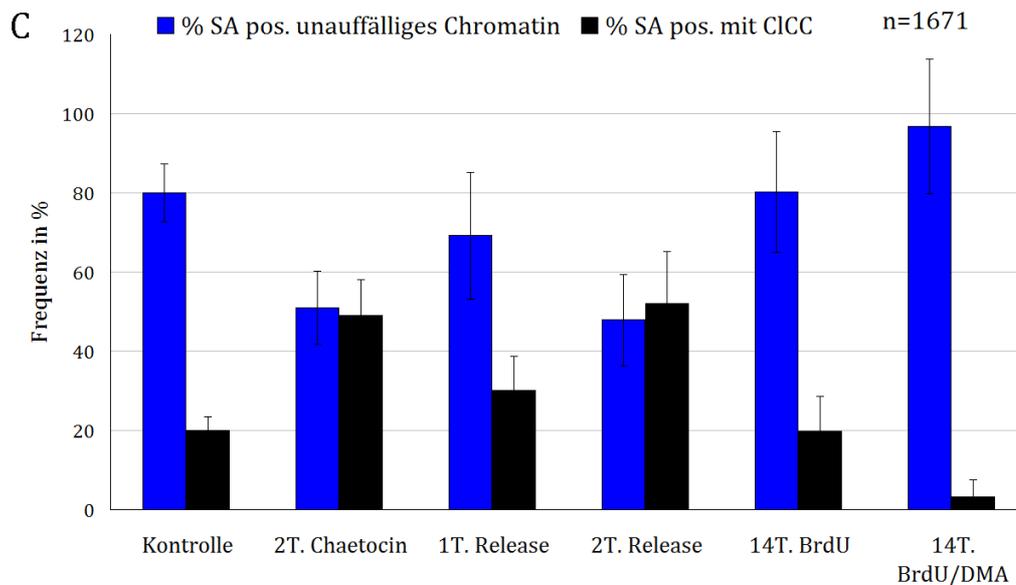
Danach wurde das Chromatin mit DAPI gefärbt und Zellkerne am Epifluoreszenzmikroskop in Kombination mit Phasenkontrastmikroskopie ausgezählt.



**Abb. 32 : Phasenkontrastbilder nach einer SA-β-Gal (pH6)-Färbung**

Die Zellen wurden zuvor mit 3% PFA fixiert und ein SA-β-Gal-Test bei pH6 durchgeführt. Nach einer zweitägigen Chaetocin-Behandlung findet man nur vereinzelt SA-β-Gal positive Zellen. Werden die Zellen zwei weitere Tage in Chaetocin freiem Medium kultiviert, steigt die Zahl der SA-β-Gal-positiven Zellen weiter an, darüber hinaus kommt es zu einem erheblichen Zellverlust. Die stärkste Anreicherung von X-Gal in Fibroblasten ist nach einer gezielten Induktion von Seneszenz mit BrdU oder BrdU und DMA zu erkennen.





**Abb. 33: Excel-Graphen über die Frequenz der SA-β-Gal (pH6) positiven Zellen**

- A) SA-β-Gal positive Zellen ohne Berücksichtigung des CICC-Phänotyps  
 B) Zellen, die ihr Chromatin zu CICCs organisiert haben und SA-β-Gal positiv oder negativ sind  
 C) SA-β-Gal positive Zellen mit unauffälligem Chromatin oder einem CICC-Phänotyp

SA-β-Gal Test pH6	
	Zellzahl
Kontrolle	180
2 Tage Chaetocin	458
2 Tage Chaetocin und 1Tage Release	430
2 Tage Chaetocin und 1Tage Release	256
14 Tage BrdU	189
14 Tage BrdU und DMA	158

Tabelle 4: Übersicht über die Frequenz der gezählten Zellen

Aus der Abbildung 33 ist folgendes zu entnehmen:

A) Fibroblasten, die nicht mit Chaetocin behandelt wurden, sind nur zu 2% SA-β-Gal positiv. Erhielten die Zellen zwei Tage lang Chaetocin, dann steigt der SA-β-Gal Marker auf 12% an. Wurden die Zellen nach der Chaetocin-Behandlung in neues Medium umgesetzt und einen Tag lang weiter kultiviert, so steigen die SA-β-GA positiven Zellen auf 38% an. Wurden die Zellen zwei Tage lang in Chaetocin freiem Medium kultiviert, waren bereits 46% der Zellen SA-β-Gal positiv.

Die Positivkontrollen erhielten entweder nur BrdU oder BrdU und DMA (siehe 2.4.4.).

Nach einer 14tägigen BrdU-Gabe sind 75% aller Zellen positiv.

Werden die Zellen mit BrdU und DMA behandelt, so sind nach 14 Tagen 80% aller Zellen SA- $\beta$ -Gal positiv.

B) Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass die Clusterbildung nicht mit der Expression von SA- $\beta$ -Gal korreliert. In der Negativkontrolle waren nur fünf Zellen SA- $\beta$ -Gal positiv. Eine dieser SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen hatte das Chromatin zu CICC reorganisiert und vier Zellen (=80%) waren SA- $\beta$ -Gal positiv und hatten ein unauffälliges Chromatin in der DAPI-Färbung. Zellen die zwei Tage lang Chaetocin erhielten und ihr Chromatin zu CICC reorganisierten, sind nur zu 10% SA- $\beta$ -Gal positiv und zu 90% SA- $\beta$ -Gal negativ.

Werden die Zellen nach der Behandlung in neues Medium umgesetzt und

- einen Tag lang weiter kultiviert, sind die 30% der CICC SA- $\beta$ -Gal positiv und 70% sind negativ.
- zwei Tage lang weiter kultiviert sind 42% der CICC SA- $\beta$ -Gal positiv und 58% negativ.

In der Positivkontrolle (nur BrdU) zeigen 72% der SAHFs eine Blaufärbung (sind also positiv) und 28% sind negativ. In der Positivkontrolle (BrdU und DMA) sind 80% aller SAHFs SA- $\beta$ -Gal positiv und 20% negativ.

C) die Expression der SA- $\beta$ -Gal korreliert nicht mit einer CICC oder SAHF-Bildung.

In der Negativkontrolle haben SA- $\beta$ -Gal positive Zellen 80% unauffälliges Chromatin und 20% SAHFs. Erhielten die Zellen Chaetocin und zeigen sie eine SA- $\beta$ -Gal-Färbung, dann sind die Frequenz der CICC-Bildung und des unauffälligen Chromatins etwa gleich.

Wurden die Zellen nach der Chaetocin-Behandlung in neues, Chaetocin freies Medium umgesetzt und

- einen weiteren Tag kultiviert, so sind von allen SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen 30% CICC positiv und 70% CICC negativ.
- zwei weitere Tage kultiviert, so sind von allen SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen ca. die Hälfte CICC positiv

In der Positivkontrolle (BrdU) zeigen von allen SA- $\beta$ -Gal positiven Zellen nur 20% SAHFs.

In der weiteren Positivkontrolle (BrdU und DMA) zeigen 3% SAHFs und 97% haben ein unauffälliges Chromatin.

### Ergebnisse Teil 1:

Chaetocin induziert Chromatin-Kondensation in humanen Fibroblasten. Diese ist zeit- und dosis-abhängig. Zwischen den CICC's befindet sich ein scheinbar DNS-freier Raum, der „*interchromatin space*“. Die einzelnen, heterochromatisierten Cluster sind durch DNS-Brücken miteinander verbunden.

Zellen, die ihr Chromatin in CICC's reorganisiert haben sind vitale Zellen, dies konnte durch eine 7AAD-Lebendfärbung und durch verschiedene IF-Marker (Cleaved-Caspase-3, Zyklusmarker, Histonmarker, Marker gegen nukleäre Organellen und den Erhalt des Zytoskeletts) nachgewiesen werden.

Die CICC-Induktion ist zelltyp-spezifisch, denn sie kann nur in adhärennten Zell-Linien und nur in diploiden Fibroblasten und RPE-1-Zellen beobachtet werden.

Untersuchungen zum oxidativen Stress ergaben, dass es unter einer Chaetocin-Behandlung zu einer Erschöpfung des Glutathion-Vorrates und einer Beeinträchtigung des Thioredoxin-(Trx) Systemes kommt.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass nur die oxidierte Form von Chaetocin eine phänotypische Wirkung hat. Durch eine DCF-Analyse konnte ein geringer oxidativer Stress durch Chaetocin nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Seneszenz-Marker Lipofuchsin, p16, p21, p53, SA- $\beta$ -Gal ergaben eine Anreicherung von p16, p53, SA- $\beta$ -Gal und ein Fehlen von Lipofuchsin und p21.

Ergebnisse der SA- $\beta$ -Galaktosidase:

- Eine SA- $\beta$ -Galaktosidase-Expression hat nicht zwangsläufig CICC's oder SAHF's zur Folge.
- CICC's oder SAHF's haben nicht zwangsläufig eine SA- $\beta$ -Galaktosidase-Expression zur Folge.
- Des Weiteren wird deutlich, dass in humanen Fibroblasten mit BrdU und DMA Seneszenz induziert werden kann, aber nur ein geringer Teil der Zellen reorganisiert ihr Chromatin zu SAHF's.

Die Untersuchungen zur Seneszenz ergaben, dass eine Chaetocin-Behandlung zu einer Seneszenz führt, welche nach etwa sieben Tagen in einen Zelltod mündet.

## CHAETOCIN Teil II

Im zweiten Teil wird untersucht, wie der Zellkern organisiert ist, d.h. es werden die Fragen beantwortet, „was befindet sich innerhalb bzw. außerhalb der CICC?“ und „wie ist das Chromatin in Bezug zum Cluster und zum Zellkernrand organisiert?“.

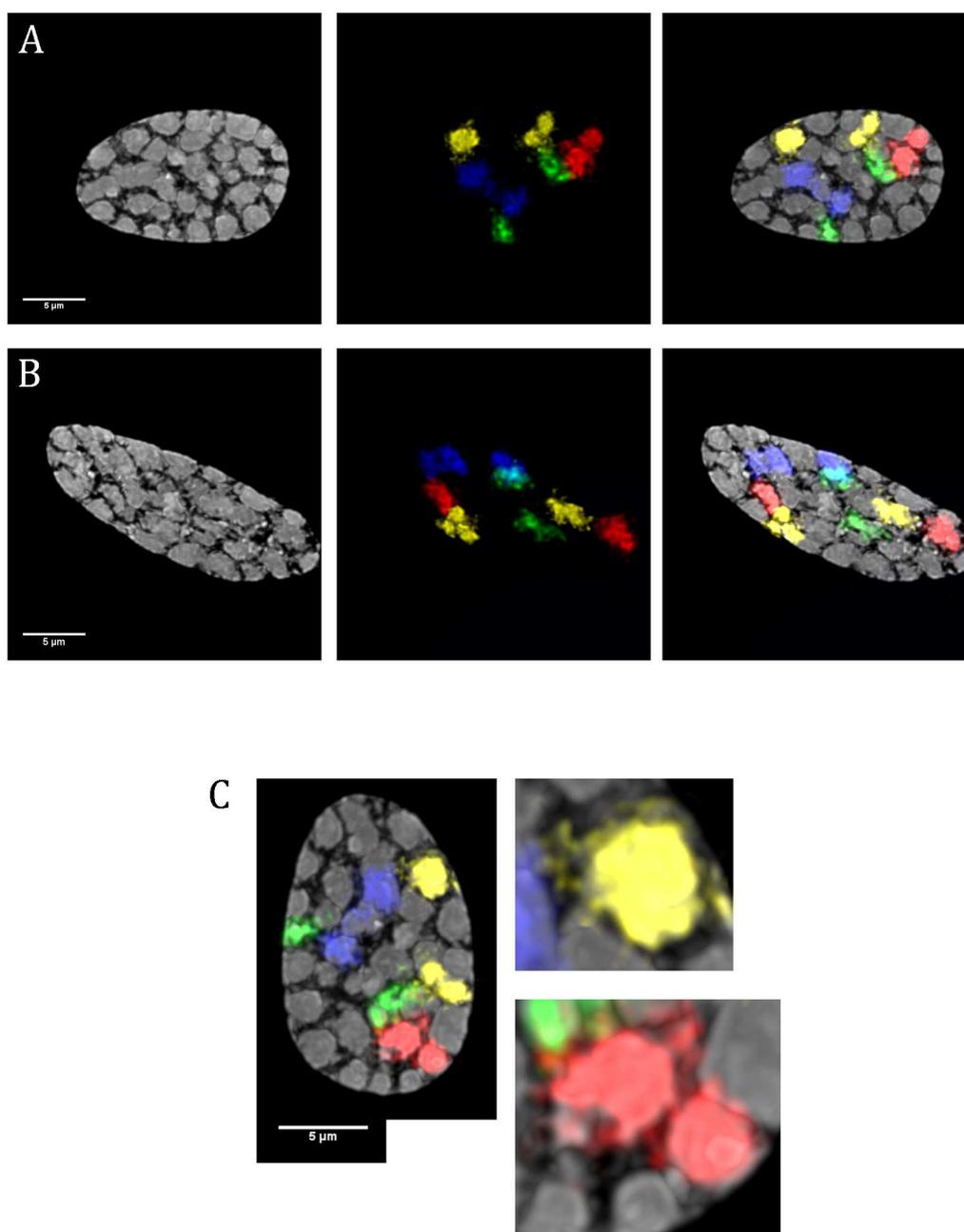
### 3.7 Funktionelle Zonen des Zellkerns

#### 3.7.1 Ein CICC entspricht einem Chromosomen-Territorium

Zunächst soll die Frage geklärt werden, ob die durch Chaetocin-Induktion hervorgerufenen CICCs ein einzelnes Chromosom repräsentieren oder ob in einem CICC verschiedene Chromosomen-Territorien oder CT-Fragmente enthalten sind. Hierzu wurden Chaetocin behandelte humane Fibroblasten für eine 3D-FISH vorbereitet und mit einem Hybridisierungs-Mix, der die Chromosomen #7, #8, #10 und #17 enthielt für 48 Stunden inkubiert.

Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
#7	Dig	M α Dig-Cy5
#8	TR	
#10	Bio	Avidin –Alexa-488
#17	TAMRA	
DNS-Färbung	-	DAPI



**Abb. 34: Erhalt von Chromosomen-Territorien; 3D-FISH #7, #8, #10, #17**

A und B) RGB-Z-Projektionen humaner Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion; Das Chromatin ist in grau dargestellt. Das CT #7 in blau, das CT #8 in rot, das CT #10 in grün und das CT #17 ist in gelb dargestellt  
 C) Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt der Abbildung A mit den Chromosomen 8 (rot) und 17 (gelb).

Wie in der Abbildung 34 zu sehen ist, bleibt das Chromosomen-Territorium als Einheit erhalten. Ein CICC bildet ein CT, jedoch reichen die Paint-Signale über den CICC-DAPI-Rand hinaus und die CTn bilden DNS-Brücken zu benachbarten CICCs.

Ein CT kann auch durch zwei CICC's repräsentiert werden. So ist das Chromosom 17 (gelb) und das Chromosom 8 (rot) in den Abbildung 34 A und 34 B auf zwei heterochromatische Cluster verteilt.

### 3.7.2 Radiale Verteilung von neu gebildeter RNS und H4K8ac

In diesem Experiment wurde die radiale Verteilung von neu gebildeter RNS untersucht.

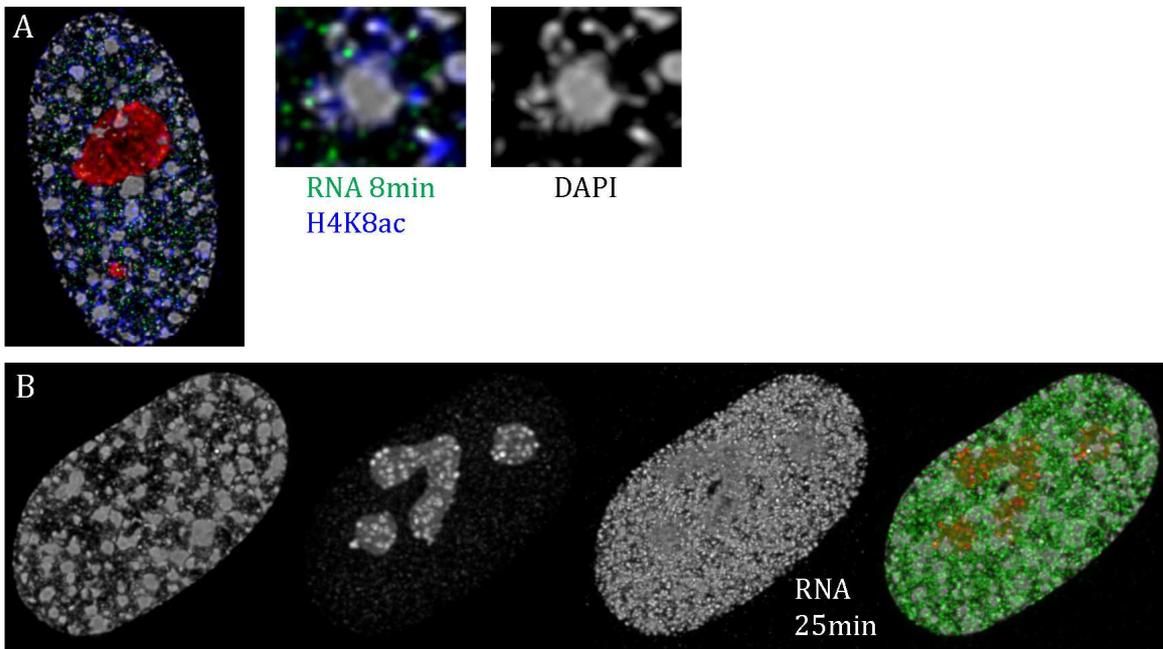
Hierfür wurden primäre humane Fibroblasten 48 Stunden lang mit 0,01 $\mu$ M Chaetocin induziert. Um neu gebildete RNS zu visualisieren, wurde eine „*scratch labeling*“ Methode wie in 2.4.5.3 beschrieben durchgeführt (Schermele et al., 2001).

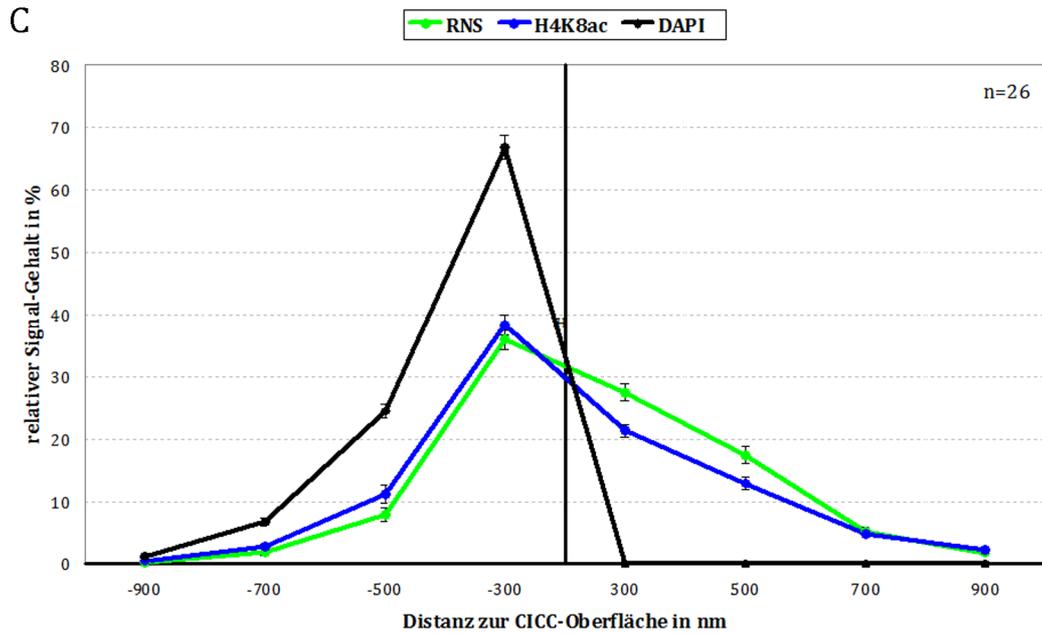
Dazu wurden die Zellen mit frischem Medium, welches 5mM Br-UTP enthielt bedeckt und mit einer Nadel transient permeabilisiert. Dies führt zu einer Aufnahme von Nukleotiden.

Die Zellen wurden nach 8, 25 und 30 Minuten fixiert und eine Immunfluoreszenz durchgeführt.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
M $\alpha$ I/BrU	G $\alpha$ M-FITC
R $\alpha$ H4K8ac	G $\alpha$ R-Cy5
H $\alpha$ Nucleoli	G $\alpha$ H-Cy5





**Abb. 35: Radiale Verteilung neu gebildeter RNS und H4K8ac**

A) zeigt drei lichtoptische Schnitte ( $\Sigma=600\text{nm}$ ); Die DAPI-Signale sind in grau, die RNS in grün und der Nukleolus in rot dargestellt.

B) RGB-Gesamtprojektion von DAPI, Nukleolus, naszenter RNA (25 Minuten), Überlagerung C) eADS-Graph über die Verteilung von IF-Signalen;

DAPI: schwarze Kurve, RNS: hellgrüne Kurve, H4K8ac: dunkel blaue Kurve.

Die Ordinate zeigt den relativen Signal-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur CICC-Oberfläche in nm.

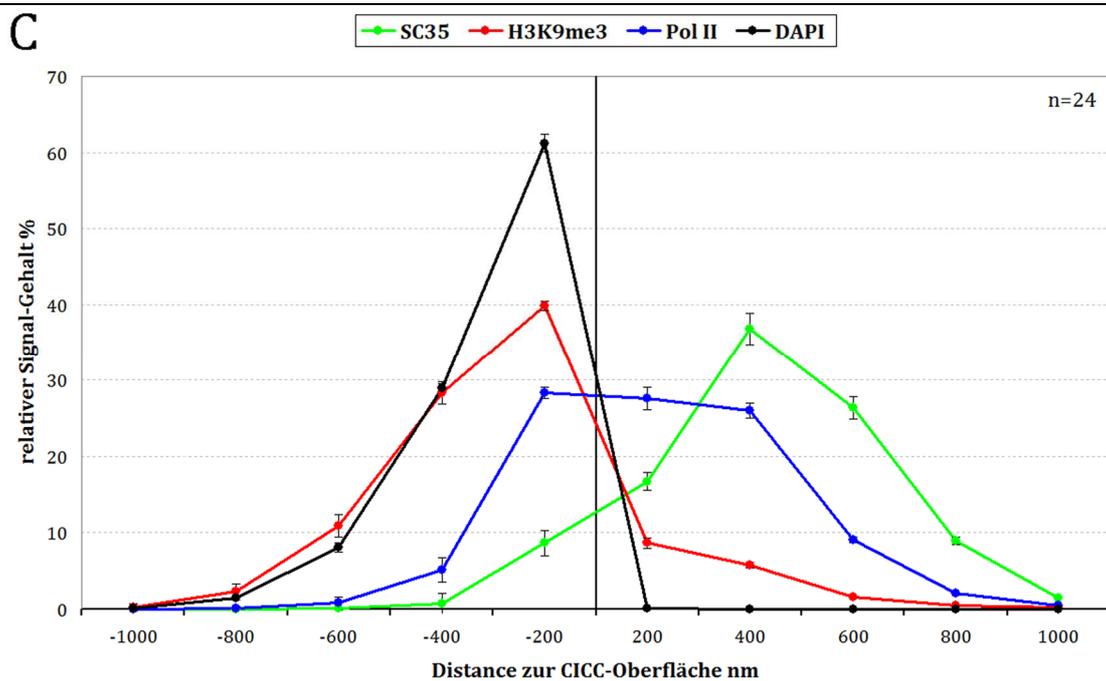
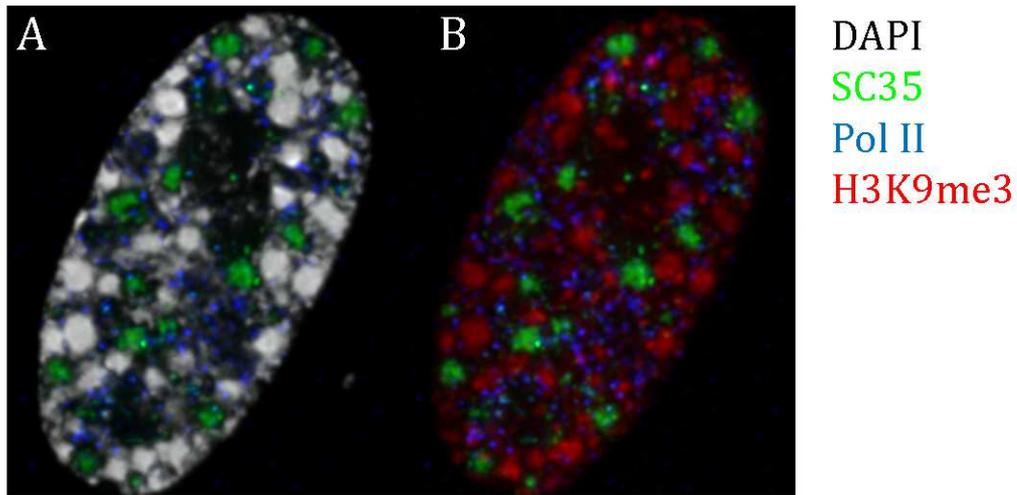
Zellen, die ihr Chromatin zu CICC reorganisiert haben, sind weiterhin in der Lage, RNS zu bilden und sind positiv für H4K8ac. Beide Marker sind überwiegend an der Oberfläche von CICC zu finden.

### 3.7.3 Radiale Verteilung von Pol II, SC35 und H3K9me3

In diesem Experiment wurden die radialen Verteilungen von Pol-II, SC35 und dem repressiven Marker H3K9me3 untersucht.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
M(IgM) $\alpha$ Pol II	G $\alpha$ M(IgM)-TR
M $\alpha$ SC35	G $\alpha$ M-FITC
R $\alpha$ H3K9me3	G $\alpha$ R-Cy3



**Abb. 36: Radiale Verteilung von SC35, H3K9me3 und der aktiven Polymerase II**

SC35: hellgrüne Kurve, DAPI: schwarze Kurve, H3K9me3: rote Kurve, Polymerase II dunkelgrüne Kurve. Die Ordinate zeigt den relativen Signal-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur CICC-Oberfläche in nm. Signale mit negativen Werten befinden sich innerhalb des Clusters und Signale mit positiven Werten sind außerhalb des Clusters.

Aus der radialen Verteilung ist zu entnehmen, dass H3K9me3 überwiegend innerhalb der heterochromatisierten CICC lokalisiert ist, wohingegen SC35 und Pol II an der Oberfläche und außerhalb der Cluster angereicht sind.

#### 3.7.4 Radiale Verteilung von SC35 und H3K27me3

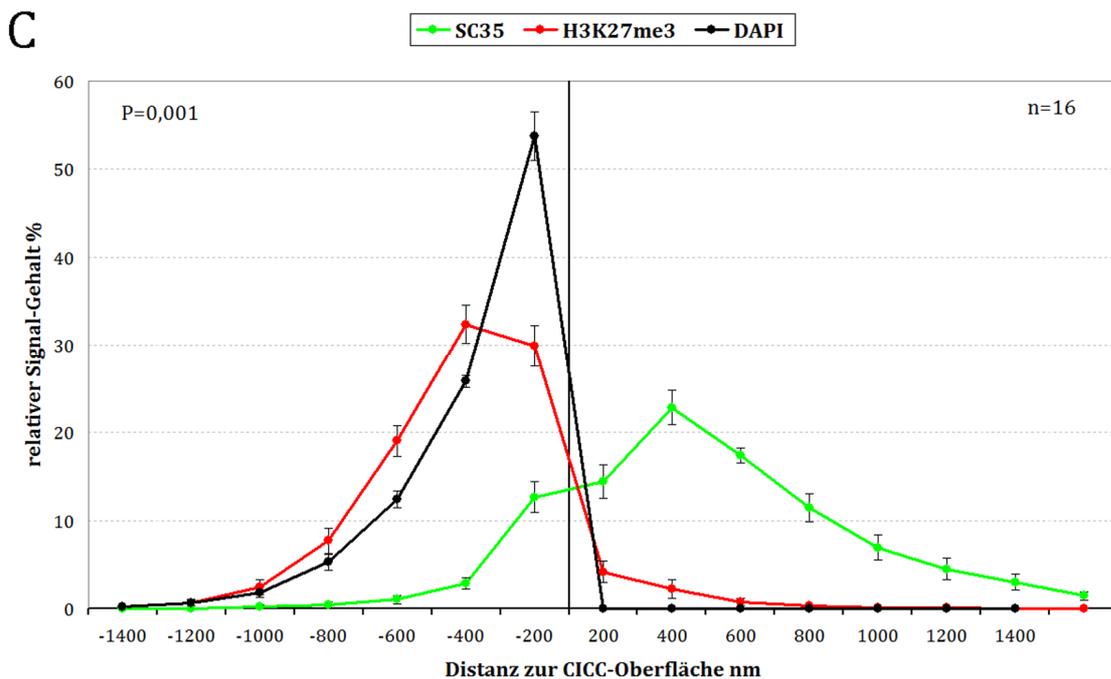
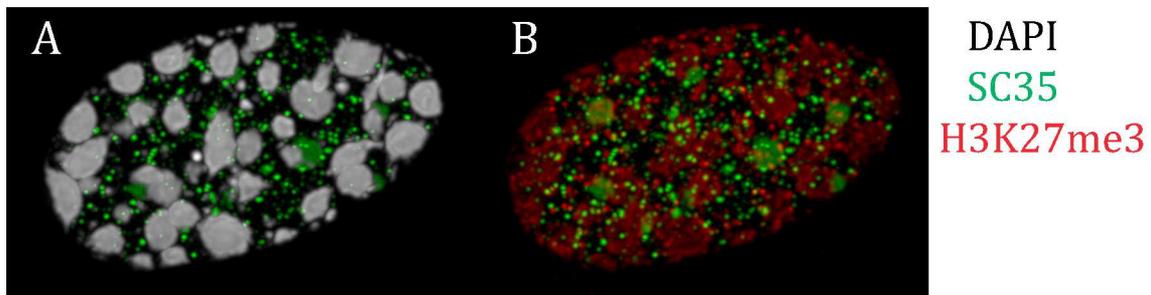
In diesem Experiment wurden die radialen Verteilungen von SC35 und H3K27me3 untersucht. *Splicing Speckles* sind die Aufenthaltsorte von splicing Faktoren. Diese sind in der Interchromatin-Domäne lokalisiert und besitzen unterschiedliche Größen und Formen (Lamond and Spector, 2003). Der Splicing-Faktor SC35 reichert sich in der konventionellen

Zellkernarchitektur in einer zentral gelegenen Zone an und zeigt ein typisches Verteilungsmuster (Berchtold et al., 2011). Die Histonmodifikation H3K27me3 ist ein Marker für fakultatives Heterochromatin (Kouzarides, T. 2007).

Zunächst wurden humane Fibroblasten mit Chaetocin induziert, fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
M $\alpha$ SC35	G $\alpha$ M-FITC
R $\alpha$ H3K27me3	G $\alpha$ R-Cy3



**Abb. 37: 3D-Topologie von SC35 und H3K27me3 in Bezug zur CICC-Oberfläche**

- A) RGB-Projektion von DAPI (grau) und SC35 (grün)  
 B) RGB-Projektion von H3K27me3 (rot) und SC 35 (grün)  
 C) Verteilung von IF-Signalen;

Radiale Verteilung von SC35 und H3K27me3 in einem Fibroblasten-Zellkern der zwei Tage mit Chaetocin behandelt wurde.

SC35: hellgrüne Kurve, H3K27me3: rote Kurve, DAPI: schwarze Kurve, H3K9me3: rote Kurve. Die Ordinate zeigt den relativen Signal-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur CICC-Oberfläche in nm. Signale mit negativen Werten befinden sich innerhalb des Clusters und Signale mit positiven Werten sind außerhalb des Clusters.

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, gibt es eine klare Tendenz der radialen Verteilung von SC35 und H3K27me3. H3K27me3, ein Marker für fakultatives Heterochromatin ist überwiegend innerhalb der CICC's lokalisiert, wohingegen SC35 überwiegend an der Oberfläche und außerhalb der CICC zu finden ist.

17% der SC35-Signale sind innerhalb der Cluster und 83% außerhalb der Cluster, wohingegen 92% der H3K27me3 innerhalb und 8% außerhalb der Cluster sind.

Mit dieser IF konnten wir belegen, dass das stark kondensierte Heterochromatin für eine Antikörperfärbung zugänglich ist, die der Marker für inaktives Chromatin sich im Cluster anreichern konnte.

#### Statistische Auswertung:

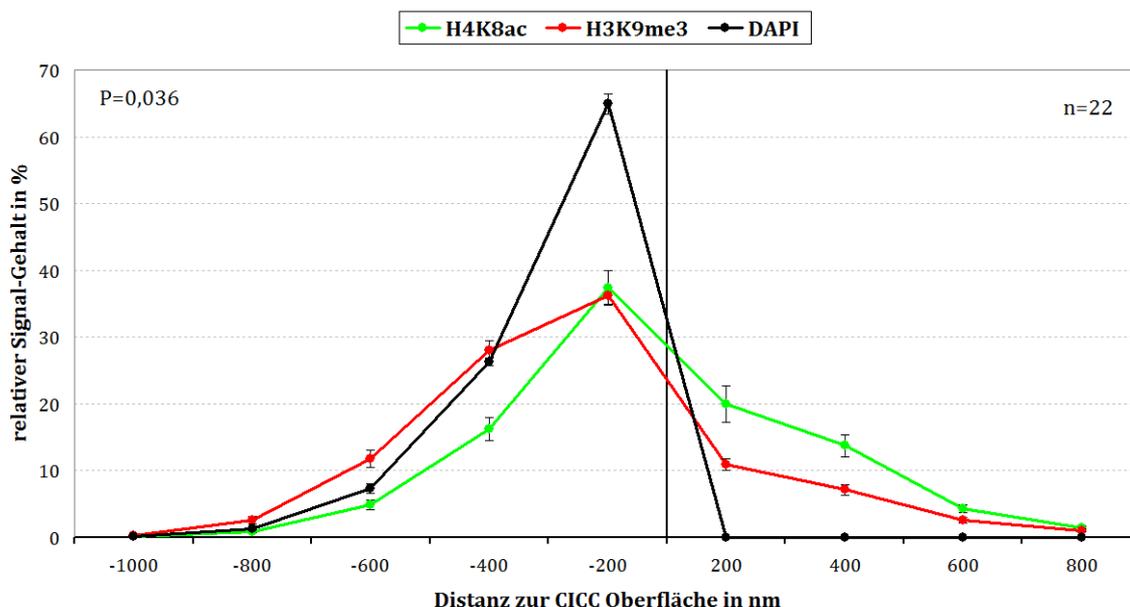
Eine Varianzanalyse der Verteilung von SC35 und H3K27me3 mittels des Mann-Whitney Rank Sum-Tests ergab einen P-Wert von 0,001. Dadurch kann gezeigt werden, dass die IF-Signale nach einer Chaetocin-Behandlung nicht zufällig im Zellkern verteilt sind.

#### 3.7.5 Radiale Verteilung der Chromatin-Textur von H4K8ac und H3K9me3

Es soll die Verteilung von aktivem und inaktivem Chromatin mit den Histonmarkern H4K8ac und H3K9me3 untersucht werden.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
R $\alpha$ H4K8ac	G $\alpha$ R-FITC
Rabbitserum	
R $\alpha$ H3K9me3	G $\alpha$ R-Cy3



**Abb. 38: Diagramm der radialen Verteilung von H4K8ac und H3K9me3 in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion in Bezug zur CICC-Oberfläche**

H4K8ac: hellgrüne Kurve H3K9me3: rote Kurve, DAPI: schwarze Kurve,  
Die Ordinate zeigt den relativen Signal-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur CICC-Oberfläche in nm. Signale mit negativen Werten befinden sich innerhalb des Clusters und Signale mit positiven Werten sind außerhalb des Clusters.

Wie aus der eADS-Kurve zu entnehmen ist, gibt es eine großflächige Kolo-kalisation von aktivem und inaktivem Chromatin. Dennoch unterscheiden sich die Kurven hinsichtlich ihrer Verteilung. H4K8ac-Signale haben die Tendenz, sich außerhalb der CICC's anzulagern und K3K9me3 kolokalisiert überwiegend mit der DAPI-Färbung.

#### Statistische Auswertung:

Um zu testen, ob sich das aktive und das inaktive Chromatin hinsichtlich ihrer Position zu den CICC's statistisch signifikant unterscheiden, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Signifikanztest durchgeführt. Dieser ergab einen P-Wert von 0,036.

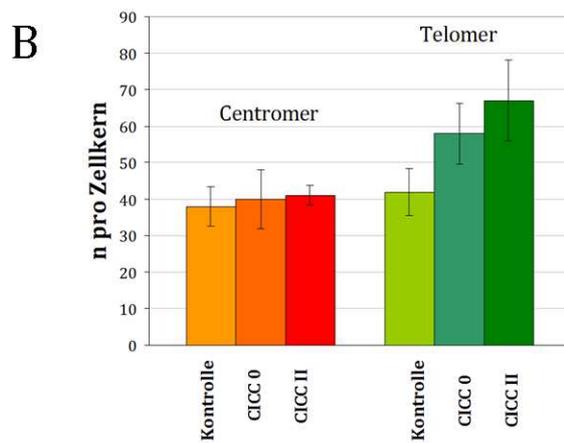
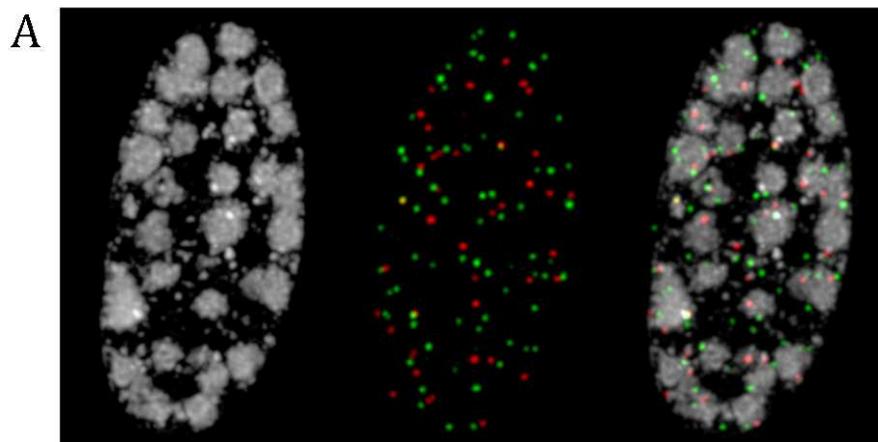
#### 3.7.6 Radiale Verteilung von Zentromeren und Telomeren

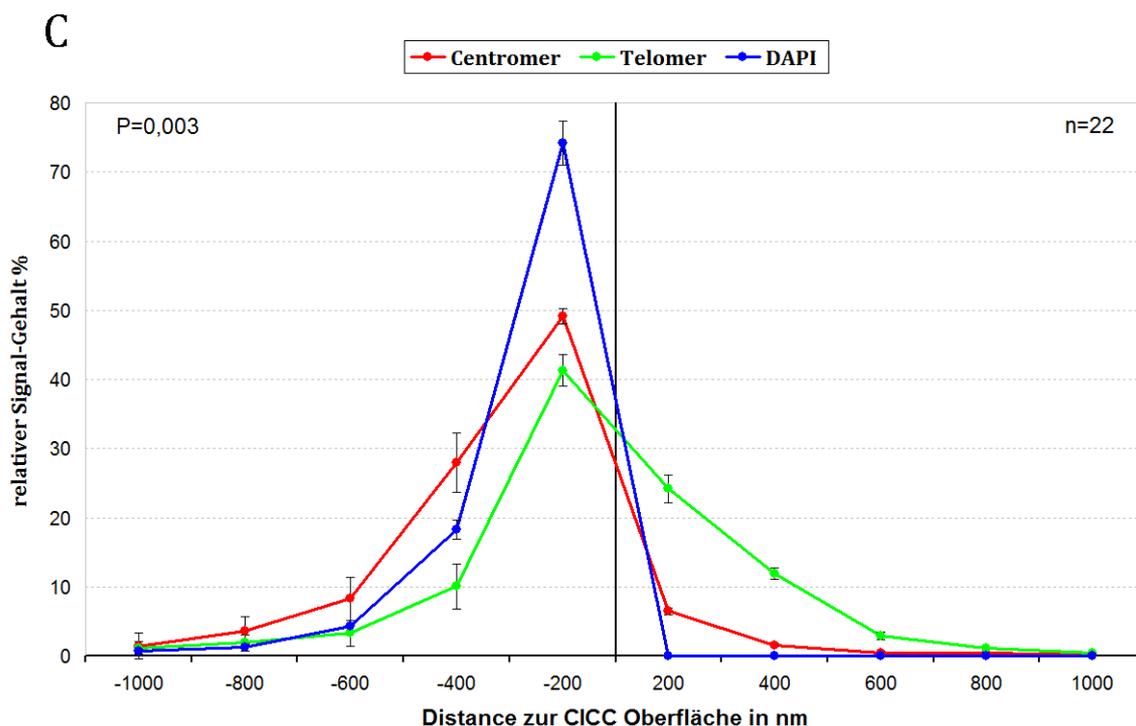
Zentromere und Telomere sind repetitive DNS-Elemente, die nicht für Proteine kodieren.

Telomere sind doppelsträngige DNS-Moleküle mit TTAGGG-Wiederholungen, dieser Bereich ist bei Menschen im Durchschnitt 10.15kb lang. Des Weiteren sind Telomere Speicherorte zahlreicher Proteine und Proteinkomplexe, wie TRF1 und TRF2 (telomere repeat binding factor). Im nächsten Experiment soll die Position von Zentromeren und Telomeren in Bezug zu CICC's untersucht werden.

Detektionsschema:

1. AK	2. AK
R $\alpha$ Crest	D $\alpha$ H-Cy3
M $\alpha$ TRF2	S $\alpha$ M-FITC





**Abb. 39: 3D-Topologie von Zentromeren und Telomeren nach Chaetocin-Induktion**

- A) RGB-Projektion von Zentromeren (rot), Telomeren (grün) und CICC-II (grau).  
 B) Excel-Graph über die Verteilung von Zentromeren (rot) und Telomeren (grün) in Kontrollen, CICC-O und CICC-II.  
 C) eADS-Graph über die Verteilung von Zentromeren (rote Kurve) und Telomeren (grüne Kurve) in Bezug zur CICC-Oberfläche (blaue Kurve).

Die Abbildung 39 zeigt A) eine Immunfluoreszenz von Telomeren (grün) und Zentromeren (rot) in humanen Fibroblasten, die mit Chaetocin behandelt wurden.

In B) kann man erkennen, dass die Anzahl der Zentromere gleich konstant ist, d.h. 40 Signale pro Zellkern (+/- 2). Hingegen nimmt die Frequenz der Telomersignale mit dem Kondensierungsgrad zu. In der Kontrolle gibt es pro Zellkern durchschnittlich 42 Signale, in CICC-0-Zellen 58 und in CICC-II-Zellen 67 Signale.

C) Die eADS-Aufwertung zeigt eine unterschiedliche Verteilung von Zentromeren und Telomeren in Bezug zur CICC-Oberfläche. Zentromere nehmen eine zentrale Position in einem CICC ein und Telomere sind sowohl in als auch außerhalb eines CICC positioniert.

### Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung der eADS-Signale anhand des Mann-Whitney Rank Sum-Tests ergab einen P-Wert von 0,003. Dies bedeutet, Zentromere und Telomere sind in Bezug zur CICC-Oberfläche unterschiedlich verteilt.

## 3.8 3D-FISH-Experimente

Aus den vorherigen Untersuchungen an humanen Fibroblasten war die unterschiedliche Verteilung von aktivem und inaktivem Chromatin in Bezug auf die CICC-Oberfläche und der Lage von Zellkernorganellen außerhalb der CICCs bekannt.

Es war nun von Interesse, ob auch das Chromatin hinsichtlich seiner Gendichte unterschiedlich verteilt ist. Daher wurden 3D-FISH-Experimente von ganzen Chromosomen und von subchromosomalen Abschnitten, die sich hinsichtlich ihrer Gendichte unterscheiden, durchgeführt.

### 3.8.1 Verteilung der Chromosomen 18, 19 und *Alu*-Sequenzen

Die humanen Chromosomen 18 und 19 sind nahezu gleich groß, unterscheiden sich jedoch in ihrer Gendichte. Das Chromosom 18 enthält 8 Gene pro Mbp und das Chromosom 19 28 Gene pro Mbp. Das Chromosom 19 ist das *Alu*-Sequenz reichste Chromosom.

*Alu*-Sequenzen sind SINEs (short interspersed nuclear elements), diese gehören zu den repetitiven DNS-Elementen. *Alu*-Sequenzen kommen bevorzugt in R-Banden und in genreichen Regionen des Chromosoms vor. Dort liegen sie bevorzugt in den Introns von Genen. In diesem Versuch soll der Einfluss von Chaetocin auf die radiale Verteilung der Chromosomen 18, 19 und der *Alu*-Sequenzen untersucht werden.

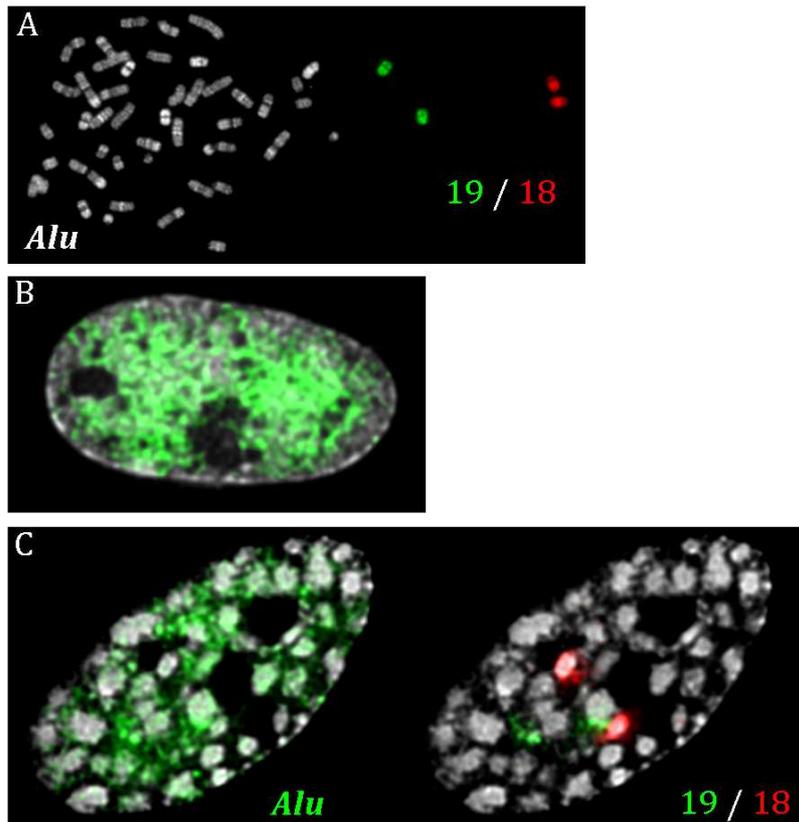
### Testen der DNS-Sonden auf Metaphasen

Die Sondenqualität wurde auf einem 2D-Methaphasepräparat getestet.

Die *Alu*-Sonden wurden mit Primern aus genomischer DNS wie in 2.7.4 beschrieben hergestellt und mit direkt fluoreszierenden Nukleotiden markiert. Das Chromosom 18 wurde mit DNP und das Chromosom 19 mit Biotin markiert.

Detektionsschema:

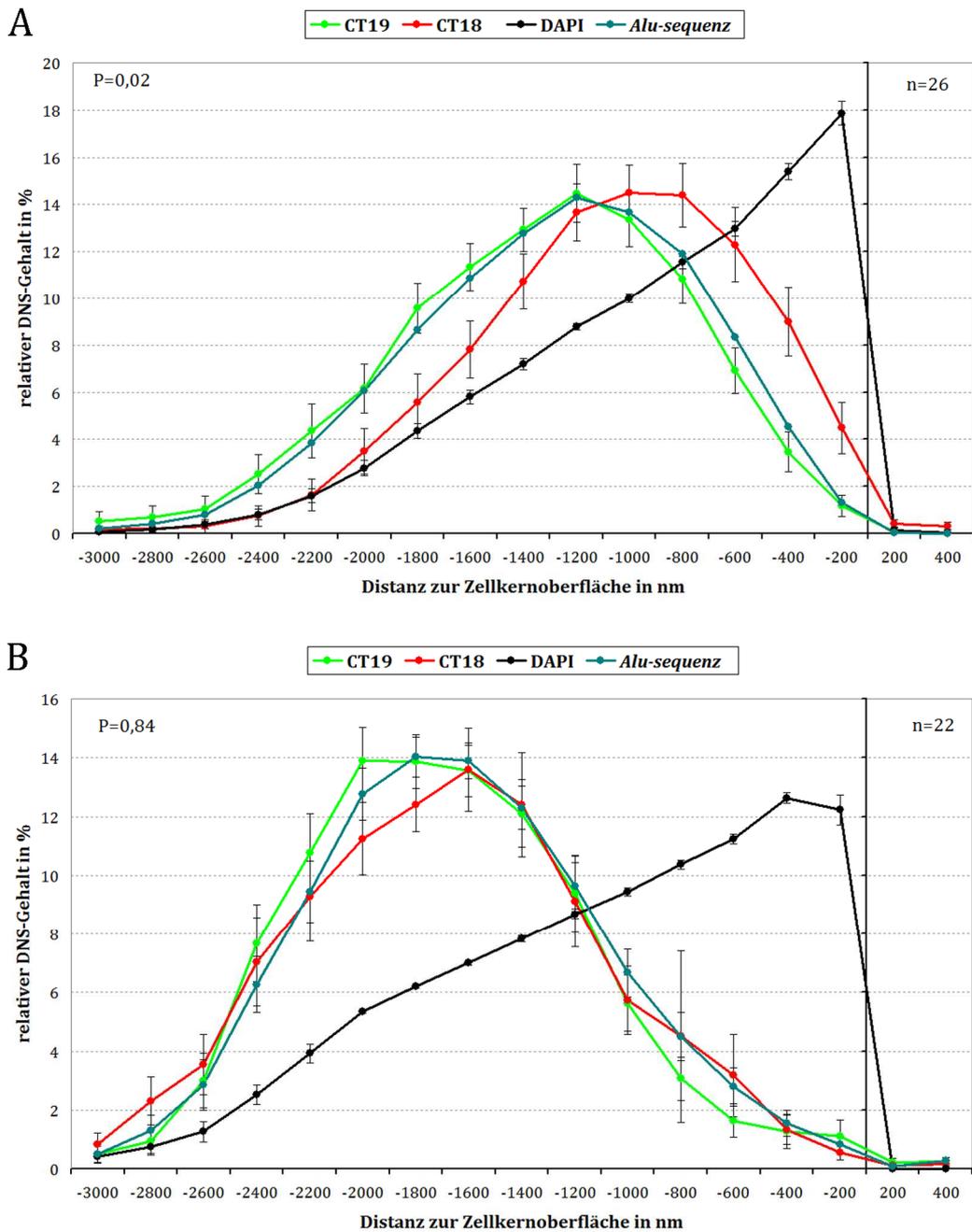
DNS	Markierung	Detektion
<i>Alu</i> -Sequenzen	Cy3	
Paint #18	DNP	R $\alpha$ DNP G $\alpha$ R- Cy5
Paint #19	Biotin	Avidin –Alexa-488
DNS-Färbung	-	DAPI



**Abb. 40: DNS-Sonden für die Chromosomen 18, 19 und humane *Alu*-Sequenzen**

A) Dargestellt ist eine humane Metaphase, die mit *Alu*-Sonden (grau) und Sonden für die Chromosomen 19 (grün) und 18 (rot) hybridisiert wurde.  
 B) Zeigt einen Kontroll-Fibroblast, DAPI (grau), *Alu*-Sonden (grün)  
 C) Zeigt einen Fibroblasten, der zwei Tage lang mit Chaetocin induziert wurde und sein Chromatin zu einem CICC-II-Phänotyp (grau) reorganisiert hat. Das Chromosom 19 ist in grün und das Chromosom 18 ist in rot dargestellt.

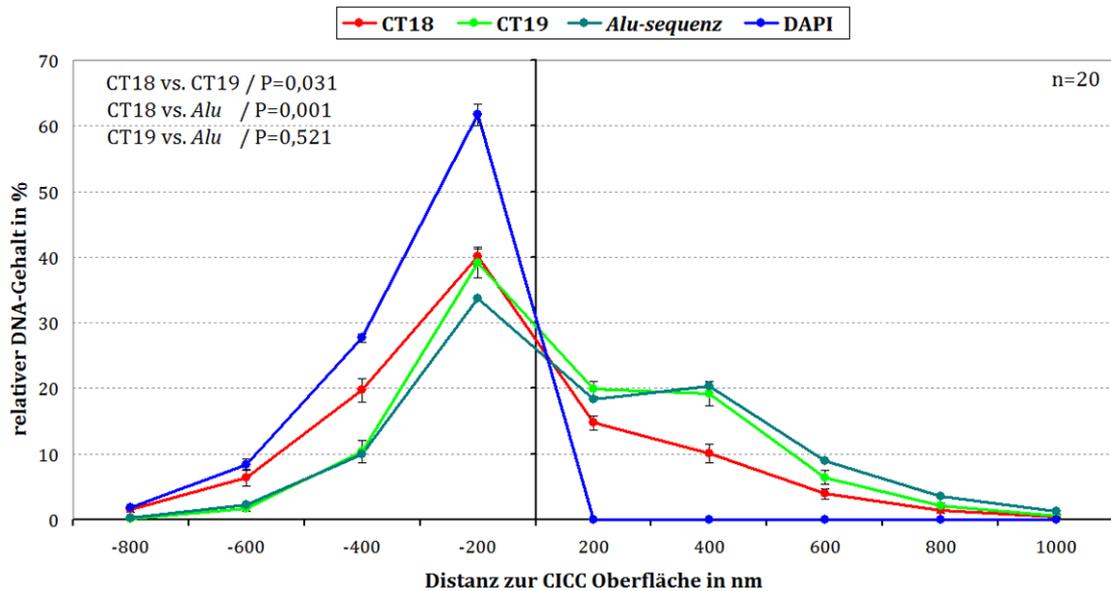
Die Abbildung 40 B zeigt einen lichtoptischen Schnitt eines Kontroll-Zellkerns, in dem die *Alu*-Sequenzen (grün) eine zentrale Position einnehmen und der Zellkernrand zum Teil keine *Alu*-Signale zeigt. C zeigt einen lichtoptischen Schnitt eines humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion. Der Zellkern hat sein Chromatin reorganisiert. Zwischen den CICC-II-Clustern befinden sich *Alu*-Signale (grün) und das genreiche Chromosom 19 ist ebenfalls zwischen den DAPI- Clustern lokalisiert. Hingegen kolokalisiert das genarme Chromosom 18 mit den Clustern.



**Abb. 41: eADS-Graphen von den Chromosomen 18, 19 und *Alu*-Sequenzen in Bezug zur Zellkernoberfläche**

In A ist das eADS-Ergebnis der Kontrolle und in B das eADS-Ergebnis von Zellkernen, die mit Chaetocin behandelt wurden, dargestellt. Das Chromosom 18 ist in rot, das Chromosom 19 ist in hellgrün, die *Alu*-Sequenzen sind in dunkelgrün und DAPI ist in schwarz dargestellt.

In Bezug zur Zellkernoberfläche sind genreiche und genarme DNS nach einer Chaetocin-Behandlung (B) gleich verteilt.



**Abb. 42: eADS-Graphen von den Chromosomen 18, 19 und *Alu*-Sequenzen in Bezug zur CICC-Oberfläche im Zellkern humaner Fibroblasten**

CICC: blaue Kurve, #18: rote Kurve, #19: grüne Kurve, *Alu*-Sequenz: dunkelgrüne Kurve. Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in %, die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche.

Die Abbildung 42 zeigt die Chromatin-Verteilung in humanen Fibroblasten nach einer Chaetocin-Behandlung. Auch außerhalb der CICCs befindet sich DNS. Je höher die Dendichte ist, desto mehr DNS ist außerhalb der Cluster.

Die Verteilung der Kurve vom Chromosom 19 ist fast deckungsgleich mit der Kurve von den *Alu*-Sequenzen. Hingegen ist das Chromosom 18 zu Chromosom 19 und den *Alu*-Sequenzen unterschiedlich verteilt. Die eADS-Kurven bestätigen die Epifluoreszenzbilder von Abb. 40.

#### Statistische Auswertung:

Auch hier wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt.

Er führte in Zellkernen die ihr Chromatin zu CICCs organisiert haben zu folgenden Werten:

DNS-Signale	P-Werte
CT18 vs. CT19	P=0,031
CT18 vs. <i>Alu</i>	P=0,001
CT19 vs. <i>Alu</i>	P=0,521

### 3.8.2 Verteilung von Xp11 und Xq25

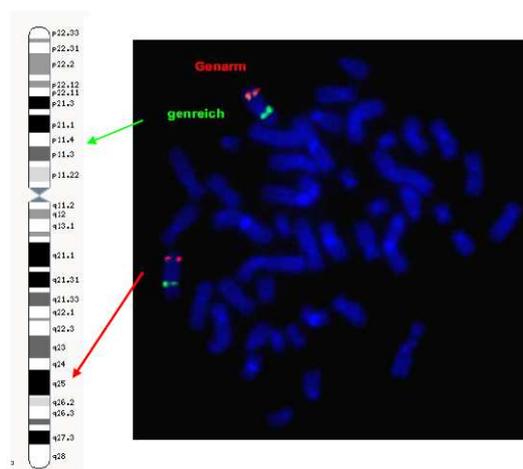
Das humane X-Chromosom ist 155Mbp groß und besitzt 1336 Gene, was einer Gendichte von 8,6 Genen/Mb entspricht. Somit ist die Gendichte entlang des X-Chromosoms eine der niedrigsten im gesamten Genom. Die Gene sind jedoch nicht gleichmäßig über das X-Chromosom verteilt. Trotz der allgemeinen Gen-Armut besitzt das X-Chromosom zwei RIDGEs. Eines davon liegt in der Region Xp11 und das andere auf dem langen Arm in der Region Xq28 (Versteeg et al., 2003). Im folgenden Experiment wird die Lage genreicher und genarmer Subregionen des X-Chromosoms in humanen Fibroblasten mit und ohne Chaetocin-Behandlung untersucht. Die genreiche Region befindet sich auf Xp11 (von 46.51Mb bis 49.46Mb) und beinhaltet 8 BACs, die genarme Region befindet sich auf Xq25 (von 121.31Mb bis 125.90Mb) und besteht ebenfalls aus 8 BACs. Die Zusammensetzung der BAC-Pools ist in 3.1 beschrieben.

#### Testen der DNS-Sonden in 2D-FISH

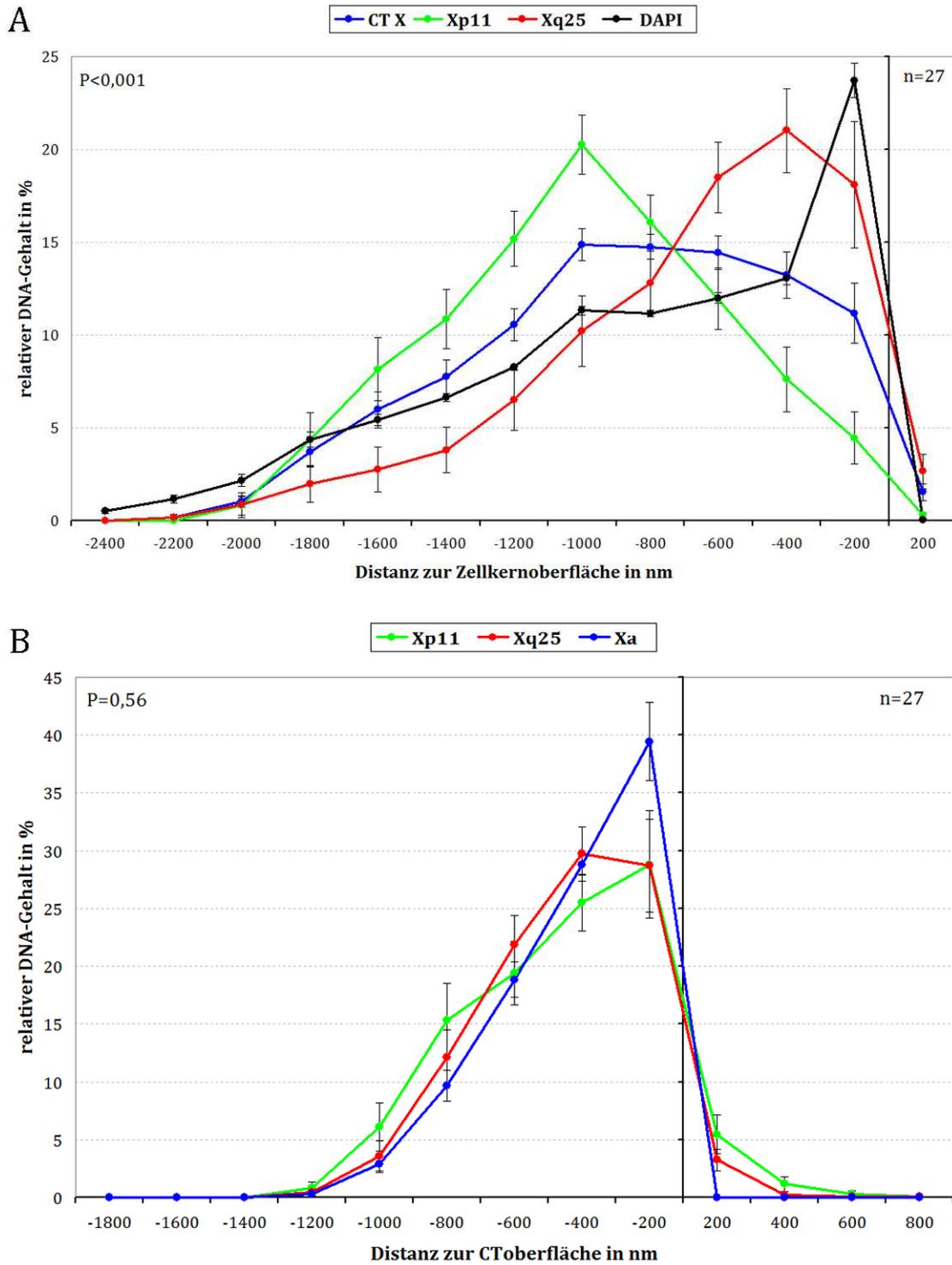
Die Sondenqualität wurde auf einem 2D-Metaphasepräparat getestet. Hierfür wurden DNS-Sonden verwendet, die durch Nicktranslation markiert wurden. Der genarme BAC-Pool wurde mit Digoxigenin-dUTP und der genreiche mit Biotin-dUTP markiert.

Detektionsschema:

BAC-Pools	Markierung	Detektion
Xp11	Biotin	Avidin –Alexa-488
Xq25	Dig	M $\alpha$ Dig-Cy5
Gegenfärbung	-	DAPI

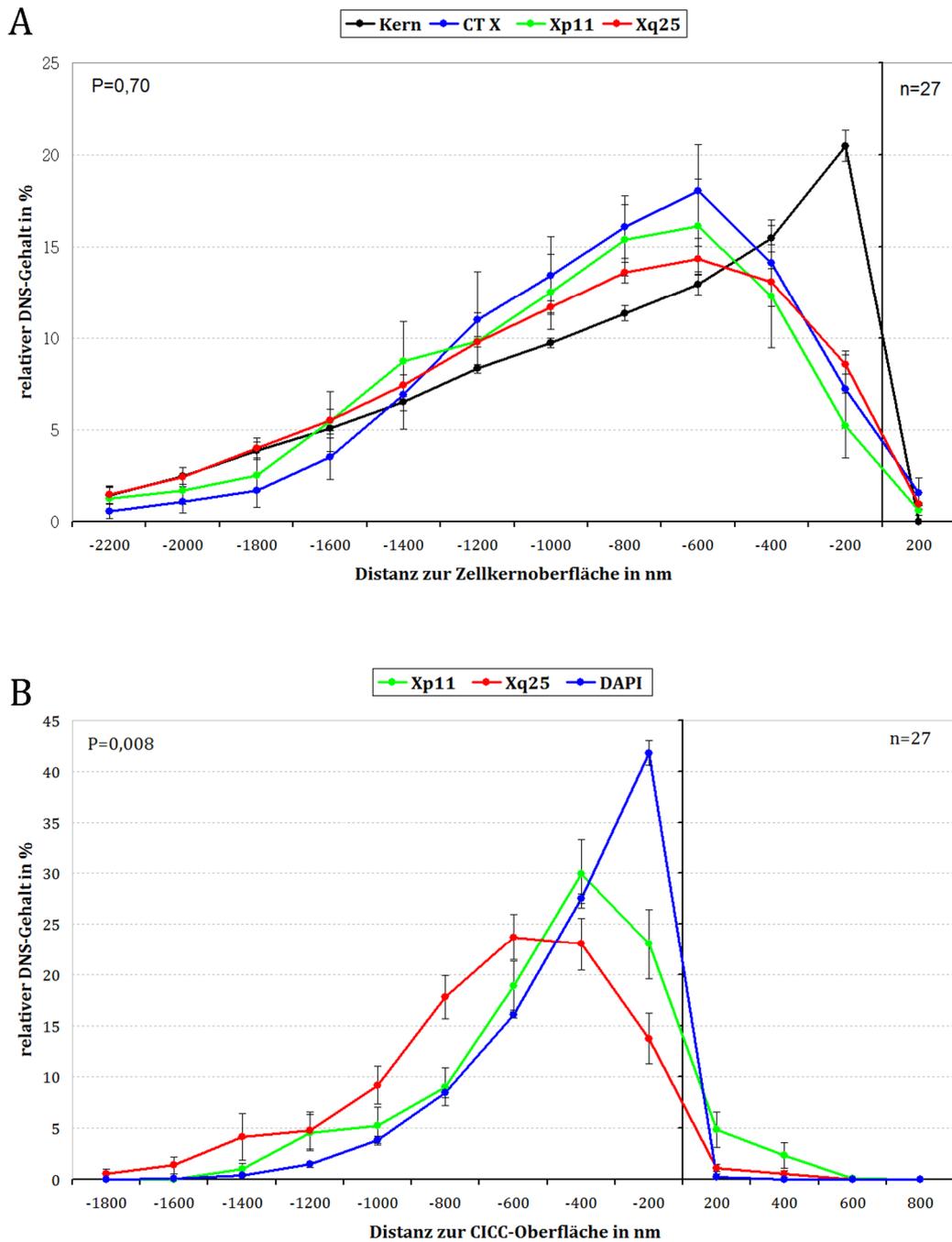


**Abb. 43: Idiogramm des X-Chromosoms und eine 2D-Metaphase mit der genreichen Subregion Xp11 (in grün) und der genarmen Subregion Xq25 (in rot)**



**Abb. 44: Radiale Verteilung von Xp11 und Xq25 in humanen Fibroblasten**

A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-X (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool Xp11 (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool Xq25 (rote Kurve).  
 B) CT-X (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool Xp11 (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool Xq25 (rote Kurve).



**Abb. 45: Radiale Verteilung von Xp11 und Xq25 in humanen Fibroblasten nach einer Chaetocin-Behandlung**

A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-X (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool Xp11 (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool Xq25 (rote Kurve).

B) CT-X (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool Xp11 (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool Xq25 (rote Kurve).

Aus den Abbildungen 44 und 45 ist zu entnehmen:

In der Kontrolle, d. h. in unbehandelten Zellkernen, verteilen sich genreiche und genarme Subregionen des X-Chromosoms wie erwartet. Der genreiche BAC-Pol Xp11 nimmt eine zentrale Position im Zellkern ein, wohingegen der genarme BAC-Pol Xq25 am Zellkernrand

lokalisiert ist. Die Verteilungen der BAC-Pools in Bezug zum Chromosomen-Territorium entsprechen auch der Erwartung, d.h. Xp11 und Xq25 unterscheiden sich nicht.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse des eADS-Programms mit dem Mann-Whitney Rank Sum-Test ergeben folgende Werte:

Die Verteilung von Xp11 und Xq25

- in Bezug zur Zellkernoberfläche ergibt einen P-Wert von  $P < 0,001$ .
- in Bezug zur CT-Oberfläche ergibt einen P-Wert von  $P = 0,56$ .

In Fibroblasten, die mit Chaetocin behandelt worden sind, verändert sich die Chromatin-Verteilung. Xp11 und Xq25 sind im Bezug zur Zellkernoberfläche gleich verteilt.

In Bezug zur CICC-Oberfläche verteilen sie sich unterschiedlich, in dem die genreiche Subregion an der Oberfläche der CICC's und die genarme Subregion im Zentrum von CICC's lokalisiert sind.

Die statistische Untersuchung mit dem Mann-Whitney Rank Sum-Test ergeben folgende Werte:

Die Verteilung von Xp11 und Xq25 nach einer Chaetocin-Behandlungen

- in Bezug zur Zellkernoberfläche ergibt einen P-Wert von  $P = 0,70$
- in Bezug zur CT-Oberfläche ergibt eine P-Wert von  $P = 0,008$ .

### 3.8.3 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 1

Nachdem nun fest gestellt wurde, dass die genreichen und genarmen Subregionen des X-Chromosoms sich hinsichtlich ihrer Gendichte in Bezug zur CICC-Oberfläche neu organisieren, wurde die Verteilung von Subregionen von weiteren Chromosomen getestet.

Die Zusammenstellung der BAC-Sonden für das Chromsoms 1 ist in 3.1 beschrieben.

Nach dem erfolgreichen Testen der BAC-Pools in einer 2D-FISH auf humanen Metaphasen (siehe Abb. 46) wurde eine 3D-FISH durchgeführt. Anschließend wurden 3D-Bilderstapel an einem konfokalen Leica SP5 aufgenommen, in ImageJ bearbeitet und mit eADS ausgewertet.

Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Genreich	Bio	Avidin –Alexa-488
Genarm	Dig	M $\alpha$ Dig-Cy5
Paint	DNP	R $\alpha$ DNP G $\alpha$ R- Cy3
Gegenfärbung	-	DAPI

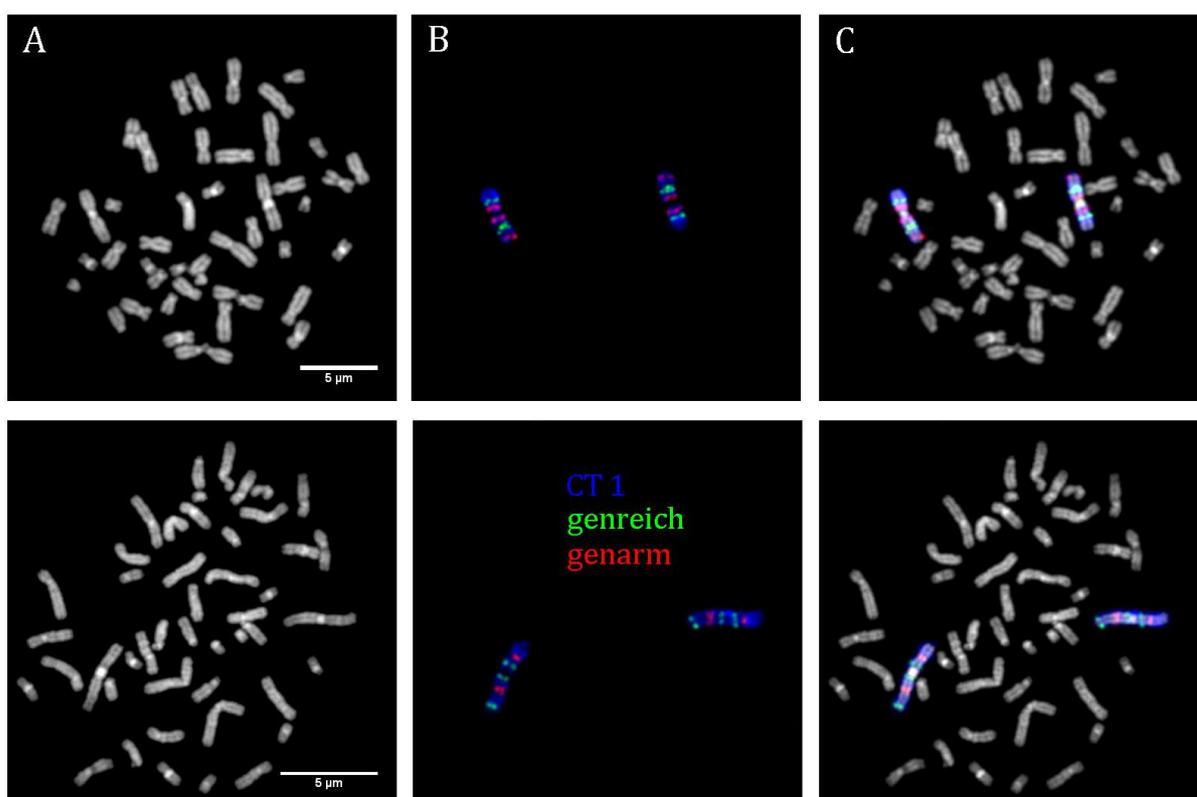
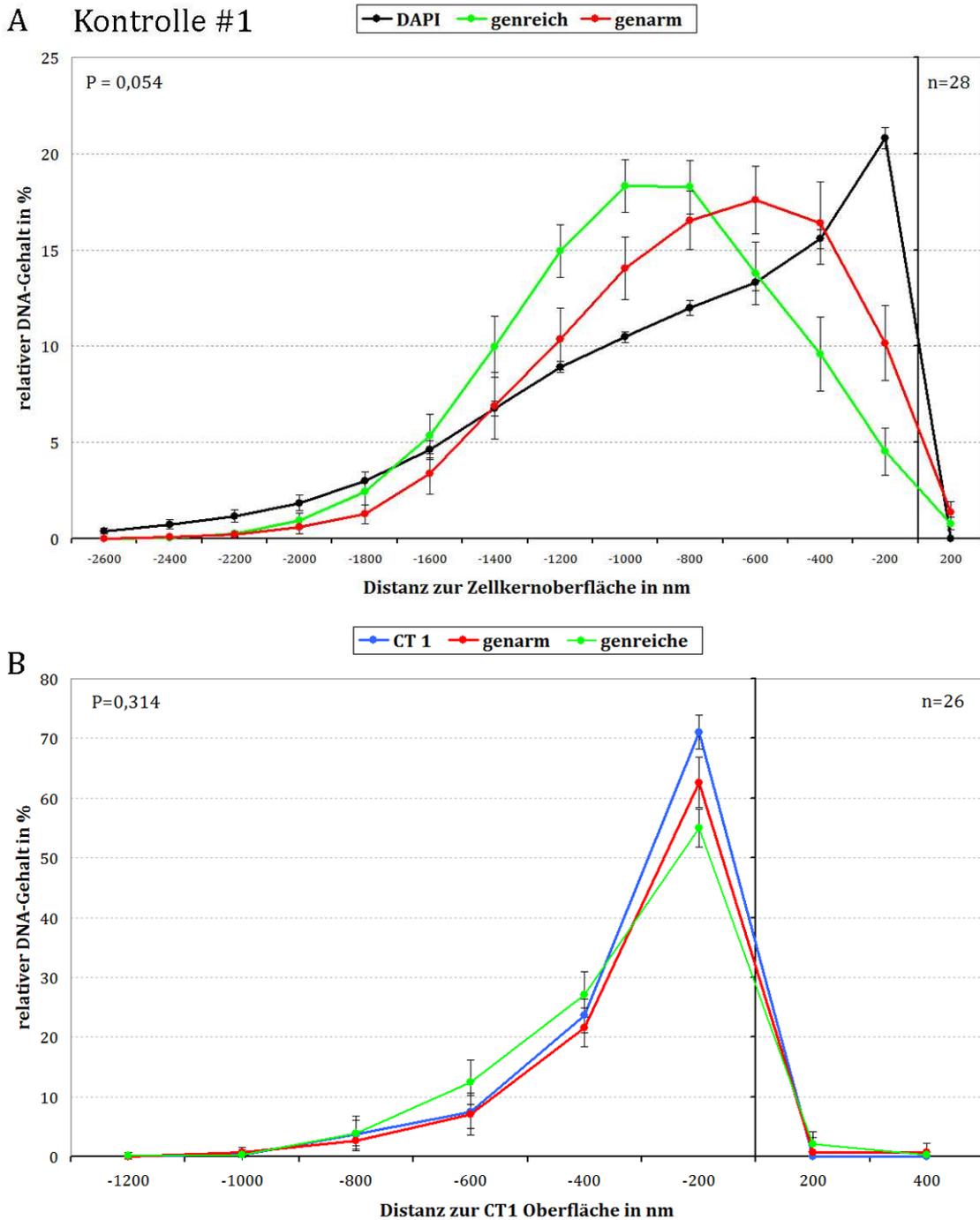
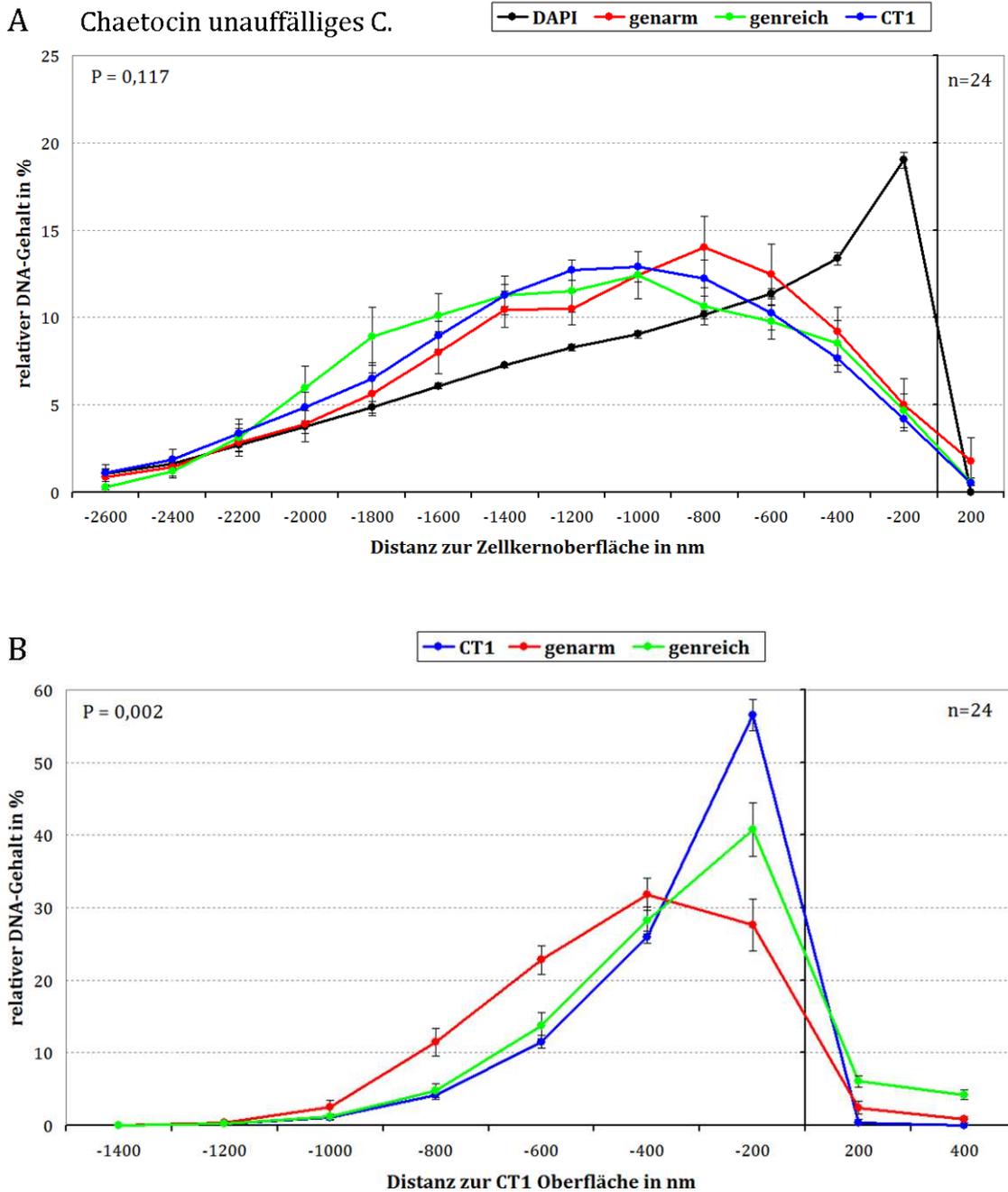


Abb. 46: 2D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1



**Abb. 47: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 in humanen Kontroll-Fibroblasten**

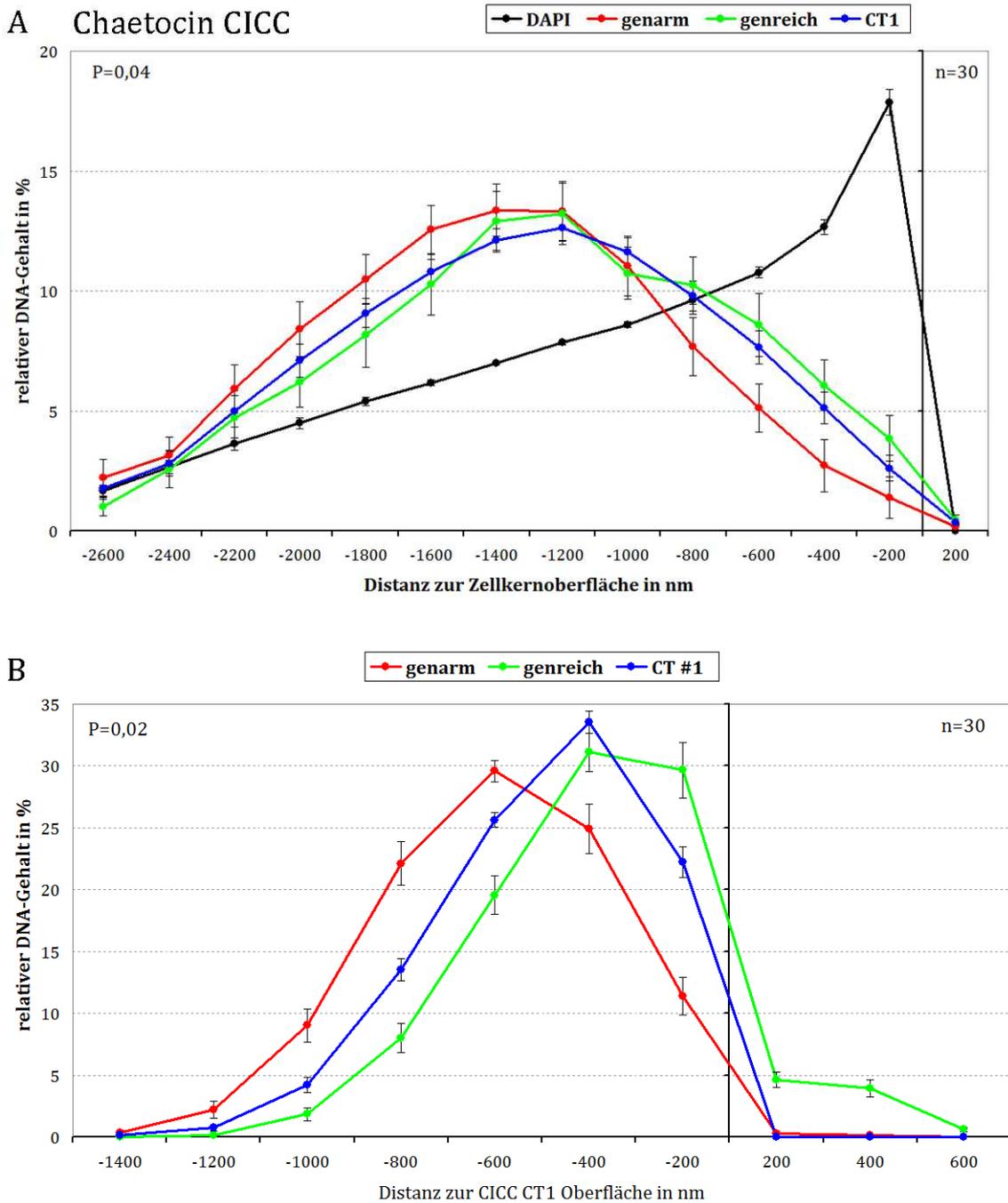
- A) Zellkernrand (schwarze Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).  
 B) CT-1 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).



**Abb. 48: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung**

A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-1 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).

B) CT-1 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).



**Abb. 49: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung**

A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-1 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).  
 B) CICC-Oberfläche (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).

Wie aus der Abbildung 47 zu erkennen ist,

ist in Kontroll-Fibroblasten die radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen (#1) wie man es erwartet, d.h. die genreichen Sequenzen nehmen eine zentrale Position ein

und die genarmen eine periphere; eine gendichte-abhängige Chromatin-Polarität in Bezug zum CT ist nicht vorhanden.

In Chaetocin behandelten Zellen dreht sich dieses allgemeingültige Prinzip um.

Dort ist die Chromatin-Polarität zum Zellkernrand aufgehoben, stattdessen gibt es eine gendichte-abhängige Verteilung zur CICC-Oberfläche.

### Statistische Auswertung

genreicher und genarmer Sequenzen von Chromosom 1 in der Kontrolle, in Zellen, die mit Chaetocin behandelt wurden und eine unauffällige DAPI-Färbung haben und Zellen mit CICC-Bildung.

Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab folgende Ergebnisse:

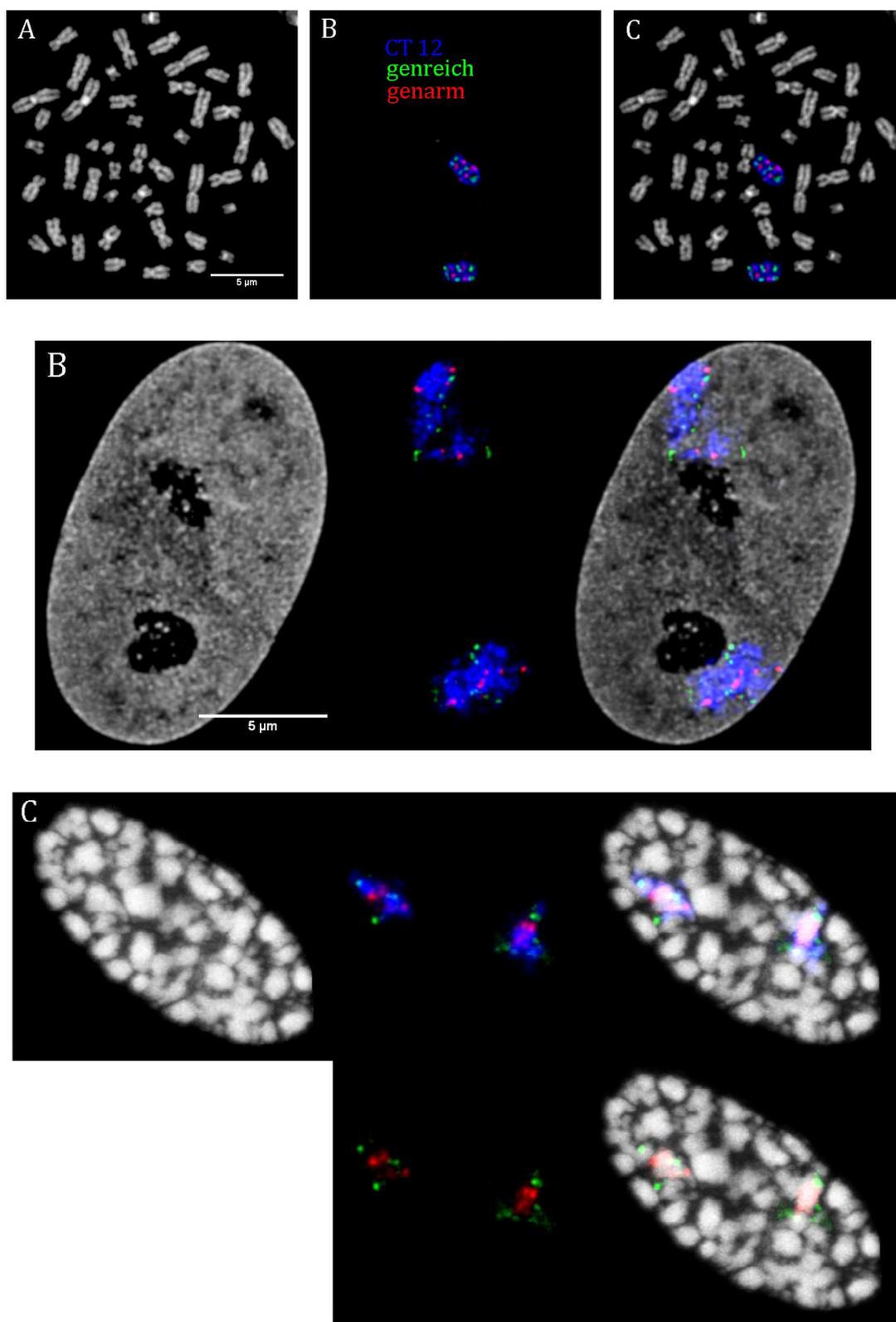
#1	n	Kontrolle	n	Chaetocin ohne CICC	n	Chaetocin mit CICC
In Bezug zum Zellkernrand	28	P=0,054	24	P=0,117	30	P=0,04
In Bezug zum CT	26	P=0,314	24	P=0,002	40	P=0,02

### 3.8.3 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12

Nachdem bekannt war, dass sich die subchromosomalen Abschnitte von den Chromosomen 1 und X hinsichtlich ihrer Gendichte nach einer Chaetocin-Behandlung neu organisieren, wurde ein weiteres Chromosom getestet. Die Zusammensetzung der BAC-Pools für das Chromosom 12 ist in 3.1 beschrieben.

Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Genreich	Bio	Avidin –Alexa-488
Genarm	Dig	M $\alpha$ Dig-Cy5
Paint	DNP	R $\alpha$ DNP G $\alpha$ R- Cy3
Gegenfärbung	-	DAPI



**Abb. 50: genreiche und genarme BAC-Pools von Chromosom 12**

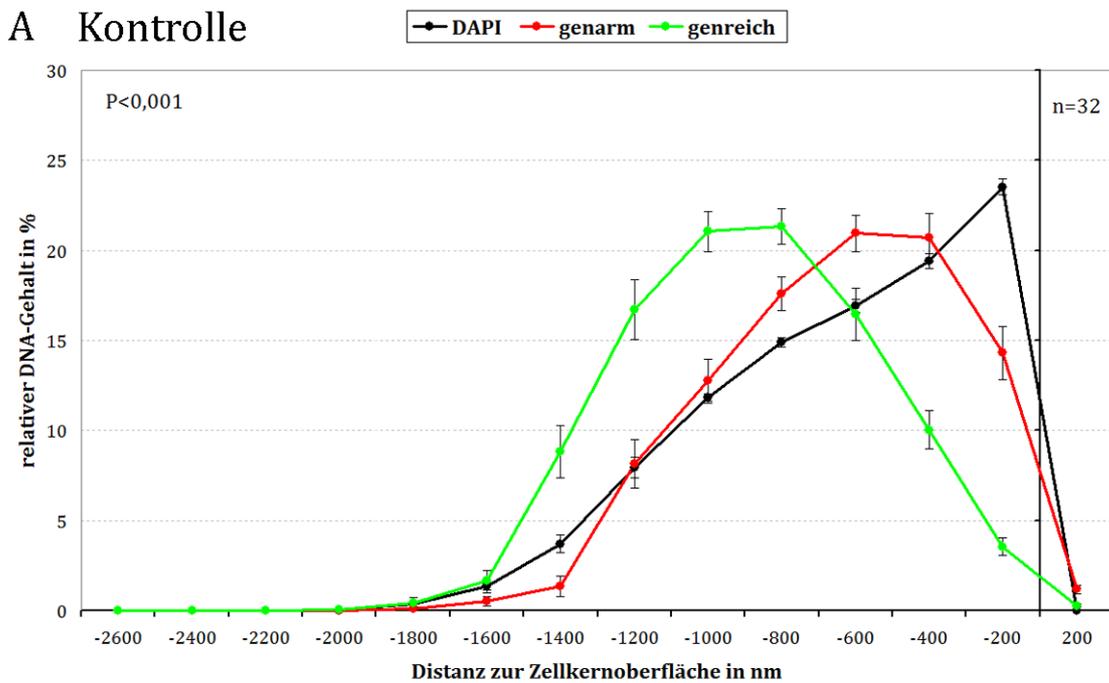
- A) humane Metaphase mit einer 2D-FISH für genreiche (grün) und genarme (rot) subchromosomale Abschnitte des Chromosoms 12 (blau)
- B) 3D-FISH in Kontroll-Fibroblasten
- C) 3D-FISH in Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung mit kondensiertem Chromatin

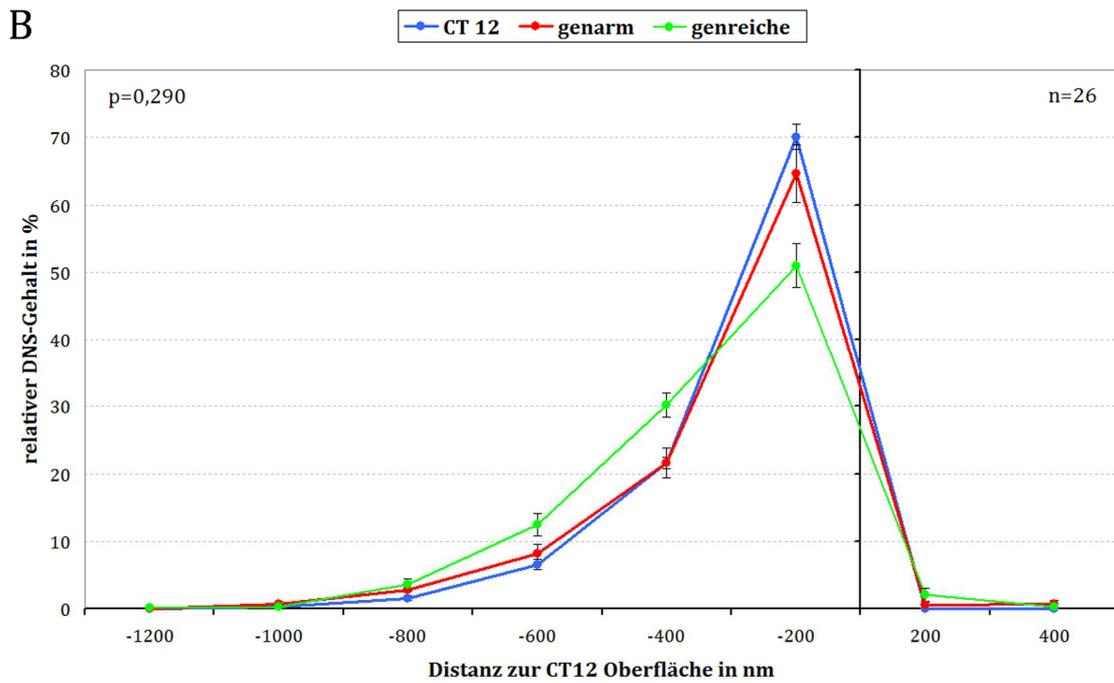
Wie man in Abb. 50-A erkennen kann, sind die BAC-Signale für die genreichen (grün) und genarmen (rot) Subregionen spezifisch und von guter Qualität.

50-B) zeigt einen humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung mit unauffälligem Chromatin in der DAPI-Färbung. Bereits hier ist eine Aufhebung der gendichte-abhängigen Chromatin-Polarität zum Zellkernrand zu erkennen.

50-C) humane Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung mit CICC-II-Chromatin.

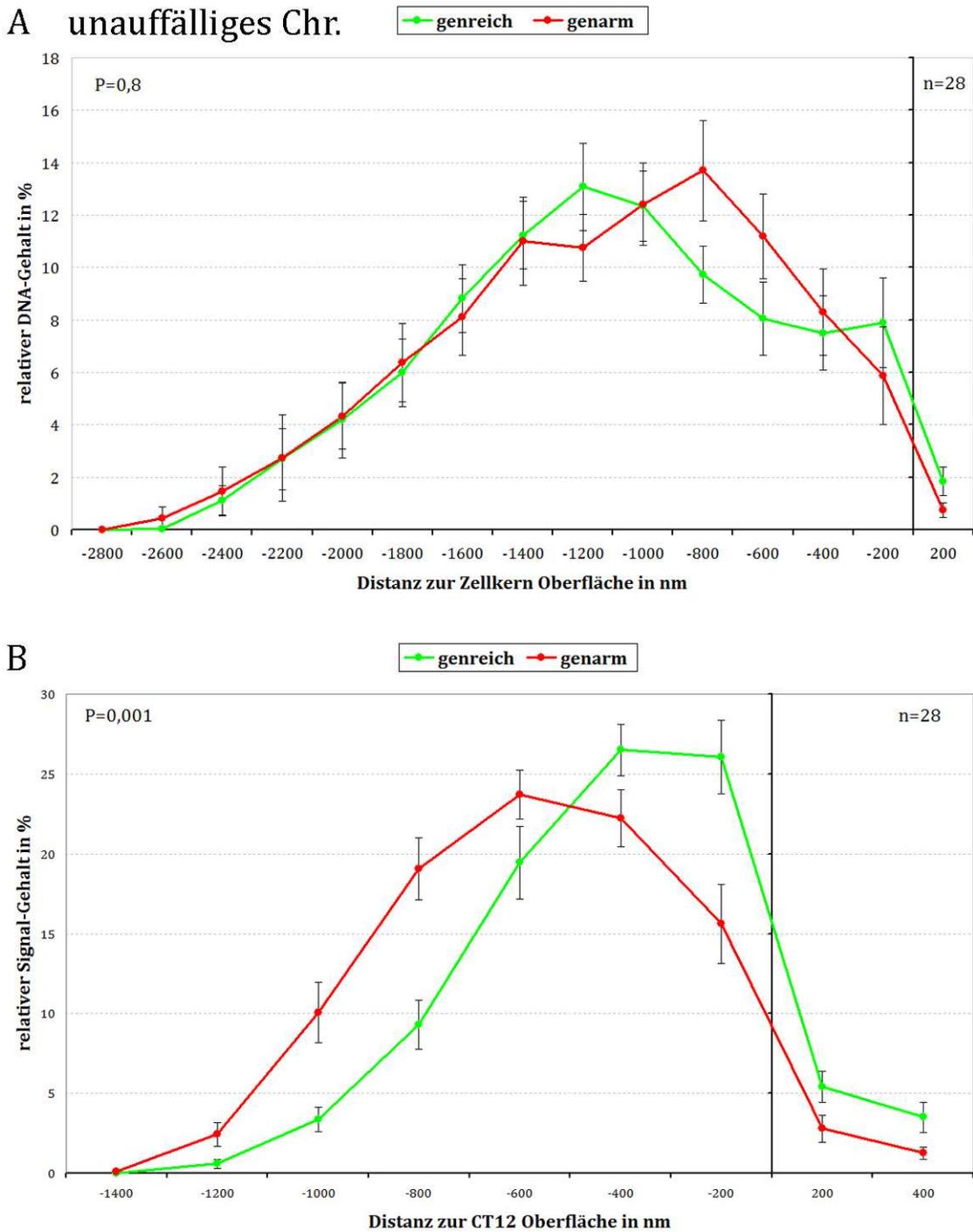
Die genreichen Subregionen (grün) lagern sich um die CICC's und um die genarme DNS, die genarmen Subregionen (rot) kolokalisieren mit den Clustern.





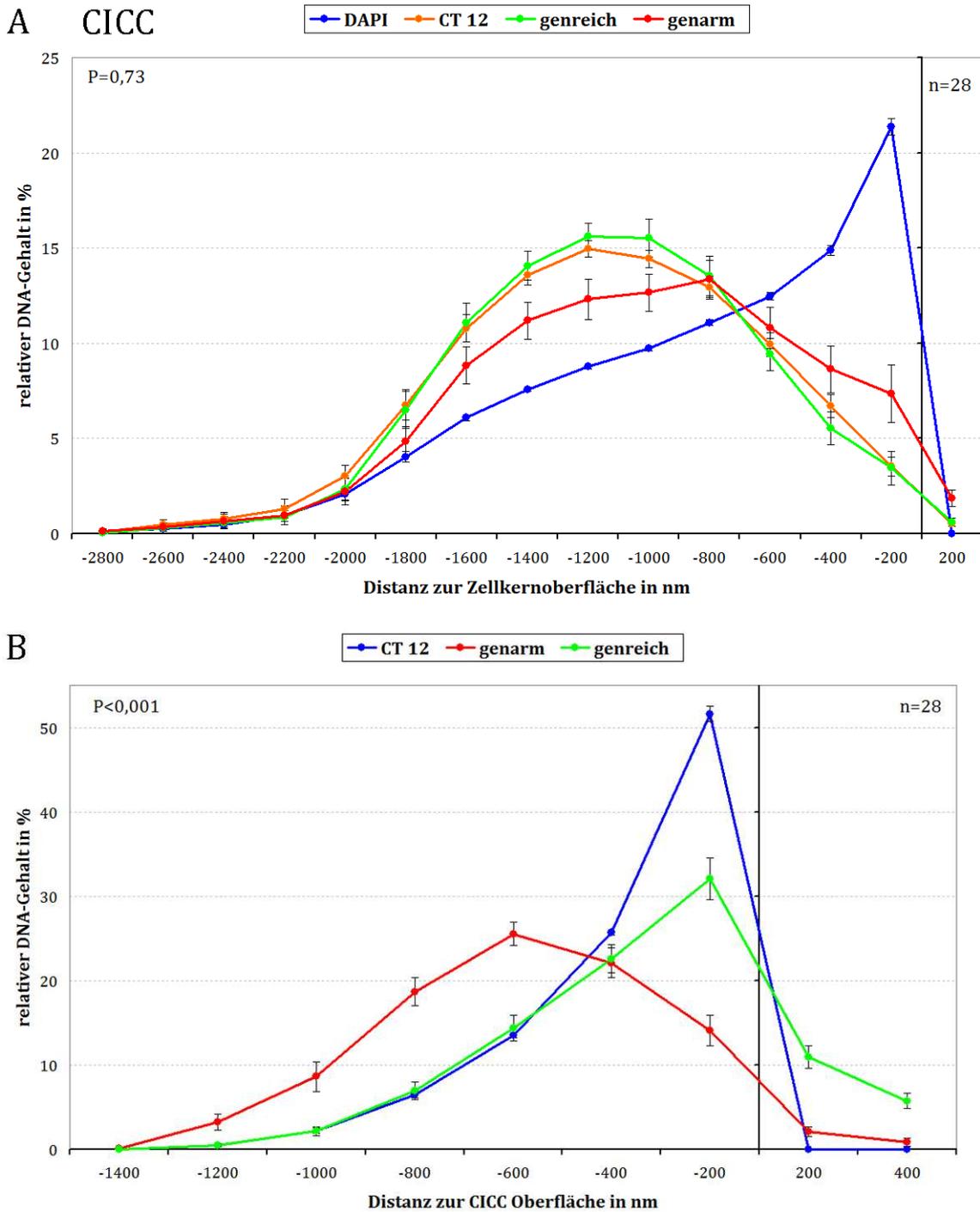
**Abb. 51: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Kontroll-Fibroblasten**

- A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-12 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).  
 B) CICC-Oberfläche (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).



**Abb. 52: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung**

A) Zellkernrand (schwarze Kurve), CT-12 (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).  
 B) genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve) in Bezug zur CICC-Oberfläche.



**Abb. 53: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung mit CICC-II-Chromatin**

A) Zellkernrand (blaue Kurve), CT-12 (orange Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).  
 B) CT-Oberfläche (blaue Kurve), genreicher BAC-Pool (grüne Kurve) und genarmer BAC-Pool (rote Kurve).

Statistische Auswertung:

von genreichen und genarmen Sequenzen des Chromosoms 12

in der Kontrolle, in Zellen, die mit Chaetocin behandelt wurden und ein unauffälliges DAPI-Staining haben und Zellen mit CICC-Bildung.

Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab folgende Ergebnisse:

#12	n	Kontrolle	n	Chaetocin ohne CICC	n	Chaetocin mit CICC
In Bezug zum Zellkernrand	32	P<0,001	28	P=0,001	28	P=0,73
In Bezug zum CT	26	P=0,29	28	P=0,8	28	P<0,001

Aus diesen 3D-FISH Experiment wird deutlich:

- Bei einem CICC handelt es sich um ein Chromosomen-Territorium.
- Die Paintsonden reichen über den DAPI-Rand eines CICC hinaus.
- Die genreichen und genarmen Subregionen von den Chromosomen X, 1 und 12 organisieren sich in Bezug zu ihrem CICC neu, indem sich genreiche DNS an die Oberfläche der CICCs verlagert und die genarmen Regionen sich in das CICC hineinstülpen. Dadurch entsteht eine statistisch signifikante Chromatin-Polarität in Bezug zur CICC-Oberfläche.
- Diese geht mit einer Aufhebung der konventionellen Zellkernarchitektur einher und führt zu neuen radialen Zellkernzonen.

## Humane Granulozyten - Untersuchungen zur Chromatin-Organisation

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der radialen Verteilung von Chromatin im Zellkern von unstimulierten, segmentierten, humanen Granulozyten.

Granulozyten sind Zellen des Immunsystems mit einer einzigartigen Zellkernform, deren morphologische Veränderungen im Zusammenhang mit ihren vielfältigen Aufgaben zu betrachten sind. Ursächlich für die Segmentierung des Zellkerns ist die Zusammensetzung der verschiedenen Proteine in der Zellkernhülle. Eine wichtige Rolle spielen hierbei der Lamin-B-Rezeptor, B1 und B2, LAP2 $\beta$  und Emerin (Olins et al., 2008), so wie die verschiedenen Isoformen von HP1 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ ) (Lukasova et al., 2005; Olins and Olins, 2005). Des Weiteren wird die Zellkernform durch den LINC-Komplex und die Zusammensetzung von Heterochromatin beeinflusst (Olins et al., 2009).

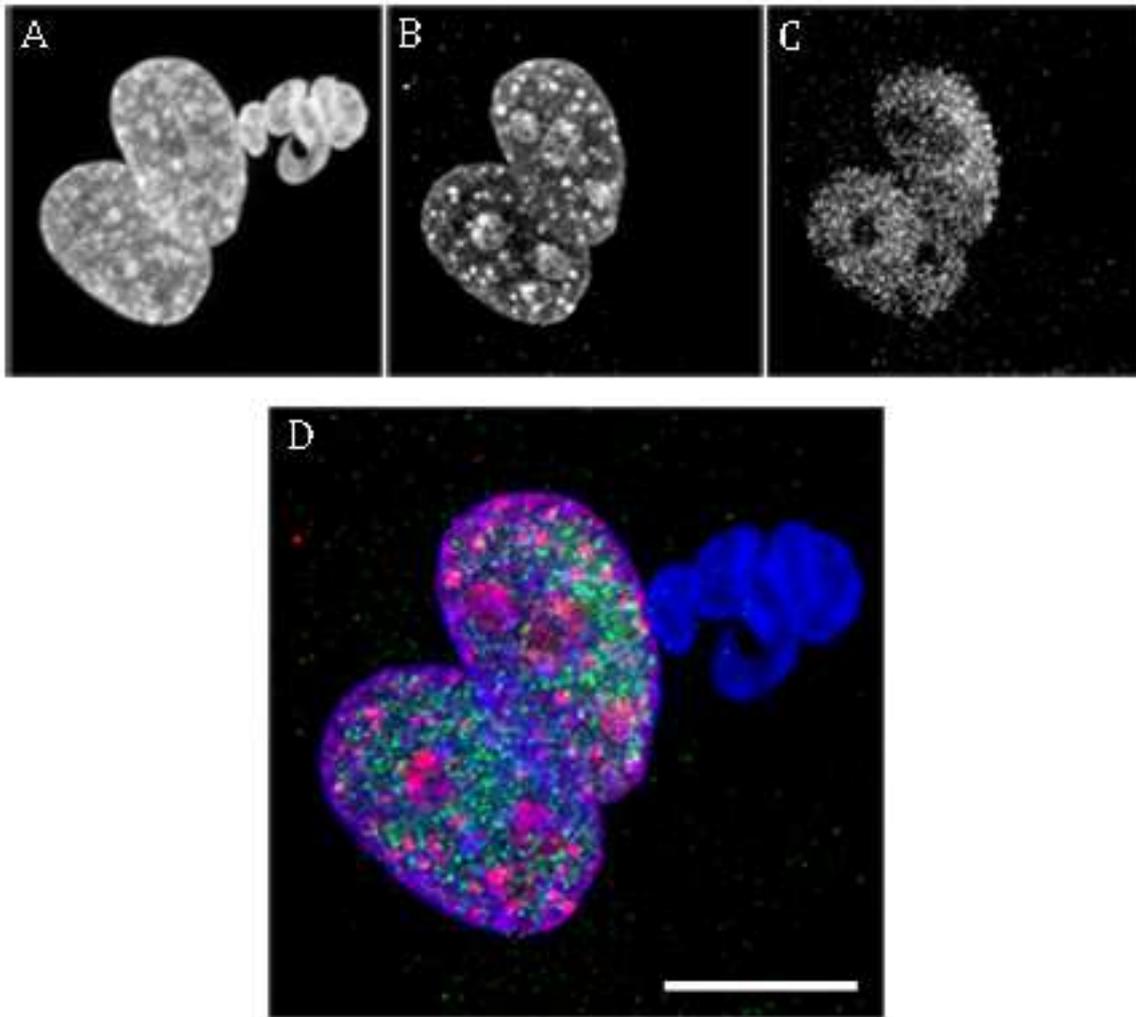
Um Versuche im dreidimensionalen Zellkern möglich zu machen, wurden Granulozyten aus dem Blut einer gesunden Spenderin entnommen, diese über einen Ficoll-Dichte-Gradienten isoliert (2.4.1.2) und die Zellen für eine IF (2.4.7) vorbereitet.

### 4.1 pKi67- und Färbung neu gebildeter RNS

Granulozyten-Zellkerne des peripheren Blutes sind terminal differenziert, haben eine zu erwartende Lebensdauer von nur noch wenigen Stunden und sind daher transkriptionell überwiegend inaktiv (Borregaard and Cowland, 1997). pKi67 ist ein Zellzyklusmarker, dieses Antigen kommt nur in proliferierenden, aber nicht in ruhenden Zellen vor (Gerdes et al., 2006).

Humane Granulozyten wurden wie in 2.4.1.2 beschrieben über einen Dichtegradienten isoliert und mit humanen RPE-1-Zellen 40 Minuten kokultiviert. Die RPE-1-Zellen dienen in diesem Experiment als Positivkontrolle. Während der letzten 25 Minuten wurde in das Medium BrU zu gegeben. Nach der BrU-Inkubation wurden die Zellen einmal kurz mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA in 1xPBS fixiert und eine IF mit folgendem Schema durchgeführt.

1. AK	2. AK
R $\alpha$ Ki67	G $\alpha$ R-TR
M $\alpha$ BrU	G $\alpha$ M-FITC
Gegenfärbung	DAPI

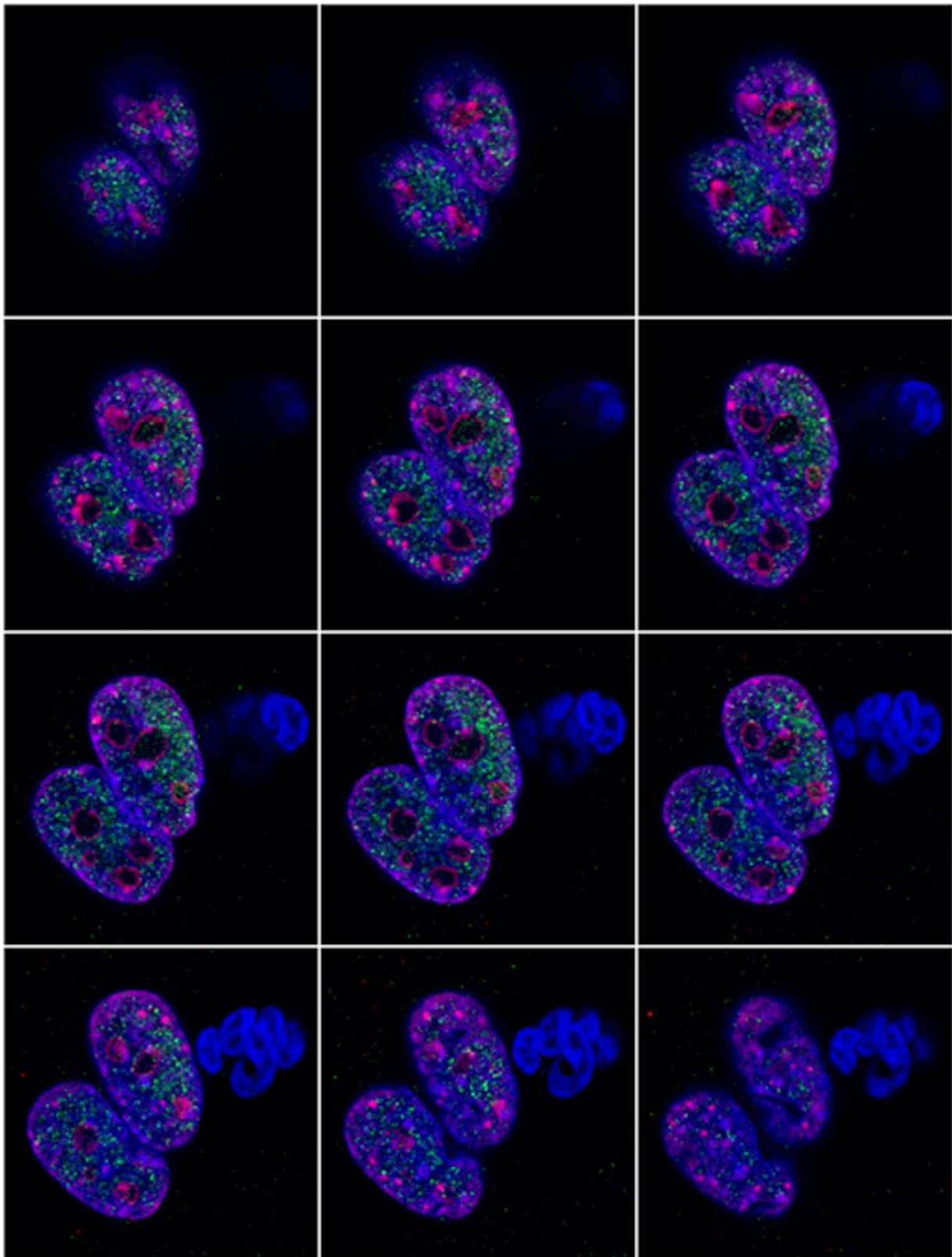


**Abb. 54: RGB-Projektion von zwei RPE-1-Zellen und einem Granulozyten nach pKi67- und RNS-Färbung**

Z-Projektionsbilder von 40 lichtoptischen Schnitten mit je 200nm (A-D); Dargestellt sind humane Granulozyten nach kofokaler Mikroskopie. In der oberen Reihe sind DAPI (A), pKi67 (B) und RNS (C) zu sehen. (D) Überlagerung von von DAPI (blau) pKi67 (rot) und RNS (grün) Der Balken repräsentiert eine Länge von 5 $\mu$ m.

Wie man in Abbildung 54 erkennen kann, unterscheiden sich die RPE-1-Zellen von den frisch isolierten humane Granulozyten hinsichtlich ihrer pKi67- und RNS-Signalintensität.

- RPE-1-Zellen sind pKi67-positiv und haben viel neu gebildete RNS angereichert. Die RPE-1-Zellen befinden sich in der sehr frühen G1-Phase, daher ist pKi67 nicht nur im Nukleolus, sondern auch mit der DNS assoziiert. Der RPE-1-Zellkern, welcher von dem Granulozyten attackiert wird, reichert an der Granulozyten zugewandten Seite verstärkt RNS an.
- Granulozyten sind pKi67-negativ und haben keine neu gebildete RNS, bzw. die RNS-Signale konnten mit einem konfokalen Mikroskop nicht aufgenommen werden.



**Abb. 55: Montage von zwei RPE-1-Zellen und einem Granulozyten nach pKi67- und RNS-Färbung**

Die Abbildung 55 zeigt zwei RPE-1 Zellen und einen Granulozyten nach konfokaler Mikroskopie. Für die Erstellung der Montage wurde jedes 4. Slide (=800nm) verwendet. Farbverteilungen: das Chromatin ist in blau, pKi67 in rot und die neu gebildete RNS in grün dargestellt.

Wie in der Abbildung 55 zu sehen ist, sind RPE-1-Zellen pKi67-positiv und haben viel neu gebildete RNS. An der Kontaktstelle zwischen RPE-1-Zelle und Granulozyt akkumuliert die RPE-1-Zelle viel neu gebildete RNS.

Hingegen sind in Zellkernen von Granulozyten kein pKi67 und keine RNS zu detektieren.

Des Weiteren haben Granulozyten im Zellkern große DAPI-freie Räume. Diese DAPI-freien Räume sollen in den nächsten Experimenten untersucht werden.

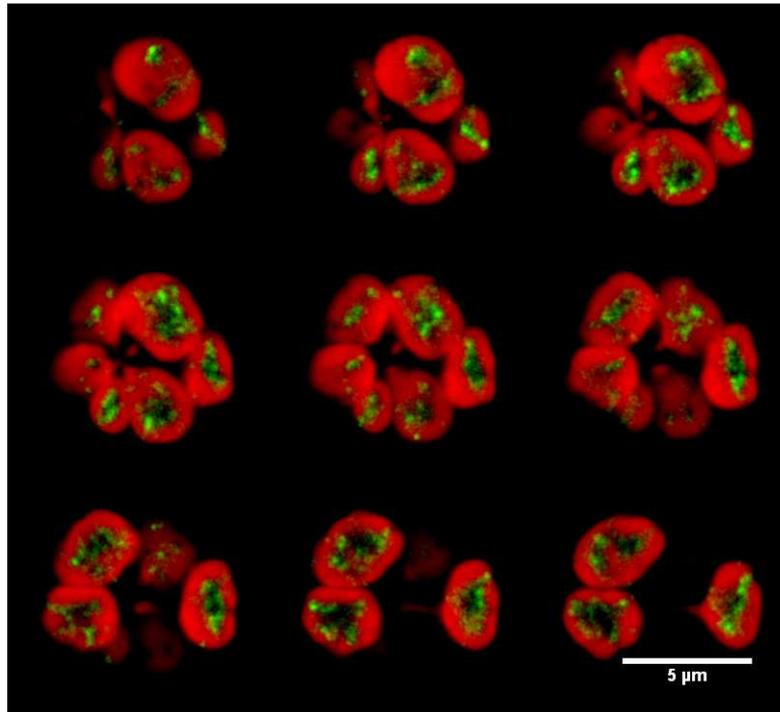
## 4.2 Untersuchung der DAPI-freien Räume

### 4.2.1 DAPI vs. H4K8ac

In diesem Versuch wurde die Lage von aktivem Chromatin und dessen radialer Verteilung in humanen Granulozyten untersucht. Dazu wurden humane Granulozyten aus dem Blut einer gesunden Spenderin isoliert, 40 Minuten auf Polylysin beschichteten Deckgläsern kultiviert, einmal kurz mit 1xPBS gewaschen, mit 4% PFA in 1xPBS fixiert und eine IF für aktives Chromatin durchgeführt.

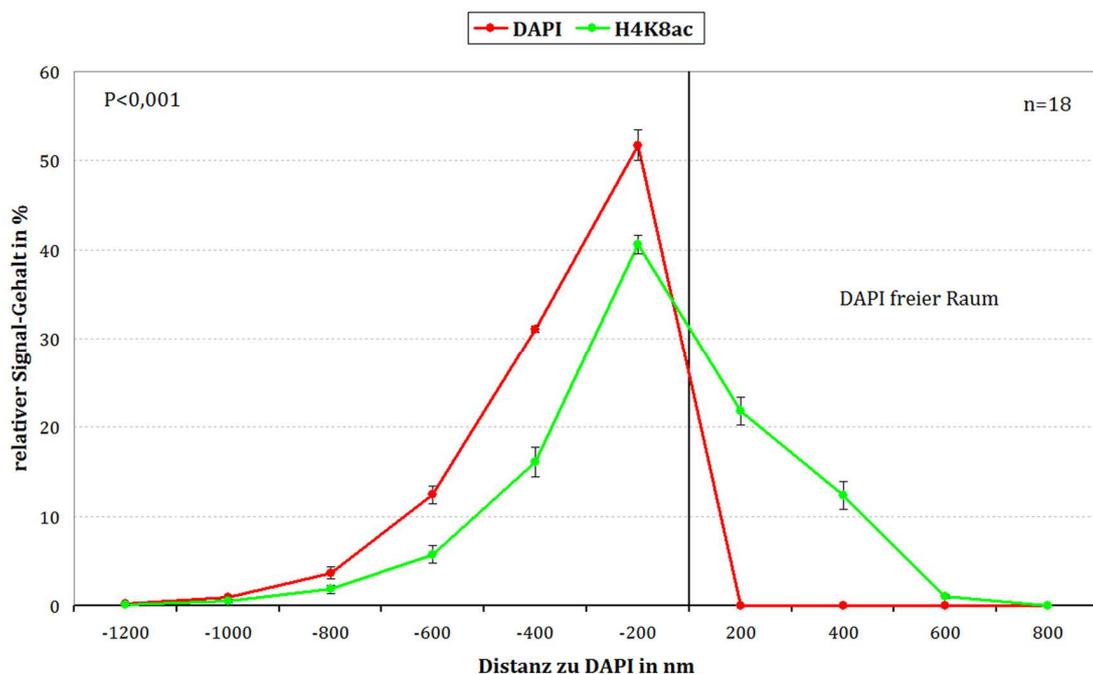
Detektionsschema:

1. AK	2. AK
R $\alpha$ H4K8ac	G $\alpha$ R- FITC
Gegenfärbung	DAPI



**Abb. 56: Montage eines humanen, unstimulierten und segmentierten Granulozyten mit einer Antikörperfärbung für H4K8ac**

Die Abbildung 56 zeigt jedes 3. Bild (= 600nm) eines humanen Granulozyten nach konfokaler Mikroskopie. Die DAPI-Färbung ist in rot und das aktive Chromatin H4K8ac ist in grün dargestellt. Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, befindet sich das aktive Chromatin überwiegend im DAPI-freien, scheinbar DNS-freien Raum. Obwohl humane Granulozyten nur wenig RNS produzieren, reichern sie H4K8ac an der Innenseite der peripheren Zone von kondensiertem Chromatin (rot) an, dies bedeutet Granulozyten sind transkriptionell kompetent.



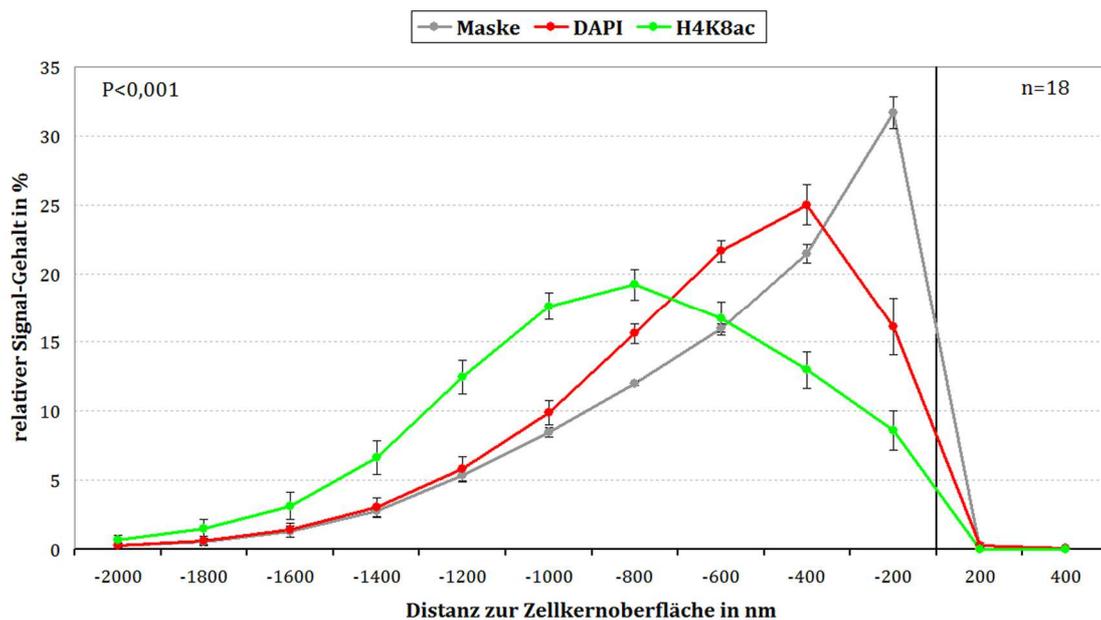
**Abb. 57: eADS-Kurve der radialen Verteilung von H4K8ac in Bezug zu DAPI in humanen, unstimulierten, lobulierten Granulozyten**

eADS-Ergebnis über die radiale Verteilung von DAPI-Signalen (rot) und aktivem Chromatin (grün) in humanen Granulozyten. Abszisse: zeigt den Abstand zur DAPI-Färbung, negative Werte zeigen eine Kollokalisierung von DAPI und H4K8ac, positive Werte zeigen H4K8ac im DAPI-freien Raum.

Obwohl sich die Signale von DAPI und H4K8ac großflächig überlappen, zeigt die eADS-Auswertung einen radialen Verteilungsunterschied von DAPI und H4K8ac.

Die unterschiedliche Positionierung im Zellkern wurde über eine Varianzanalyse bestätigt. Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab einen P-Wert von  $P < 0,001$ .

Dies bedeutet, dass sich das aktive Chromatin hinsichtlich seiner Position zur DAPI-Färbung signifikant unterscheidet.



**Abb. 58: eADS-Kurve der radialen Verteilung von H4K8ac und DAPI in humanen, unstimulierten, lobulierten Granulozyten in Bezug zur Zellkernoberfläche**

Verteilung von aktivem Chromatin und DAPI-Signalen in humanen Granulozyten in Bezug zum Zellkernrand. Das aktive Chromatin (H4K8ac) ist in grün, die DAPI-Signale sind in rot und der Zellkernrand ist in grau dargestellt. Die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche und die Ordinate den relativen Signal-Gehalt in %. Wie man erkennen kann, befindet sich das aktive Chromatin H4K8ac (grüne Kurve) deutlich im Zentrum von segmentierten Zellkernen und die DAPI-Gegenfärbung befindet sich an der Zellkernoberfläche.

#### Statistische Auswertung:

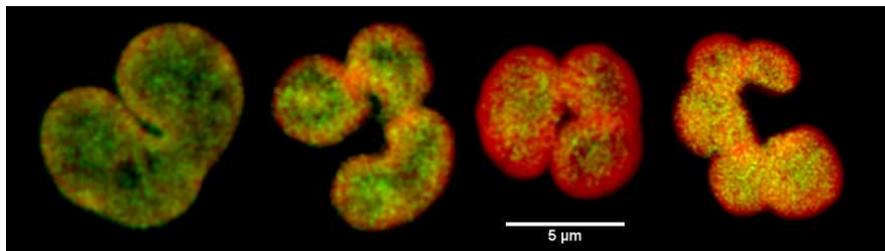
Um zu testen, ob sich das aktive Chromatin und DAPI hinsichtlich ihrer radialen Position im segmentierten Granulozyten-Zellkern unterscheiden, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab einen P-Wert von  $P < 0,001$ . Dies bedeutet, dass sich das aktive Chromatin und DAPI in Bezug zum Zellkernrand statistisch signifikant unterschiedlich verteilen. Im Inneren des Granulozyten-Zellkerns befindet sich H4K8ac, wohingegen die DAPI-Signale eine randständige Position einnehmen.

#### 4.2.2 DAPI- vs. 7AAD-Färbung

Die Chromatin-Polarität kann mit DNS-Farbstoffen untersucht werden.

Um Chromatin zu färben, gibt es verschiedene DNS-Farbstoffe, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften voneinander unterscheiden. DAPI hat eine hohe Affinität zu AT-Basenpaarung, dies sind vor allem genarme Bereiche. 7-AAD hat eine hohe Affinität zu GC-Basenpaarungen und färbt daher vor allem genreiche Regionen an.

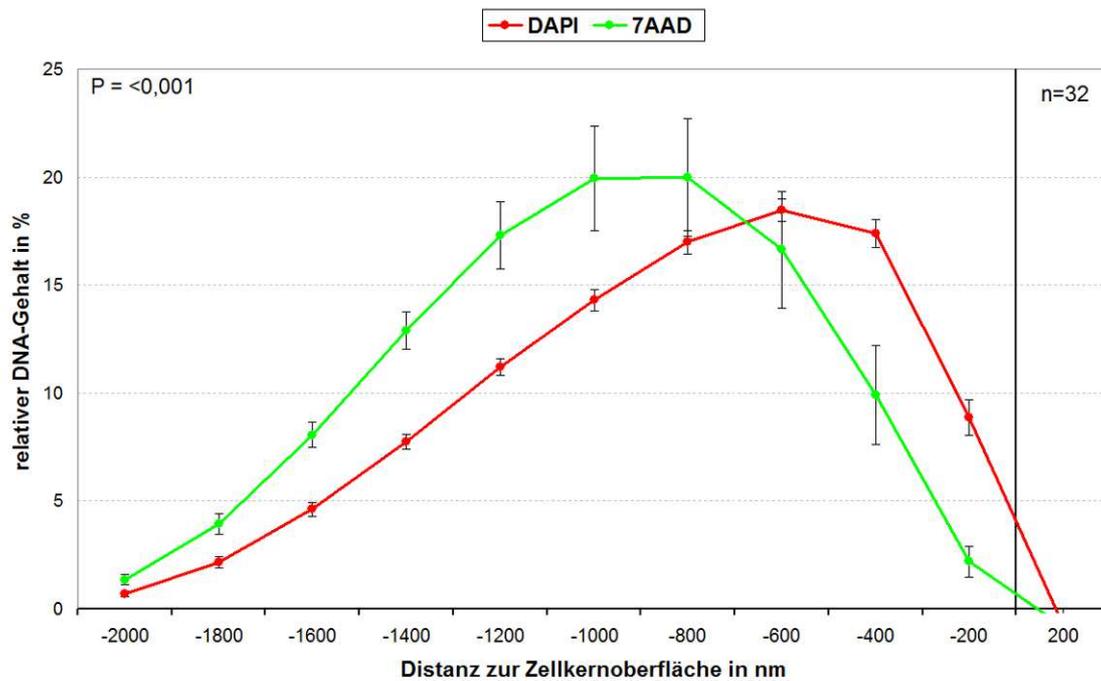
Humane Granulozyten wurden aus dem Blut einer gesunden Spenderin isoliert, 40 Minuten auf Polylysin beschichtete Slides kultiviert, 30 sec. mit 0,5xPBS behandelt, mit 4% PFA in 0,05xPBS fixiert und mit 7-AAD und DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Signale mit dem LSM aufgenommen und die 3D-Bildstapel mit ImageJ für eine eADS Auswertung vorbereitet.



**Abb. 59: 2 mittlere Z-Projektionen ( $\Sigma=400\text{nm}$ ) von vier humanen Granulozyten nach 7-AAD- (grün) und DAPI-Färbung (rot)**

Die Abbildung 59 zeigt die Verteilung von DAPI- und 7-AAD-Signalen. Diese sind über den gesamten Zellkern verteilt. Dennoch sind die Signale unterschiedlich in ihrer Intensität ausgeprägt, ebenso kann bereits in den Zellkern-Projektionen eine unterschiedliche Verteilung der Signale wahrgenommen werden. 7-AAD ist kaum am Zellkernrand zu finden, da es sich zur Zellkernmitte hin orientiert, dort nehmen die Signale in ihrer Intensität zu. Am Zellkernrand befinden sich vor allem DAPI-Signale. Die Intensität der DAPI-Signale ist am Zellkernrand sehr stark und nimmt zur Zellkernmitte hin ab.

Untersuchungen, die nach Abschluss dieser Dissertation von Frau Barbara Hübner durchgeführt wurden (Doktorarbeit Hübner, Manuskript in Vorbereitung) haben gezeigt, dass die hier beobachtete Chromatinverteilung durch die 30 sec. Behandlung mit 0.5xPBS vor der Zellfixierung induziert wurde. Erst dadurch kommt es zu der massiven Verlagerung von Chromatin in den Innenbereich der Lobuli. Bei Granulozyten, die in normotonem Medium inkubiert werden, ist das Chromatin dagegen bevorzugt in der Peripherie der Lobuli angeordnet, während ein ausgedehnter Bereich im Inneren nahezu DNS frei bleibt. Diese Anordnung des Chromatins ist jedoch nicht zufällig. Im Inneren der Lobuli findet man nach Inkubation in hypotonem Medium eine starke Anreicherung von GC-reicher DNS, während AT-reiche DNA in der Peripherie der Lobuli verbleibt.



**Abb. 60: radiale Verteilung von 7-AAD und DAPI in Bezug zur Zellkernoberfläche**

eADS-Ergebnis der radialen Verteilung von 7-AAD- und DAPI-Signalen im Zellkern von segmentierten Granulozyten. Die rote Kurve zeigt die DAPI-Verteilung und die grüne Kurve 7-AAD-Signale im Zentrum des Zellkerns. 7-AAD-Signale (grüne Kurve) befinden sich in der Mitte von segmentierten Zellkernen, wohingegen die DAPI-Signale (rote Kurve) überwiegend an der Peripherie des Zellkerns lokalisiert sind. Die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche und die Ordinate den relativen Signal-Gehalt in %.

#### Statistische Auswertung:

Eine Varianzanalyse bestätigt die Unterschiede zwischen den 7-AAD- und DAPI-Signalen bezüglich ihrer Lokalisation im Zellkern. Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab einen P-Wert von  $P < 0,001$ . Dies bedeutet, dass das AT-reiche und GC-reiche Chromatin im Granulozyten-Zellkern statistisch signifikant unterschiedlich verteilt sind.

### 4.3 3D-FISH-Experimente

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, ist das Chromatin in unstimulierten Granulozyten-Zellkernen nicht gleichmäßig verteilt. Auch der folgende Teilabschnitt beschäftigt sich mit der Frage der gendichte-abhängigen Chromatin-Anordnung in humanen weiblichen Granulozyten. Mit 3D-FISH-Experimenten wurden subchromosomale Abschnitte der Chromosomen #1 und #12 untersucht. Um Versuche im dreidimensionalen Zellkern zu ermöglichen, müssen die DNS-Sonden zuerst auf 2D-Metaphasen getestet werden.

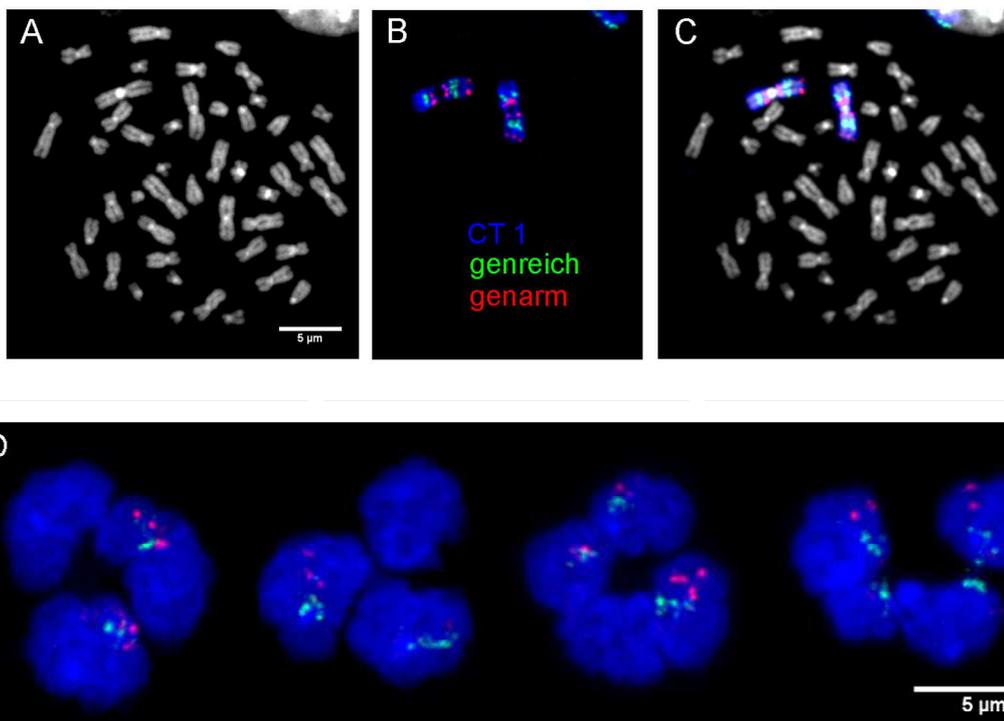
#### 4.3.1 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 1

Die Zusammensetzung der DNS-Sonden (BAC-Pools) ist in 3.1 beschrieben.

Die BAC-Klone wurden hinsichtlich ihres Gengehaltes in Pools sortiert. Nach einer erfolgreichen 2D-FISH auf humane Metaphasen, wurden die Sonden in einer 3D-FISH auf humane Granulozyten-Zellkerne hybridisiert und mittels Antikörpern detektiert. Anschließend wurden 24 Zellkerne an einem konfokalen Leica SP5 aufgenommen und mit ImageJ für das eADS Programm vorbereitet. Als Referenzen wurden der Zellkernrand und das Chromosomen-Territorium verwendet.

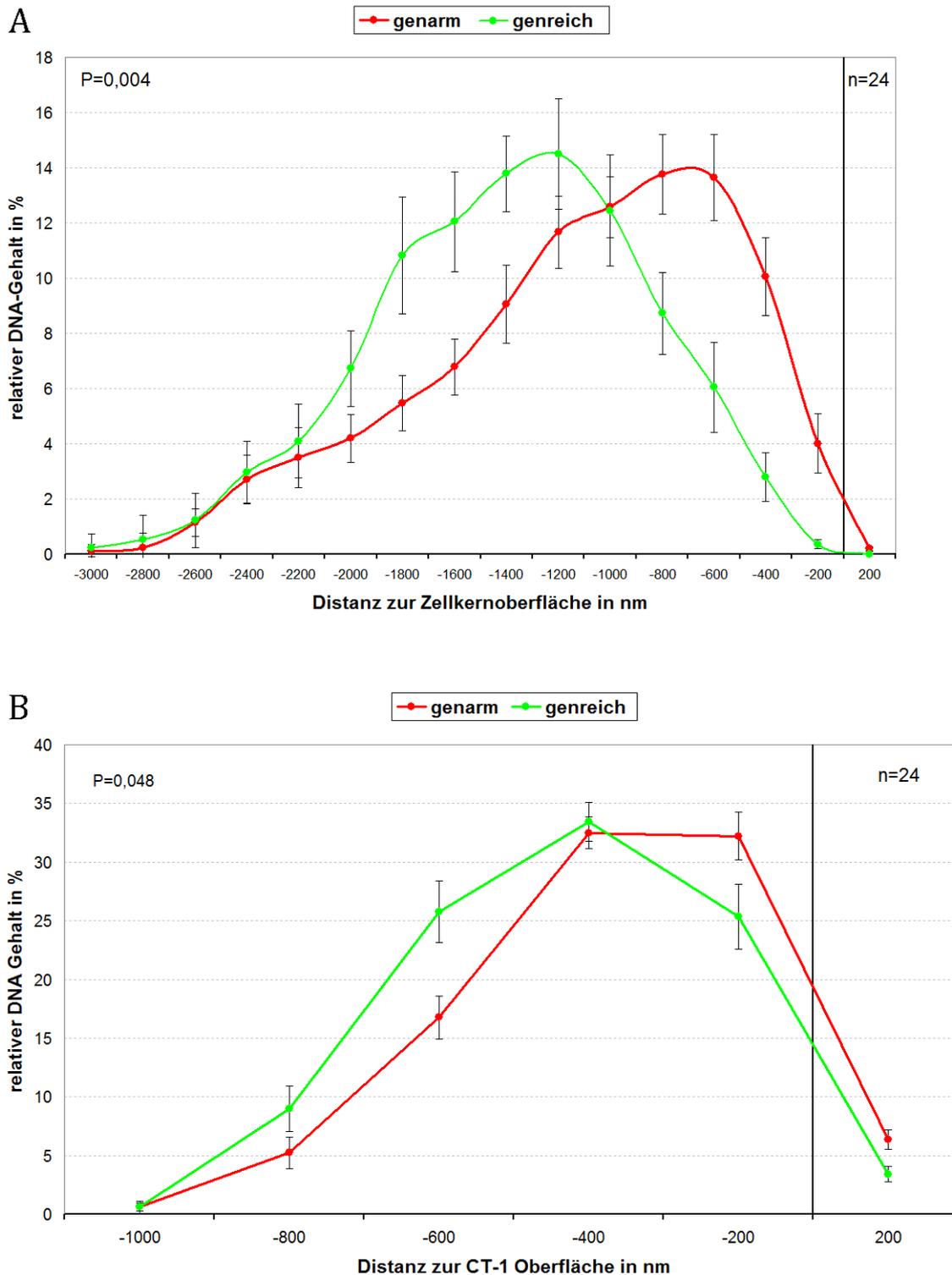
Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Genreich	Bio	Avidin –Alexa-488
Genarm	Dig	M $\alpha$ Dig-Cy5
Paint	DNP	R $\alpha$ DNP G $\alpha$ R- Cy3
Gegenfärbung	-	DAPI



**Abb. 61: 2D-FISH und 3D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1**

Die Abbildung 61 zeigt eine humane Metaphase-Spreitung (A-C); das Chromatin ist in grau dargestellt, das Chromosom 1 ist in blau, BAC-Pools für genreiche Sonden sind in grün und für genarmen Sonden sind in rot dargestellt. RGB-Z-Projektionsbilder (D) verschiedener Granulozyten-Zellkernen mit genarmen (rot) und genreichen (grün) BAC-Pools.

**Abb. 62:****A) Kurve der radialen Verteilung genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1 in Bezug auf den Zellkernrand in humanen Granulozyten**

genreicher BAC-Pool: grüne Kurve, genarmer BAC-Pool: rote Kurve.

Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in %, die Abszisse den Abstand zur Zellkernoberfläche.

**B) Kurve der radialen Verteilung genreicher und genarmer BAC-Pools in Bezug zur CT-1 Oberfläche in humanen Granulozyten**

Die grüne Kurve zeigt genreiches und die rote Kurve genarmes Chromatin.

Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in %, die Abszisse den Abstand zur Oberfläche des Chromosomen-Territoriums.

Aus der Kurvenverteilung (A) ist zu entnehmen, dass sich das genreiche Chromatin im Zentrum und das genarme in der Peripherie des Zellkerns befinden.

Hingegen befindet sich das genreiche Chromatin tendenziell mehr auf der Oberfläche von CT1 und das genarme Chromatin bevorzugt eine Position innerhalb des CTs (B).

Statistische Auswertung:

eine Varianzanalyse über die gendichte-abhängige Chromatin-Verteilung

- im Bezug zum Zellkernrand ergab eine P-Wert von  $P=0,004$ .
- im Bezug zur Oberfläche des Chromosomen-Territoriums ergab einen P-Wert von  $P=0,48$ .

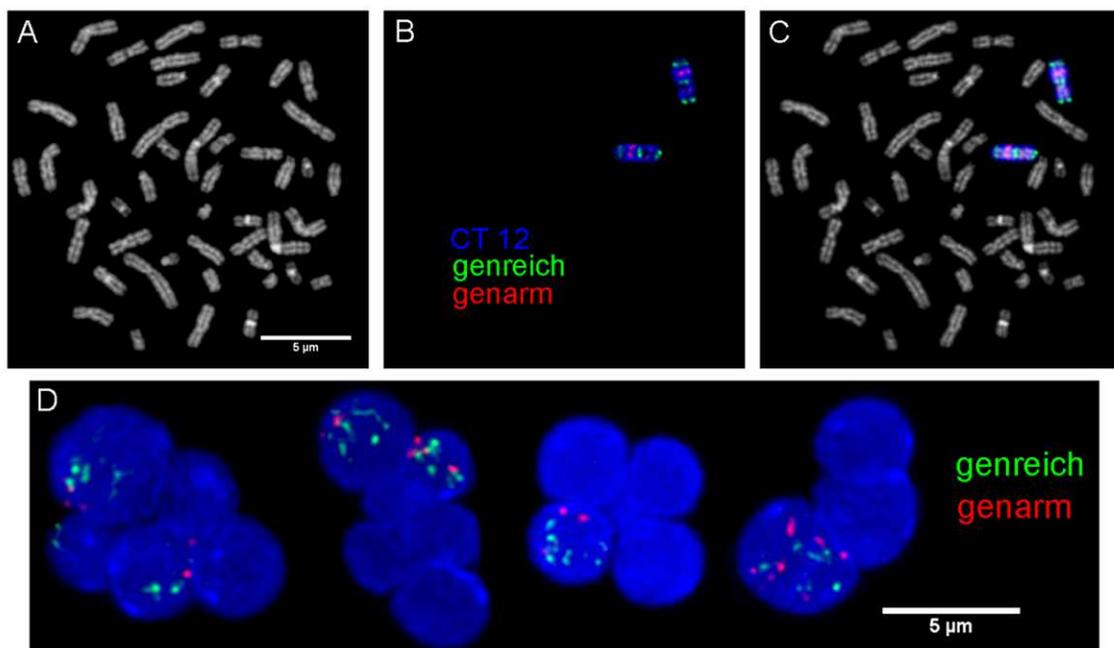
#### 4.3.2 Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen des Chromosoms 12

Ebenso wie zuvor für das Chromosom 1 beschrieben, wurden auch 2D-Experimente und 3D-Experimente mit BAC-Pools von den subchromosomalen Bereichen von Chromosom 12 durchgeführt. Die Zusammensetzung der DNS-Sonden (BAC-Pools) ist in 3.1 beschrieben und kann auch in Küpper et al. (2007) nachgelesen werden.

Um die Qualität der DNS-Sonden zu testen wurde eine 2D-FISH durchgeführt.

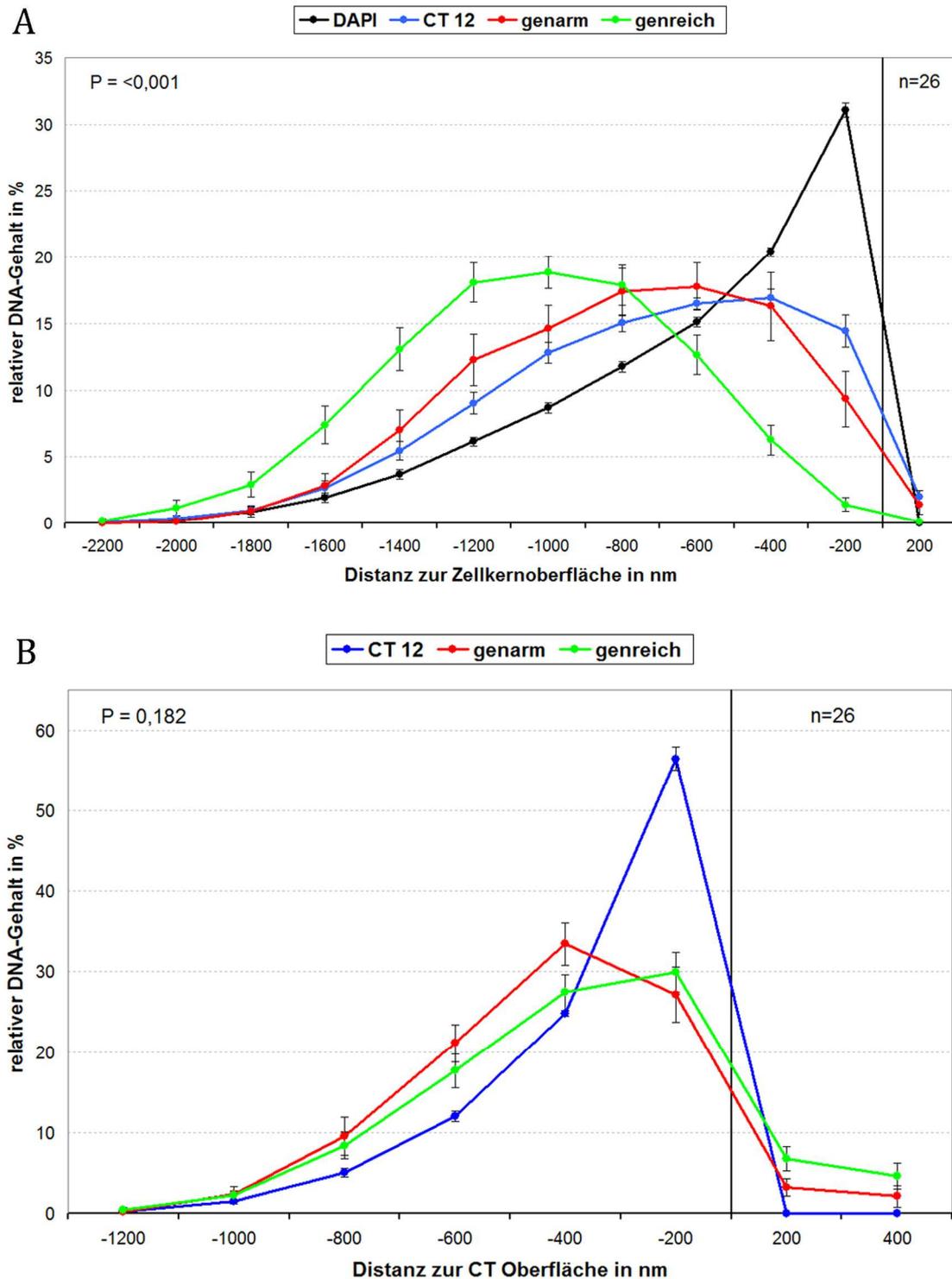
Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Genreich	Bio	Avidin –Alexa-488
Genarm	Dig	M $\alpha$ Dig-Cy5
Paint	DNP	R $\alpha$ DNP G $\alpha$ R- Cy3
Gegenfärbung	-	DAPI



**Abb. 63: 2D-FISH und 3D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 12**

Die Abbildung 63 zeigt eine humane Metaphase-Spreitung (A-C) in der das Chromatin in grau, die Signale der Paintsonden in blau, genreiche DNS in grün und die genarme DNS in rot dargestellt sind. RGB-Z-Projektionsbilder (D) humaner Granulozyten nach konfokaler Mikroskopie mit genarmer (rot) und genreicher (grün) BAC-Pools.

**Abb. 63:****A) Kurve der radialen Verteilung genericher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 12 in Bezug auf den Zellkernrand in humanen Granulozyten**

Der genreiche BAC-Pool ist in grün und der genarme in rot dargestellt, das Chromosomen-Territorium in blau und der Zellkern in schwarz.

Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in %, die Abszisse den Abstand zur Oberfläche des Chromosomen-Territoriums.

**B) Kurve der radialen Verteilung genericher und genarmer BAC-Pools in Bezug zur CT-12-Oberfläche in humanen Granulozyten**

Die grüne Kurve zeigt genreiches Chromatin, die rote Kurve genarmes und die blaue Kurve das Chromosomen-Territorium. Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in % und die Abszisse den Abstand zur Oberfläche des Chromosomen-Territoriums.

### Statistische Auswertung:

zu A) Die Verteilung genreicher und genarmer BAC-Pools wurde mit dem Mann-Whitney Rank Sum-Test quantifiziert. Er ergab einen P-Wert von  $P=0,001$ . Dies bedeutet, dass sich das genreiche und genarme Chromatin in Bezug auf den Zellkernrand in humanen Granulozyten statistisch signifikant unterschiedlich verteilt. Genreiches Chromatin befindet sich im Zentrum des Zellkerns und genarmes in der Peripherie.

zu B) Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab einen P-Wert von  $P<0,128$ .

Daraus ergibt sich eine nicht signifikant unterschiedliche Verteilung von genreichem und genarmem Chromatin in Bezug zur CTn-Oberfläche.

## 4.4 Radiale Organisation des Drumsticks

### 4.4.1 Drumstick-Frequenz und die Verteilung der X-Chromosomen

Ein Drumstick ist das Zellkernanhangsgebilde in segmentkernigen Granulozyten.

In ihm befindet sich das inaktive X-Chromosom hämatopoetischer Zellen.

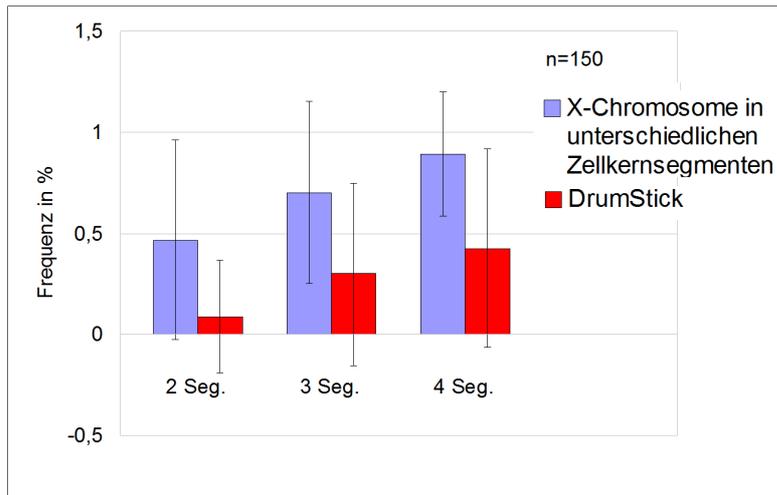
In der Zytologie wird es als Nachweis für das weibliche Geschlecht verwendet, deren Ratio sollte 7 / 500 betragen (Heckner, 2001).

Die verwendeten Granulozyten wurden von einer weiblichen, gesunden Spenderin entnommen und wie in 2.4.1.2 beschrieben über einen Ficoll-Dichtegradienten isoliert, zweimal mit 1xPBS gewaschen und mit zwei verschiedenen Methoden fixiert. Die Granulozyten wurden entweder mit 4% PFA in 1xPBS oder mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und aufgetropft. Anschließend wurde die Drumstick-Bildung beurteilt.

- Nach einer PFA-Fixierung konnten keine Drumsticks festgestellt werden.
- Wurden die Granulozyten mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und nach Deng aufgetropft, kam es zu einer Drumstick-Bildung.

Am Epifluoreszenzmikroskop wurde die Drumstick-Häufigkeit in Bezug zur Anzahl der Kernsegmente gezählt. Nachdem nicht jede Ausstülpung aus dem Zellkern ein inaktives X-Chromosom ist, wurden zur Quantifizierung der Drumstick-Häufigkeit Präparate aus den nachfolgenden 3D-FISH-Präparaten genommen.

Es wurde von 2-, 3- und 4-segmentierten Zellkernen je 50 zufällige Zellkerne ausgezählt und die Häufigkeit der Drumstick-Bildung und die Verteilung der X-Chromosomen ausgezählt.



**Abb. 64: Excel-Graph über die Frequenz der Drumstick-Bildung und die Verteilung des X-Chromosoms im Zellkern von Granulozyten**

Ordinate zeigt die Frequenz der Verteilung der X-Chromosomen und der Drumstick-Bildung in humanen weiblichen Granulozyten.

Die Abszisse zeigt die Anzahl der Segmente des Zellkerns

In Abbildung 64 ist die Zellkernsegmentierung im Zusammenhang mit der Drumstick-Bildung und der Verteilung der X-Chromosomen in Granulozyten dargestellt.

Haben die Zellkerne:

- zwei Segmente, dann sind die X-Chromosomen zu 46,80% in unterschiedlichen Kernsegmenten lokalisiert und zu 8,51% kann eine Drumstick-Bildung beobachtet werden.
- drei Segmente, dann sind die X-Chromosomen zu 70,21% in verschiedenen Lobili und zu 29,78% kam es zu einer Drumstick-Bildung.
- vier Segmente, dann befinden sich die X-Chromosomen zu 89,36% in verschiedenen Segmenten und zu 42,55% kann eine Drumstick-Bildung beobachtet werden.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kernsegmente, der Lokalisation der X-Chromosomen und der Drumstick-Frequenz gibt.

Je höher die Segmentierung des Zellkerns ist, desto häufiger befinden sich die X-Chromosome in unterschiedlichen Segmenten und desto höher ist die Drumstick-Frequenz.

#### 4.4.2 3D-FISH Experimente

Die Zellen wurden wie in 2.4.1.2 beschrieben isoliert und wie in 2.6.2 beschrieben für eine 3D-Drumstick-FISH fixiert.

Es wurde ein Experiment durchgeführt, welches unabhängig von der Gendichte und dem Expressionsprofil ist und zwei Experimente, deren BAC-Pools hinsichtlich ihrer Gendichte sortiert wurden. Die Zusammensetzung der DNS-Sonden (BAC-Pools) ist in 3.1 beschrieben.

Folgende Experimente wurden an Drumsticks durchgeführt:

1. 3D-Topologie der BAC-Pools P1, P2, P3, P4
2. gendichte-abhängige Anordnung von  
RIDGEs und genarmen Bereichen des X-Chromosoms  
genreichen (Xp11) und genarmen (Xq25) Subregionen

#### 4.4.3 3D-Topologie der BAC-Pools P1, P2, P3, P4

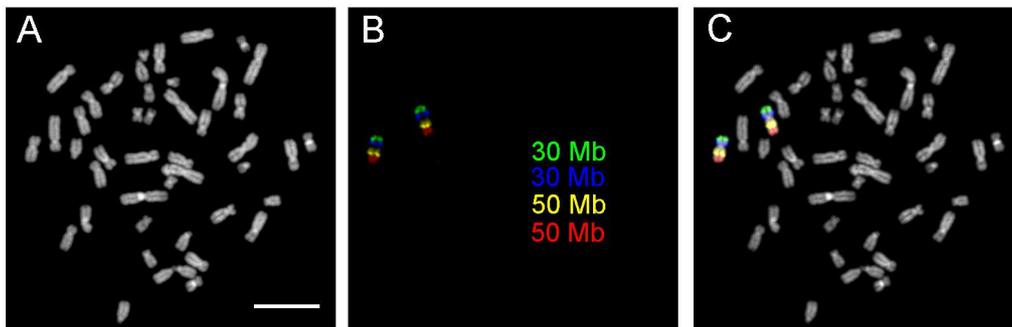
In diesem Experiment sollte die Lokalisation der halben Arme von Xp und Xq im Zellkern von Granulozyten untersucht werden. Dazu wurden der p-Arm und der q-Arm in jeweils in gleich große Teile untergliedert. Der Pool 1 beginnt an der Telome-Region von Xp und der Pool 4 endet an der Telomer-Region von Xq. In den BAC-Pools für den p-Arm wurden in P1 und P2 je 30MB zusammengefasst und in BAC-Pools für den q-Arm wurden in P3 und P4 je 50MB zusammengefasst. Die Zusammensetzung der BAC-Pools ist in 3.1 beschrieben.

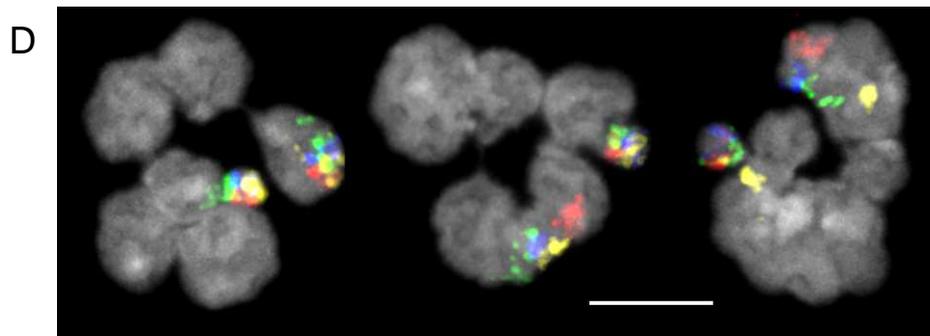
Hier sollte untersucht werden, ob es innerhalb der Arme Unterschiede in der Kompaktierung und der radialen Verteilung von X aktiv und X inaktiv (Drumstick) gibt.

Die Qualität der Sonden wurde zunächst auf einem 2D-Metaphasepräparat getestet. Anschließend wurde eine 3D-FISH durchgeführt, 38 Kerne mit dem CLSM aufgenommen, mit ImageJ das aktive vom inaktiven X-Chromosom getrennt und der Bildstapel für das eADS-Programm vorbereitet.

Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Pool 1 (Xp)	Bio	Avidin – Alexa-488
Pool 2 (Xp)	Dig	M α Dig-Cy5
Pool 3 (Xq)	Cy3	–
Pool 4 (Xq)	TR	–
Gegenfärbung	–	DAPI





**Abb. 65: 2D-FISH und 3D-FISH mit den BAC-Pools P1, P2, P3, P4 vom X-Chromosom**

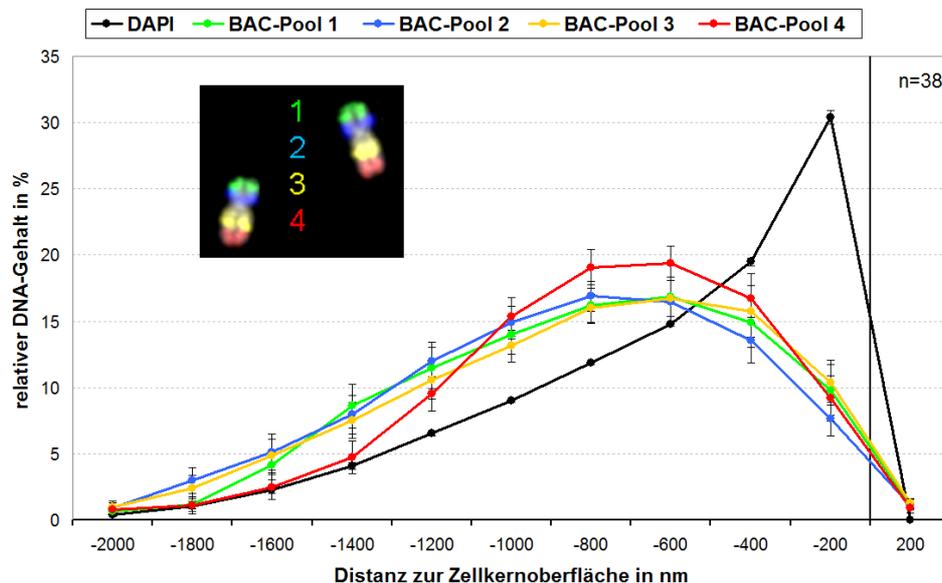
- A) humane Metaphase das Chromatin ist in grau dargestellt.  
 B) BAC-Pools P1 in grün, P2 in blau, P3 in gelb und P4 in rot.  
 C) Überlagerung von A und B.  
 D) RGB-Z-Projektionsbilder von drei Granulozytenzellkernen mit den BAC-Pools P1, P2, P3 und P4.  
 Der Scalebar entspricht einer Länge von 5µm.

Wie in Abbildung 65 zu erkennen ist, sind

A) die Hybridisierungssignale spezifisch und von sehr guter Qualität.

B) Alle drei Granulozytenzellkerne haben ihr inaktives X-Chromosom als Drumstick ausgebildet.

Im dritten Zellkern sind Teile des X-Chromosoms (Pool 3) noch im Zellkern des Granulozyten und es befindet sich unmarkierte DNS im Drumstick. Bei der Betrachtung der Zellkerne ist zu erkennen, dass das inaktive X-Chromosom stark kondensiert ist und das aktive X-Chromosom eine größere Fläche im Zellkern einnimmt.



**Abb. 66: Radiale Verteilung der BAC-Pools 1, 2, 3, 4 des aktiven X-Chromosoms in humanen Granulozyten**

Graph über die Verteilung von FISH-Signalen im Zellkern von humanen Granulozyten-Zellkernen. BAC-Pool 1: grüne Kurve, BAC-Pool 2: blaue Kurve, BAC-Pool 3: gelbe Kurve, BAC-Pool 4: grüne Kurve, Zellkern: schwarze Kurve. Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in % und die Abszisse den Abstand zur Zellkernoberfläche.

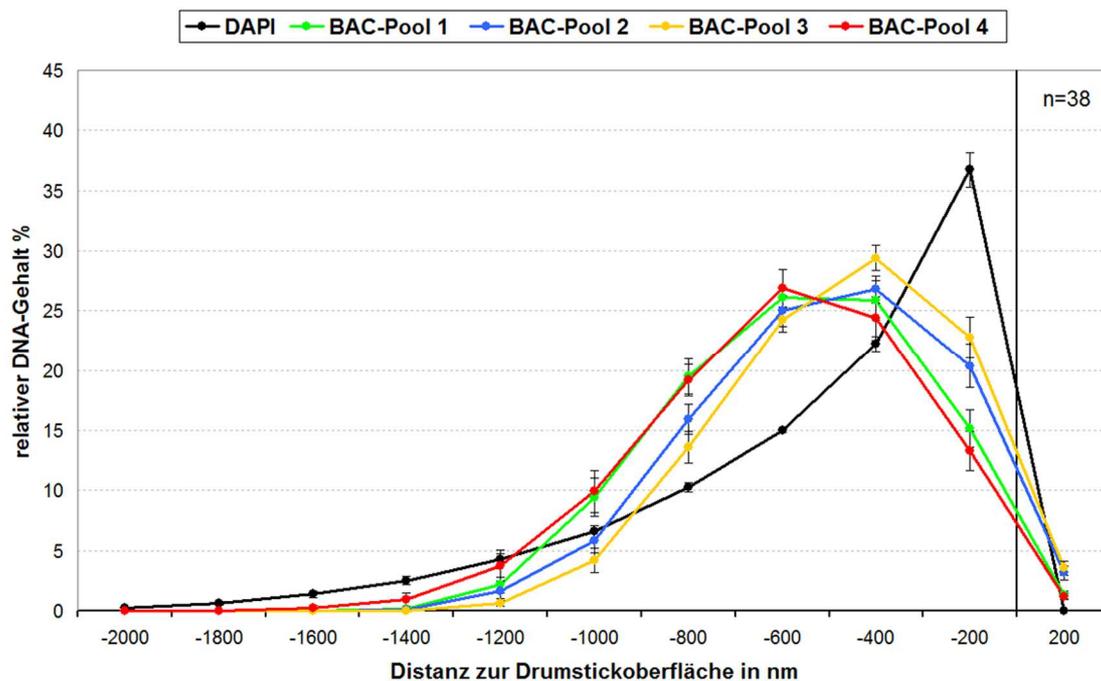
Betrachtet man die Verteilung der Kurven in Abbildung 66, so ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven zu erkennen. Die BAC-Pools eins, zwei und drei sind nahezu gleich verteilt der BAC-Pool vier nimmt in Vergleich dazu eine leicht periphere Position ein.

#### Statistische Auswertung:

Eine Varianzanalyse über die Verteilung der BAC-Pools 1, 2, 3 und 4 anhand des Mann-Whitney Rank Sum-Tests ergab folgende Werte:

Pools aktiv	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
P-Wert	0,53	0,888	0,52	0,418	0,211	0,76

Es gibt zwischen den geographischen BAC-Pools 1, 2, 3 und 4 des aktiven X-Chromosoms in Bezug zur Zellkernoberfläche keine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung.



**Abb. 67: Radiale Verteilung der BAC-Pools 1,2,3 und 4 des inaktiven X-Chromosoms im Drumstick von humanen Granulozyten**

Graph über die Verteilung von FISH-Signalen im Zellkern von humanen Granulozyten-Zellkernen im Drumstick. BAC-Pool 1: grüne Kurve, BAC-Pool 2: blaue Kurve, BAC-Pool 3: gelbe Kurve, BAC-Pool 4: rote Kurve, Drumstick Oberfläche: schwarze Kurve. Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in % und die Abszisse zeigt den Abstand zur Zellkernoberfläche.

Betrachtet man die Kurven in Abbildung 67, so sind die BAC-Pools 1 und 4 mehr zur Zellkernmitte orientiert und der BAC-Pool 3 orientiert sich zum Zellkernrand.

Innerhalb von BAC-Pool 3 befindet sich das *Xist* Gen.

Statistische Auswertung:

Der statistische Vergleich der absoluten Abstände zur Oberfläche des Drumsticks anhand des Mann-Whitney Rank Sum Test ergab folgende Werte:

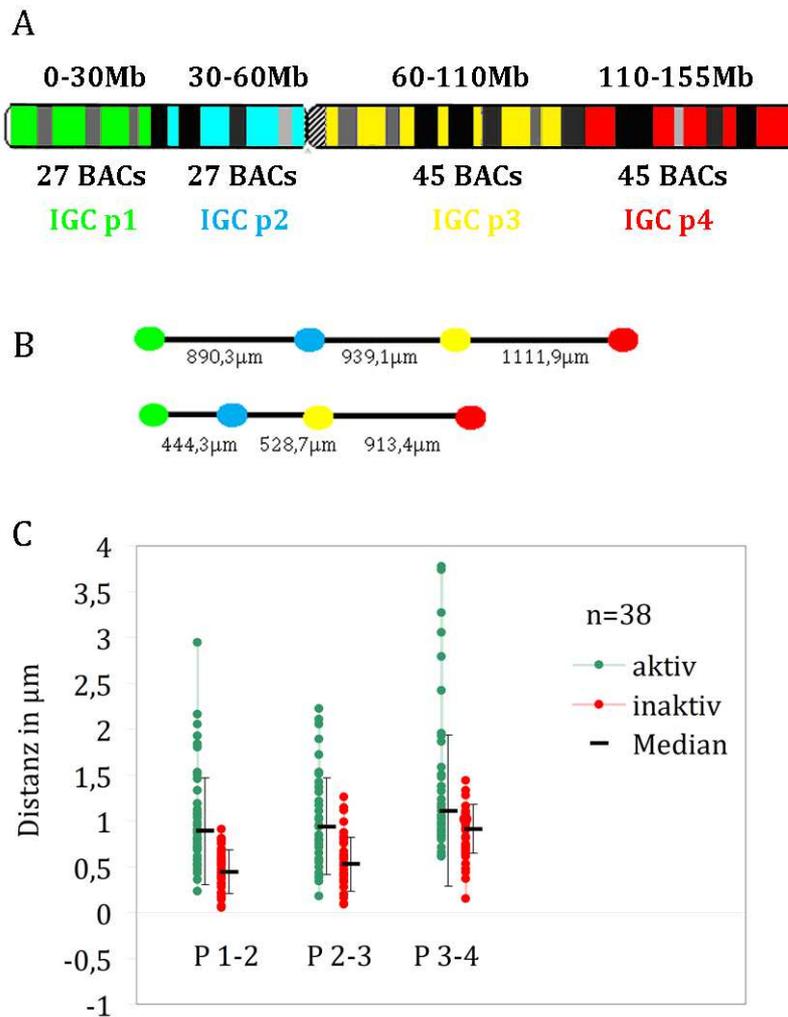
Pools aktiv	1-2	1-3	1-4	2-3	2-4	3-4
P-Wert	0,122	0,002	0,439	0,123	0,034	0,001

Vergleich von aktivem X-Chromosom mit dem inaktiven:

Pools	P-Werte
1	0,001
2	0,001
3	0,001
4	0,006

Distanzanalyse der halben Arme

Um die Chromatinfaltung bzw. die Distanzen zwischen den halben Armen zu berechnen, wurden die BAC-Pools aus dem vorherigen Versuch mit dem Programm *Distangles* ausgewertet. Dieses Programm berechnet den Intensitätsschwerpunkt der Farbsignale und die Distanzen zwischen den Farbkanälen. Dadurch kann ein Rückschluss auf die Chromatinfaltung und die Chromatin-Kondensation gezogen werden.



**Abb. 68: DNS-Kompaktierung des X-Chromosoms**

A) Ideogramm – geographische Verteilung der BAC-Pools

B) tatsächliche, physikalische Distanzen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms

C) Excel-Graph über die Verteilung der einzelnen Distanzen zwischen den Intensity-Gravity-Zentren des aktiven (grün) und inaktiven (rot) X-Chromosoms.

Abszisse: BAC-Pools P1, P2, P3 und P4.

Ordinate: absolute Distanz in µm, schwarzer Querbalken: Mediane mit Standardabweichung.

Wie auf der Abbildung 68 zu sehen ist, gibt es Unterschiede zwischen dem aktiven und dem inaktiven X-Chromosom. Die einzelnen Distanzen und der Median des aktiven X-Chromosoms sind größer und haben eine höhere Standardabweichung, d.h. eine höhere Variabilität als die des inaktiven X-Chromosoms.

Statistische Auswertung:

Um auszuschließen, dass es sich um eine zufällige Verteilung der Distanzen handelt, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt.

BAC-Pools	n	Median Xa	Median Xi	Mittelwert Xa	Mittelwert Xi	P-Werte aktiv vs. inaktiv
1-2	38	890,32	443,24	1044,17	440,71	P<0,001
2-3	38	939,10	528,75	999,03	540,46	P<0,001
3-4	38	1111,94	913,37	1431,29	856,95	P<0,001
1-4	38	2941,39	1885,38	3474,49	1838,12	P<0,001

Die rosa unterlegten P-Werte sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% statistisch signifikant.

4.4.2.2 Radiale Verteilung der RIDGEs und genarmer Bereiche des X-Chromosoms

In diesem Versuchsteil wurde die radiale Verteilung genreicher und genarmer Bereiche des X-Chromosoms sowie deren Faltung in humanen Granulozyten untersucht.

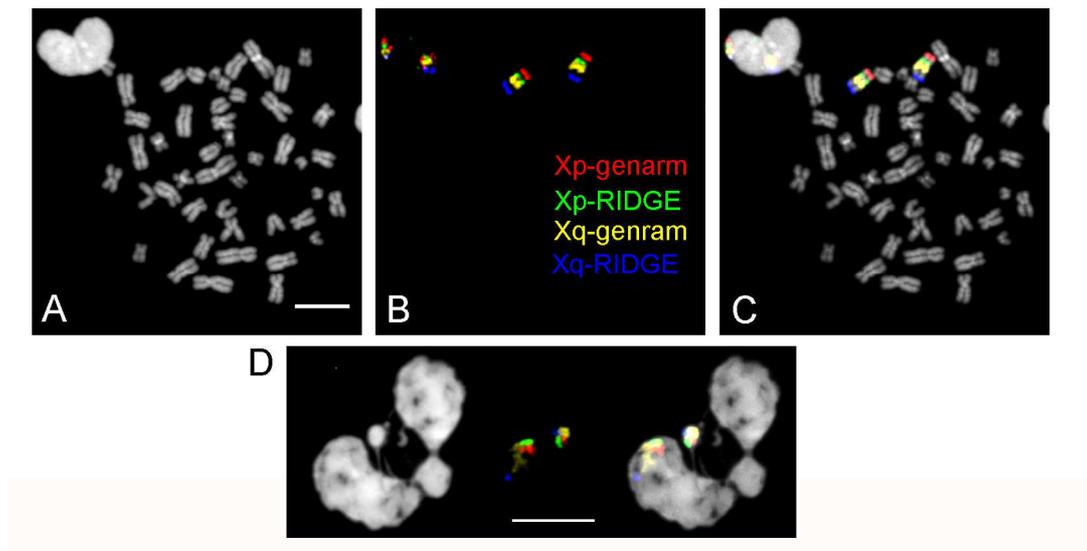
Das humane X-Chromosom besitzt zwei RIDGEs einer befindet sich auf dem p-Arm (41-50 Mb) und einer auf dem q-Arm in der Nähe der Telomere.

Die genarmen Regionen befinden sich in Xp (1-20Mb) und Xq (61-120 Mb).

Die Zusammensetzung der BAC-Pools ist in 3.1 beschrieben.

Detektionsschema:

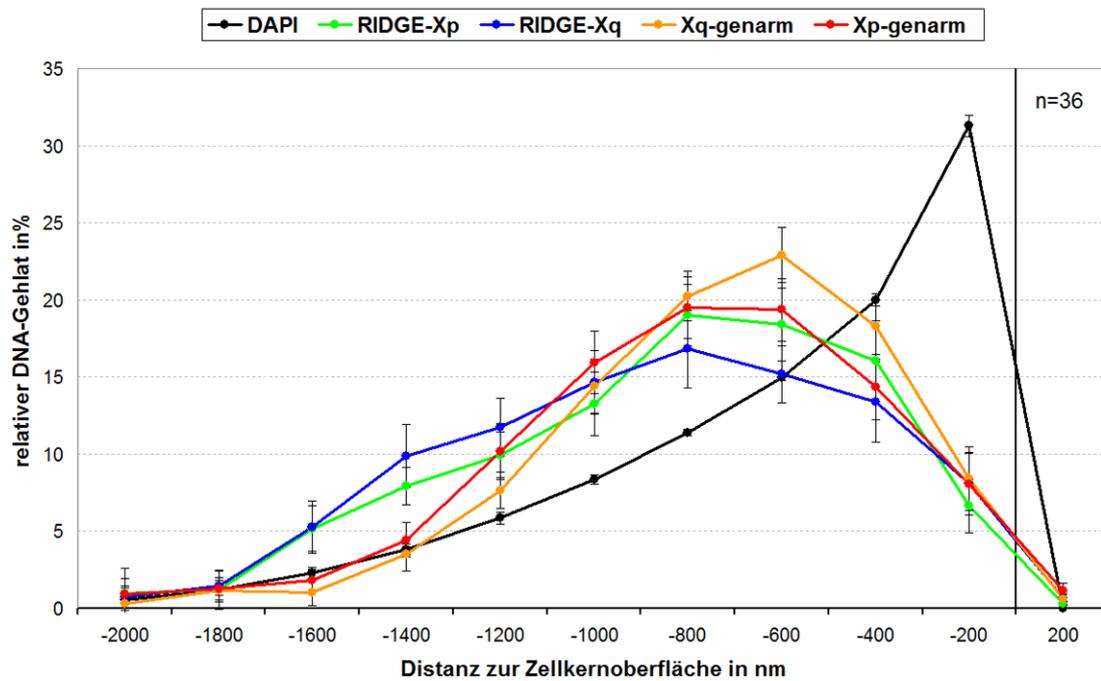
BAC-Pool	Markierung	Detektion
genarm (Xp)	TR	-
RIDGE (Xp)	Bio	M α Dig-Cy5
Genarm (Xq)	Cy3	-
RIDGE (Xq)	Dig	M α Dig-Cy5
Gegenfärbung	-	DAPI



**Abb. 69: 2D-FISH und 3D-FISH mit genreichen und genarmen BAC-Pools;  
Xp-genarm, Xp-RIDGE, Xq-genarm, Xq-RIDGE**

- A) humane Metaphase das Chromatin ist in grau dargestellt.  
 B) BAC-Pools; Xp-genarm in rot, Xp-RIDGE in grün, Xq-genarm in gelb, Xq-RIDGE in blau.  
 C) Überlagerung von A und C.  
 D) Beispiel einer 3D-FISH mit DNS-Sonden für genreiche und genarme Bereiche des X-Chromosoms in humanen Granulozyten-Zellkernen. RGB-Z-Projektionsbild (D) eines Zellkerns, der nur noch mit einer fädigen Verbindung Kontakt zu dem Drumstick hat. Der Scalebar zeigt eine Länge von 5µm.

Der Granulozyten-Zellkern hat das inaktive X-Chromosom als Drumstick ausgebildet. Bei der Betrachtung der BAC-Pools ist zu erkennen, dass das inaktive X-Chromosom stark kondensiert ist und das aktive X-Chromosom eine größere Fläche im Zellkern einnimmt.



**Abb. 70: Kurve der radialen Verteilung von RIDGE-Xp, RIDGE-Xq, Xp-genarm und Xq-genarm im Zellkern**

Farbverteilungen der BAC-Pools:

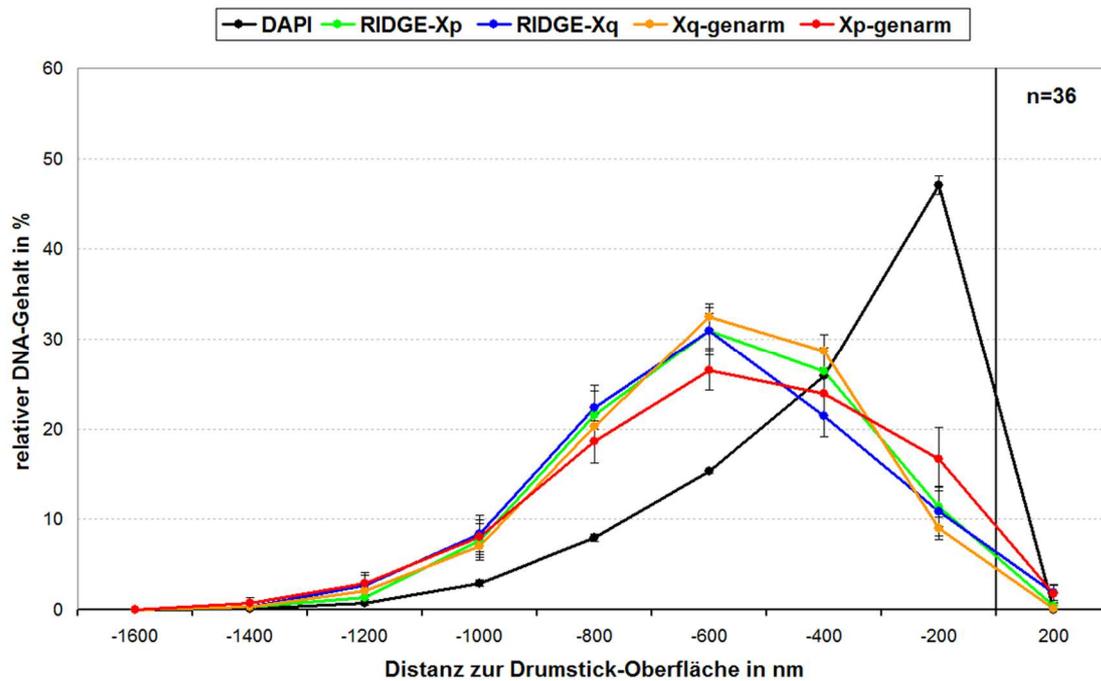
Xp-genarm in rot, Xp-RIDGE in grün, Xq-genarm in gelb, Xq-RIDGE in blau.

Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in %, die Abszisse den Abstand zur Oberfläche des Zellkerns.

#### Statistische Auswertung:

Um die Verteilung der RIDGEs und genarmen BAC-Pools im Zellkern besser beurteilen zu können, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt.

Pools aktiv	RIDGE – Xp RIDGE - Xq	RIDGE – Xp Xp-genarm	RIDGE – Xp Xq-genarm	RIDGE – Xq Xp-genarm	RIDGE – Xq Xq-genarm	Xp-genarm Xq-genarm
P-Wert	0,421	0,496	0,808	0,072	0,57	0,215



**Abb. 71: Kurve radialer Verteilung von RIDGE-Xp, RIDGE-Xq, Xp-genarm und Xq-genarm im Drumstick**

Farbverteilungen der BAC-Pools:

Xp-genarm in rot, Xp-RIDGE in grün, Xq-genarm in gelb, Xq-RIDGE in blau.

Die Ordinate zeigt den relativen DNS-Gehalt in % und die Abszisse den Abstand der FISH-Signale zur Oberfläche des Drumsticks.

Wie in Abbildung 71 zu erkennen ist, ist der relative DNS-Gehalt der RIDGES und der genarmen BAC-Pools im Drumstick von humanen Granulozyten gleich verteilt. Es gibt keine dichte-abhängige, radiale Lokalisation.

#### Statistische Auswertung:

Um die Verteilung der RIDGES und genarmen BAC-Pools im Drumstick besser beurteilen zu können, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt.

Pools inaktiv	RIDGE – Xp RIDGE - Xq	RIDGE – Xp Xp-genarm	RIDGE – Xp Xq-genarm	RIDGE – Xq Xp-genarm	RIDGE – Xq Xq-genarm	Xp-genarm Xq-genarm
P-Wert	0,765	0,915	0,706	0,311	0,356	0,503

Wie aus obiger Tabelle zu entnehmen ist, gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Verteilung von RIDGE–Xp, RIDGE-Xq, Xp-genarm und Xq-genarm des inaktiven X-Chromosoms in Bezug zur Zellkernoberfläche des Drumsticks.

Im nächsten Schritt werden die radialen Verteilungen des inaktiven X-Chromosoms mit der radialen Verteilung des aktiven X-Chromosoms verglichen.

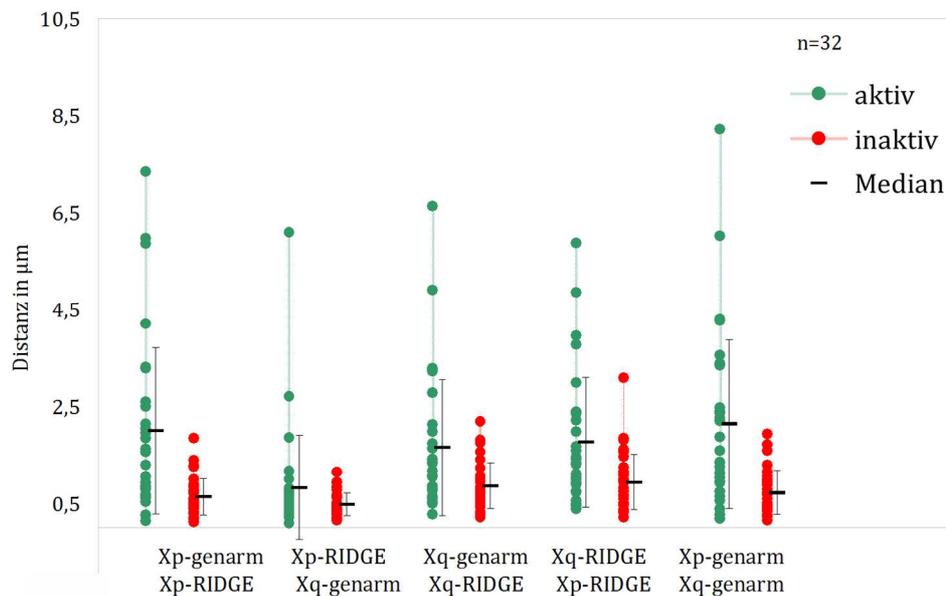
Statistische Auswertung der 3D-Verteilung des aktiven vs. inaktiven X-Chromosoms:

Pools	RIDGE – Xp	RIDGE – Xq	Xq-genarm	Xp-genarm
P-Wert	0,004	<0,001	0,006	<0,001

Wie aus der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, ist das inaktive X-Chromosom, welches sich bereits als Barr-Body organisiert hat, mehr peripher lokalisiert als das aktive X-Chromosom, welches sich noch im Granulozyten-Zellkern befindet.

### Distanzen RIDGES

Um die Chromatin-Kompaktierung zu untersuchen, wurden die BAC-Pools aus der eADS Auswertung (Abb. 70 und 71) verwendet und mit dem Programm *Distangles* ausgewertet. Dieses Programm bestimmt den Intensitätsschwerpunkt eines Signals in einem Farbkanal und berechnet die absolute Distanz zum Intensitätsschwerpunkt der anderen Farbsignale. Über den Faktor Distanz kann auf den Kondensationsgrad geschlossen werden.



**Abb. 72: Verteilung der einzelnen Distanzen zwischen den Intensity Gravity-Centers des aktiven (grün) und inaktiven (rot) X-Chromosoms**

Die Abszisse zeigt die BAC-Pools, die Ordinate die absolute Distanz in nm, der schwarze Querbalken den Median mit Standardabweichung. Das inaktive X-Chromosom ist in rot und das aktive X-Chromosom ist in grün dargestellt. Für die Quantifizierung wurden 32 Zellkerne mit eindeutigem Drumstick verwendet.

Bei Betrachtung der einzelnen Distanzen und der Mediane fällt ein deutlicher Unterschied zwischen dem aktiven und inaktiven Chromosom auf. Die Distanzen im aktiven X-Chromosom haben eine größere Spannweite und eine größer Variabilität (da höhere Standardabweichung).

#### Statistische Auswertung:

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

BAC-Pools	n	Median Xa	Median Xi	Mittelwert Xa	Mittelwert Xi	P-Wert
Xp-genarm- Xp-RIDGE	32	1542,64	657,59	1982,74	628,478	0,001
Xp-RIDGE- Xq-genarm	32	563,711	439,20	810,73	469,53	0,115
Xq-genarm- Xq-RIDGE	32	1108,36	766,54	1624,45	850,72	0.012
Xp-RIDGE- Xq-RIDGE	32	1293,52	861,15	1739,71	925,712	0.007
Xp-genarm Xq-genarm	32	1713,95	619,68	2122,37	707,64	<0,001

Wie aus der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, hat das inaktive X-Chromosom, welches sich bereits als Barr-Body organisiert hat, einen signifikant höheren Kompaktierungsgrad als das potentiell aktive X-Chromosom, welches sich noch im Granulozyten-Zellkern befindet.

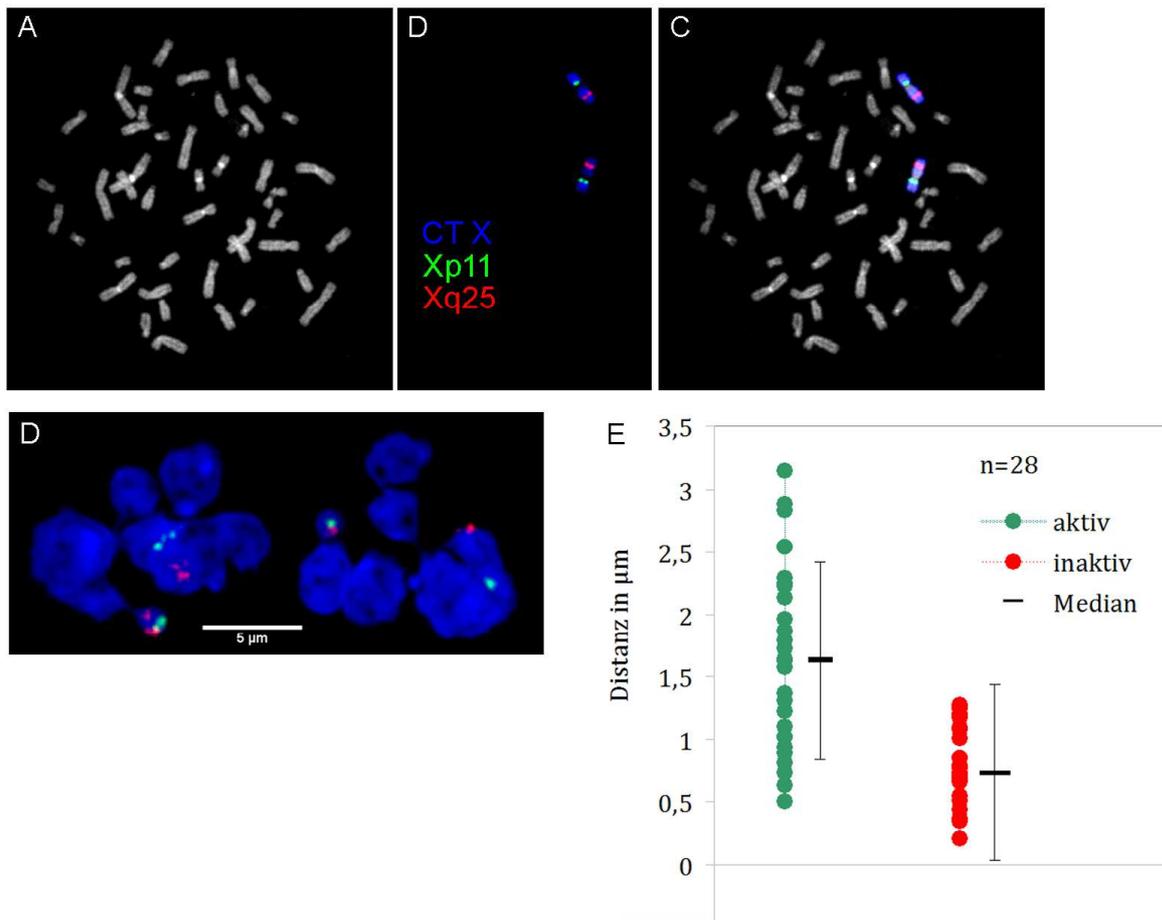
#### 4.4.2.3 Radiale Verteilung von Xp11 und Xp25

Im folgenden Experiment wurde die Verteilung des Chromatins aufgrund seiner Gendichte untersucht. Das Expressionsprofil wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Die genreiche Region befindet sich auf Xp11 (von 46.52MB bis 49.46Mb) und besteht aus 8 BACs. Die genarme Region befindet sich auf Xq 25 (von 121.31.31Mb bis 125.90Mb) und beinhaltet ebenfalls 8 BACs. Die Zusammensetzung der DNS-Sonden ist in 3.1 beschrieben. Die Qualität der DNS-Sonden wurde auf einem 2D-Metaphasepräparat getestet, anschließend eine 3D-FISH durchgeführt und 28 Zellkerne an einem konfokalen Leica SP5 als 3D-Bildstapel aufgenommen, in ImageJ prozessiert und mit eADS ausgewertet.

Detektionsschema:

BAC-Pool	Markierung	Detektion
Xp11	Cy3	-
Xq25	Bio	Avidin –Alexa 488
X-Paint	DNP	RαDNP RαDNP-TR
Gegenfärbung	–	DAPI

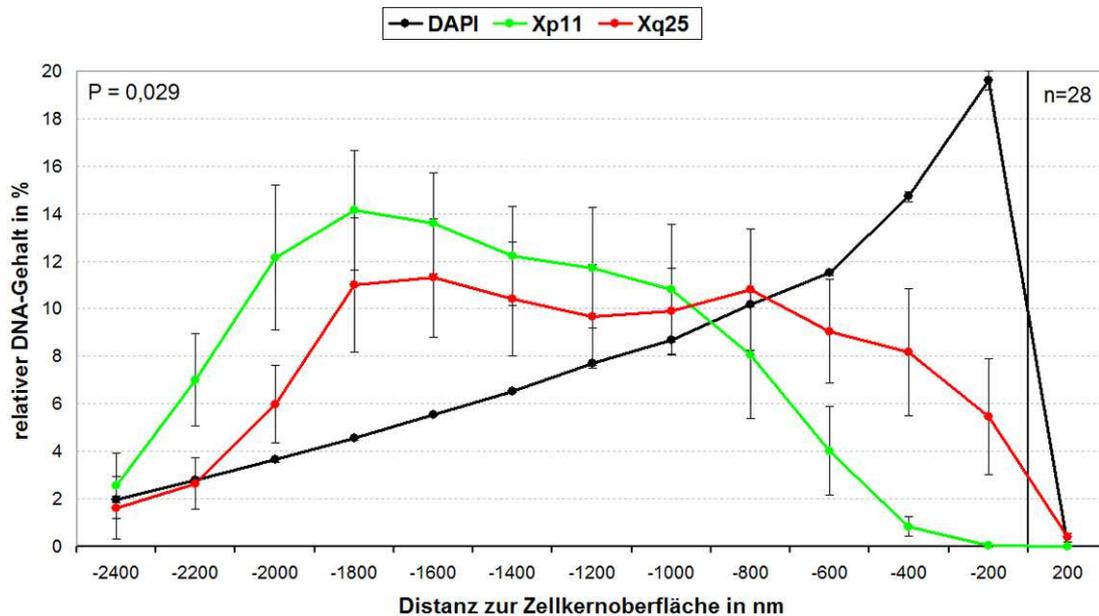


**Abb. 73: 2D-FISH und 3D-FISH der Regionen Xp11 und Xq25**

A) humane Metaphase das Chromatin ist in grau dargestellt.  
 B) das X-Chromosom ist in blau, BAC-Pools für die genreiche Region Xp11 in grün und genarme Region Xq25 in rot dargestellt. C Überlagerung von A und B.  
 D) RGB-Z-Projektionsbilder von zwei humanen Granulozyten  
 E) Excel-Graph (Dot-plot) mit absoluten Distanzen zwischen dem Intensity Gravity Centren der BAC-Pools Xp11 und Xq25. Das aktive X-Chromosom ist in grün, das inaktive in rot und der Median als schwarzer Querbalken mit Standardabweichung dargestellt.

Um die Distanz zwischen den BAC-Pools Xp11 und Xq25 zu ermitteln wurde der Bildstapel aus der eADS-Auswertung verwendet und mit dem Programm *Distangles* ausgewertet.

Wie bereits in Abbildung 73 D zu sehen ist, ist die Spannweite des aktiven X-Chromosoms höher als die des inaktiven X-Chromosoms.



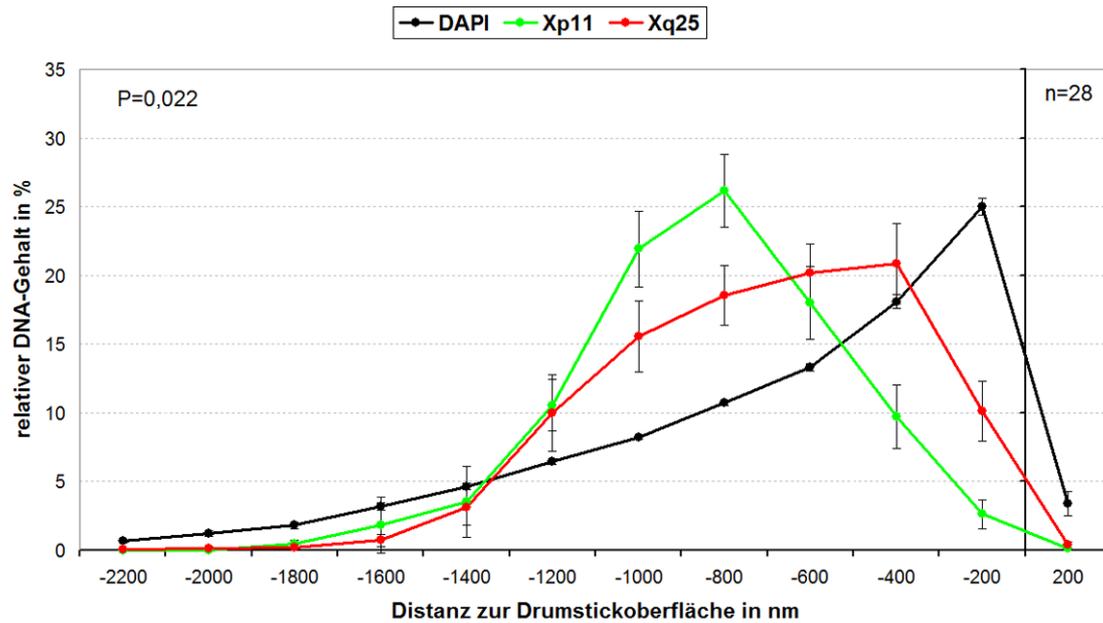
**Abb. 74: Kurve der radialen Verteilung von Xp11 und Xq25 im Zellkern von humanen Granulozyten**

Die Ordinate zeigt die relative Verteilung der BAC-Signale, die Abszisse den Abstand in nm zur Oberfläche des Zellkerns. Die grüne Kurve repräsentiert den genreichen BAC-Pool Xp11, die rote Kurve zeigt den genarmen BAC-Pool Xq25 und die schwarze Kurve zeigt die Zellkerngegenfärbung.

Die Graphen für genarme und genreiche BACs zeigen einen unterschiedlichen Kurvenverlauf. Das genreiche Chromatin der Subregion Xp11 (grün) des aktiven X-Chromosoms orientiert sich zur Zellkernmitte. Hingegen ist das genarme Chromatin der Subregion Xq25 (rot) in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert.

Der Mann-Whitney Rank Sum-Test ergab einen P-Wert von 0,029.

Dies bedeutet, dass der Unterschied zwischen den Kurven statistisch signifikant ist.



**Abb. 75: Kurve der radialen Verteilung Xp11 und Xq25 im Drumstick von humanen Granulozyten**

Die grüne Kurve zeigt den genreichen BAC-Pool Xp11, die rote Kurve zeigt den genarmen BAC-Pool Xq25 und die schwarze Kurve die Drumstick-Gegenfärbung.

Das genreiche Chromatin der Subregion Xp11 des inaktiven X-Chromosoms orientiert sich zur Drumstickmitte. Hingegen ist das genarme Chromatin der Subregion Xq25 in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert. Der Mann-Whitney Rank Sum Test ergab einen P-Wert von 0,022. Dies bedeutet, dass sich die Subregionen Xp11 und Xq25 innerhalb des Drumsticks signifikant unterschiedlich verteilen.

Insgesamt kann man die vorgestellten Versuche in humanen Granulozyten wie folgt zusammenfassen:

Wie bereits bekannt ist, sind humane Granulozyten aus dem peripheren Blut einer gesunden Spenderin in G0 und produzieren kaum RNS.

Im DAPI-freien Raum reichert sich aktives Chromatin (H4K8ac) an. DAPI- und 7-AAD-Signale nehmen im Zellkern von humanen Granulozyten unterschiedliche Positionen ein. 7-AAD befindet sich in der Zellkernmitte und DAPI am Zellkernrand.

Genreiche subchromosomale Abschnitte von Chromosom 1 orientieren sich zur Zellkernmitte und genarme zum Zellkernrand. Genreiche und genarme Subregionen haben in Bezug zum CTn 1 eine signifikant unterschiedliche Verteilung. Genreiche DNS ist an der Oberfläche der CTn und genarme orientiert sich ins Innere der CTn. Genreiche subchromosomale Abschnitte von Chromosom 12 orientieren sich zur Zellkernmitte, genarme zum Zellkernrand und in Bezug zum CTn sind sie gleich verteilt.

Wie bereits bekannt ist, hängt die Drumstick-Bildung von der Fixierungsmethode ab. Zellkerne, die mit 4%PFA in 1xPBS fixiert wurden, zeigen keinen Drumstick. Zellkerne, die mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und aufgetropft wurden, bilden Drumsticks. Es gibt eine Korrelation zwischen der Anzahl der Kernsegmente und der Häufigkeit der Drumsticks und der Verteilung der X-Chromosomen auf unterschiedliche Lobuli.

Das inaktive X-Chromosom hat einen statistisch signifikant höheren Kompaktierungsgrad. Dies konnte mit drei verschiedenen unabhängigen Experimenten gezeigt werden (4.4.2.1, 4.4.2.2 und 4.4.2.3)

Die Beurteilung der Verteilung genreicher und genarmer Subregionen innerhalb des Drumsticks gestaltet sich schwierig.

RIDEGs und genarme Subregionen des X-Chromosoms sind innerhalb des Drumsticks gleich verteilt. Hingegen sind Xp11 (genreich) und Xq25 (genarm) innerhalb des Drumsticks signifikant unterschiedlich verteilt.

## **DISKUSSION**

Die räumliche Organisation von Chromatin im Zellkern spielt eine wichtige Rolle in der Genomregulation und Genexpression. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Aspekte dieser hochorganisierten Chromatin-Anordnung in verschiedenen Zelltypen untersucht und gendichte-abhängige Regeln entdeckt. Diese gendichte-abhängigen Regeln wurden in der vorliegenden Dissertation in Zellkernen mit bizarrer Zellkernmorphologie untersucht, zu denen es bisher noch keine Befunde der 3D-Genomstruktur auf dem subchromosomalen Level gibt.

Es wurde die Chromatinorganisation von Chaetocin-behandelten Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten (Kupper et al., 2007; Teller et al., 2011) analysiert.

Eine weitere ungewöhnliche, interessante Zellkernform haben Granulozyten. Ihr Zellkern ist lobuliert und hat stark kondensiertes, peripheres Chromatin. Über die Genomorganisation von Granulozyten auf dem subchromosomalen Level, sowie der gendichteabhängigen Anordnung von Chromatin im Drumstick ist bisher noch nichts bekannt.

### Teil I: Der Einfluss von Chaetocin auf das Organisationsprinzip von Chromatin in humanen Fibroblasten

Im ersten Teil der Doktorarbeit wurde der Einfluss von Chaetocin, einem Epipolythiodioxopiperazin (Hauser et al., 1970) auf die Zellkernarchitektur von humanen Fibroblasten untersucht.

Dieser Teil untergliedert sich in zwei weitere Bereiche:

1. Zellspezifische Sensitivität gegenüber Chaetocin.  
Abgrenzung zu weiteren Phänotypen mit kondensiertem Chromatin (Apoptose, Prometaphase, SAHFs und hyperkondensiertes Chromatin).  
Außerdem wurde die Frage geklärt, ob Chaetocin oxidativen Stress induziert.
2. Im zweiten Teil wurde untersucht, wie der Zellkern organisiert ist, d.h. es werden die Fragen beantwortet, welche funktionellen Räume nach einer Chaetocin-Induktion entstehen, d.h. was befindet sich innerhalb bzw. außerhalb der CICC und wie ist das Chromatin in Bezug zum Cluster und zum Zellkernrand organisiert.

### **Zellspezifische Effekte**

Chaetocin führt sukzessiv zur Chromatin-Kondensation, diese sind von der Dosis (Molekül pro Zelle), Dauer der Behandlung und dem Zelltyp abhängig.

Isham und Mitarbeiter konnten in Myelom-Zellen einen Chaetocin-abhängigen, oxidativen Stress zeigen, welcher später zur Apoptose führt. Eine Wiederholung dieses Experimentes konnte eine Chaetocin abhängige Apoptose in Myelom-Zellen bestätigen (Abb.24).

Insgesamt wurden 25 verschiedene Zelllinien getestet, mit dem Ergebnis, dass eine Sensitivität gegenüber Chaetocin und die daraus resultierende Heterochromatisierung zelltypspezifisch sind. CICC's kommen nur in primären und immortalisierten Fibroblasten vor, interessanterweise jedoch nicht in Fibrosarcomzellen (HT80).

In hämatopoetischen Zellen oder in Tumor-Zelllinien konnte keine CICC Bildung belegt werden. Eine zelltypspezifische Sensitivität gegenüber Toxinen ist u.a. das Resultat von Import- und Exportsystemen der Zelle. Diese sind vor allem in Tumorzelllinien verändert, zu Gunsten eines schnelleren Exportes (Souslova and Averill-Bates, 2004).

Auch die SAHF-Bildung ist ein zelltypspezifisches Phänomen, welches in Fibroblasten und nicht in hämatopoetischen Zellen beschrieben wird (Narita et al., 2003; Zhang et al., 2007).

Dies belegt, dass aus Beobachtungen eines Zelltyps generell keine allgemein gültigen Rückschlüsse gezogen werden können.

### **Zellkernmorphologie mit hyperkondensiertem Chromatin**

Eine Chromatin-(Hyper-)Kondensation kann unter physiologischen Bedingungen während des Zellzyklus in der Mitose, der Meiose und der Apoptose beobachtet werden (Abb. 77 im Anhang). Auch die SAHF-Bildung ist eine natürlich vorkommende Heterochromatisierung, die durch verschiedene Ereignisse wie Telomer-Verkürzung (Harley et al., 1990), oxidativen Stress (Serrano and Blasco, 2001) und Onkogenaktivierung (Serrano et al., 1997) verursacht werden kann.

Die CICC-I-Formation ähnelt einer Prometaphase und Chromatin, welches hyperosmolar behandelt wurde (Albiez et al., 2006), wohingegen die CICC-II-Formation dem Phänotyp von SAHFs entspricht. Zu diesen Chromatinstadien gibt es bislang keine Untersuchungen zur 3D-Genomorganisation.

Eine Korrelationsanalyse zwischen den Zellzyklusmarkern pKi67, H3pS10 und BrdU (Abb. 28) und der Heterochromatisierung nach Chaetocin-Behandlung ergab keinen Hinweis auf einen Arrest in der Prometaphase. Nach einer Chaetocin-Behandlung kommen weiterhin alle Zellzyklusmarker vor. Je stärker das Chromatin kondensiert, desto mehr nehmen die Zellzyklusmarker ab.

Der Prometaphase-Marker H3pS10 zeigt die geringste Varianz zwischen der Kontrolle und der CICC-II-Formation. Er bleibt mit 10% (+/-2%) unabhängig von dem Grad und der Dauer der Heterochromatisierung relativ konstant. Ursächlich hierfür kann auch ein stabileres H3pS10-Protein sein, welches von der Zelle langsamer abgebaut wird als pKi67.

Jedoch nimmt der pKi67-Marker nach einer Chaetocin-Behandlung stark ab.

Die Hälfte der Kontrollfibroblasten sind pKi67 positiv, mit dem Grad der Chromatin-Kondensierung nimmt der pKi67-Marker ab. In CICC-II-Zellen haben nur noch 12% pKi67 angereichert. Daher kann auf einen Chaetocin-induzierten Zellzyklusarrest geschlossen werden.

Ein CICC-I-Phänotyp lässt sich eindeutig von Chromatin nach hyperosmolarer Behandlung abgrenzen. CICC I entwickelt sich über viele Stunden bzw. beginnt erst nach 6-8 Stunden (Abb. 19) und kann sich mehrere Tage lang trotz Mediumwechsel (ohne Chaetocin) aufrecht erhalten.

Hingegen führt eine hyperosmolare Behandlung von Chromatin innerhalb von Sekunden zu kompaktem Chromatin und löst sich in physiologischem Medium rasch wieder auf (Albiez et al., 2006).

Eine Abgrenzung von CICC II zur Apoptose ergab ein Fehlen von Apoptosemarkern in Chaetocin-behandelten Zellen (3.2.3). Zellen, die ihr Chromatin zu CICCs umorganisiert haben, sind vitale Zellen, dies konnte durch einer 7-AAD-Lebendfärbung und durch das Fehlen von *cleaved caspase 3* nachgewiesen werden. Des Weiteren haben Chaetocin-behandelte Zellen ein intaktes Zytoskelett, Lamin A, Lamin B, einen Nukleolus, besitzen Splicing Speckles und Histonmarker, sind in der Lage RNS zu bilden und transportieren die RNS ins Zytoplasma. Außerdem ist für gewöhnlich in einem CICC die DNS von nur einem Chromosom enthalten, jedoch kann sich ein Chromosom auf zwei benachbarte CICCs aufteilen.

Hilmar Strickfaden konnte mittels einer Lebendzellmikroskopie zeigen, dass Zellen mit CICC II mobil sind (Illner et al., 2010). Die Summe dieses Erscheinungsbildes spricht gegen eine Apoptose.

Die Seneszenz in Fibroblasten ist ein komplexes Geschehen, das u.a. zu morphologischen Veränderungen wie SAHF-Bildung führt. Eine Abgrenzung von SAHF und CICC II allein durch eine DAPI-Färbung gestaltet sich jedoch schwierig.

Bei beiden handelt es sich um nicht mehr proliferierende Zellen, die über Tage hinweg kondensiertes Chromatin haben. Durch eine DAPI-Färbung ist es nicht möglich, CICC von SAHFs zu unterscheiden. In beiden Chromatin-Organisationen kommt es zu einer Anreicherung von tri-methyliertem H3K9, einem Marker für konstitutives Heterochromatin (Kouzarides, 2007).

Sowohl ein CICC (Abb. 34) als auch ein SAHF sind jeweils ein Chromosom (Funayama et al., 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Chromosomen-Paint nicht mit einem CICC deckungsgleich ist, da die Paint Sonden genreicher Chromosomen über den DAPI-Rand eines CICC hinaus reichen.

Beide Phänotypen (CICC und SAHFs) sind nur in Fibroblasten zu beobachten.

Eine Untersuchung von klassischen Seneszenz-Markern (Jolly et al., 2002) nach 48-stündiger Chaetocin-Behandlung ergaben ein Fehlen von Lipofuchsin und p21,

eine geringe Anreicherung von SA- $\beta$ -Gal (pH6) und eine Anreicherung von p16 und p53.

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene aktiviert, die in der *DNS-damage-response*, in der Zellzykluskontrolle, in der Apoptose (Ungewitter and Scoble, 2009) sowie in der Regulation der Seneszenz (Lanigan et al., 2011) involviert sind. p53 wird in einer gesunden Zelle durch das Proteasom rasch abgebaut. Kommt es jedoch zu einem DNS-Schaden, so wird p53 phosphoryliert und dadurch stabilisiert. Nach einer Chaetocin-Behandlung kommt es zu einer statistisch signifikanten Anhäufung von p53 im Zellkern. Kontroll-Fibroblasten sind überwiegend p53-negativ. Jedoch in Chaetocin-behandelten Zellen reichert sich p53 im Zellkern an (Abb. 30). Die Akkumulation von p53 spricht für eine Chaetocin-induzierte, zelluläre Stressantwort, die als Folge von DNS-Schaden, Veränderungen des Chromatins oder durch oxidativen Stress ausgelöst wird (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Serrano and Blasco, 2001).

Die Untersuchungen zur Zellkernarchitektur wurden nach einer zweitägigen Chaetocin-Induktion durchgeführt, zu diesem Zeitpunkt kam es nur zu einer sehr geringfügigen Anreicherung von SA- $\beta$ -Gal. Jedoch nimmt die SA- $\beta$ -Gal (pH6)-Aktivität mit der Dauer der Chaetocin-Behandlung zu. Nachdem die Zellen zwei Tage lang mit Chaetocin behandelt wurden und zwei weitere Tage in Chaetocin freiem Medium kultiviert wurden, zeigte nahezu die Hälfte aller Zellen eine SA- $\beta$ -Gal-Aktivität.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass nicht jede SA- $\beta$ -Gal-positive Zelle SAHFs oder CICC zeigen. Ebenso ist nicht jedes SAHF oder CICC SA- $\beta$ -Gal-positiv (Abb. 33).

Der SA- $\beta$ -Gal-Test ist ein klassischer Seneszenzmarker (Dimri et al., 1995) jedoch konnte durch neuere Studien gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer SA- $\beta$ -Gal-Aktivität nicht grundsätzlich auf eine Seneszenz schließen lässt (Cristofalo, 2005).

Die Testung der Seneszenzmarker ergab eine Anreicherung von p16, p53 und SA- $\beta$ -Gal.

Dies bedeutet, dass es durch die Gabe von Chaetocin zu einer Telomer unabhängigen Form der Seneszenz kommt, die durch akuten Stress induziert wird und daher auch prämatüre Seneszenz genannt wird.

### **Oxidativer Stress**

Nachdem nun festgestellt worden war, dass es sich um vitale Zellen handelt, wurde untersucht, ob Chaetocin oxidativen Stress induziert. Isham und Mitarbeiter beschreiben Chaetocin als ein therapeutisches Agens, welches in hämatopoetischen Tumorzellen zu oxidativem Stress und anschließend zur Apoptose führt.

Eine Detektion von intrazellulären ROS mittels DCF-Färbung und FACS-Analyse ergab, eine leichte Zunahme von oxidativem Stress in Chaetocin-behandelten Zellen. Hierbei gab es jedoch kaum einen Unterschied zwischen 0,01 $\mu$ M und 0,02 $\mu$ M Chaetocin.

Jedoch konnte nach zweitägiger Chaetocin-Behandlung ein starker Zellverlust von ca. 50% beobachtet werden. Insgesamt sprechen die DCF-Daten für einen leichten oxidativen Stress in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion, welcher anschließend zum Zelltod führt. Die DCF-Färbung ist das Mittel der Wahl, wenn es darum geht, den oxidativen Stress einer Zelle zu bestimmen (Seiler et al., 2008). Ein Nachteil ist jedoch, dass die zelleigene Elastase benötigt wird, über deren Funktion nach einer Chaetocin-Behandlung keine Daten vorhanden sind.

Falls die Elastase durch Chaetocin beschädigt ist, ist die DCF-Färbung nicht geeignet, um oxidativen Stress nachzuweisen. Deshalb sollten weitere Tests verwendet werden, um ROS in Chaetocin-behandelten humanen Fibroblasten zu untersuchen. Von Interesse in diesem Zusammenhang ist auch ein oxidativer Stress an Nukleinsäuren. Ein klassischer Marker hierfür ist 8-oxo-dG.

### **Effekte von Antioxidantien und Enzyminhibitoren**

Chaetocin ist ein Substrat der Thioredoxin-Reductase-1 (TrxR1) (Tibodeau et al., 2009).

Dadurch werden die downstream regulierten Stoffwechselwege gehemmt, was u. a. zu einer verminderten Verteidigung gegen oxidativen Stress führen kann (Tibodeau et al., 2009)

Um zu untersuchen, ob Chaetocin in humanen Fibroblasten zu oxidativem Stress führt wurden verschiedene, wasserlösliche oder lipidlösliche Antioxidantien getestet, die den Zellen vor der Gabe von Chaetocin zugeführt wurden (2.4.3).

Dadurch wurde festgestellt, dass die Wirkung von Chaetocin durch GSH, GSH-EE und N-Acetyl-Cytein vollkommen unterbunden wird. Diese Daten sprechen für eine Erschöpfung des Glutathion-Vorrates unter einer Chaetocin-Behandlung und zeigen, dass Chaetocin in oxidierter Form vorliegen muss, damit es zu einer Heterochromatisierung kommt.

Mit L-buthionine Sulfoximin (BSO), ein Inhibitor der Glutamyl-Cystein-Synthetase (Carey et al., 2010; Cuzzocrea et al., 1998) und damit des Thioredoxin Reduktase (TrxR1) Systems (Tibdau et al 2009) konnten Chromatin-Cluster induziert werden, die einer CICC Formation entsprechen. Dies spricht dafür, dass es unter Chaetocin zu einer Beeinträchtigung des Thioredoxin-I (Trx-I)-Systems kommt. Die Folgen einer Inhibierung der Thioredoxin-Reductase (TrxR) und des Glutathion-Stoffwechsels sind eine Beeinträchtigung der DNS-

Synthese, des antioxidativen Schutzes bei Stress, sowie der zellulären Proliferation und Vitalität (Lu et al., 2007).

## **Der CICC Phänotyp assoziiert mit der Zellkernarchitektur**

### Ebene der gendichteabhängigen Organisation von Chromatin

Eine gendichteabhängige Verteilung von Chromatin wurde in verschiedenen Organismen und zahlreichen Zelltypen beschrieben. In der konventionellen Zellkernarchitektur befindet sich genarmes Chromatin in der Zellkernperipherie und genreiches Chromatin im Zentrum des Zellkerns (Cremer and Cremer, 2010; Kupper et al., 2007; Lanctot et al., 2007, Murmann et al., 2005).

Auch nach chromosomalen Translokationen in Tumorzellen (Cremer et al., 2003) oder in der Evolution von Chromosomen (Neusser et al., 2007) bleibt die radiale Verteilung in Bezug zum Zellkernrand erhalten. Hingegen wurde eine gendichteabhängige radiale Verteilung von subchromosomalen Abschnitten in Bezug zum Chromosomen-Territorium nicht beobachtet.

Chromosomen falten sich demnach aufgrund ihrer Gendichte, dies lässt die Vermutung einer energetischen oder biologischen Notwendigkeit zu. Die Bodyguard-Hypothese (Gazave et al., 2005; Hsu, 1975) besagt, dass das dichtgepackte, genarme Heterochromatin am Zellkernrand das genreiche Euchromatin im Inneren des Zellkerns vor Strahlung und toxischen Agenzien schützt. Nach UV-Bestrahlung konnte jedoch keine unterschiedliche Sensitivität zwischen genreichem und genarmem Chromatin festgestellt werden (Gazave et al., 2005; Hsu, 1975).

Die Ergebnisse dieser oben genannten Arbeiten gehen nicht konform mit den Beobachtungen an Chaetocin-behandelten Zellen.

Dieser Teil der Arbeit befasste sich mit der Frage, welchen Einfluss Chaetocin auf die Zellkerarchitektur hat. In der konventionellen Zellkernarchitektur sind Chromosomen-Territorien entsprechend ihrer Gendichte, ihrer Größe und ihrer Transkription radial angeordnet. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit besteht in der Untersuchung von genomischer Reorganisation assoziiert mit kondensiertem Chromatin.

Mit bereits etablierten DNS-Sonden für die Chromosomen 1, 12 und X konnten bereits bestehende Modelle der Chromatin-Verteilung in den Kontrollfibroblasten (Kupper et al., 2007, Dissertation Teller, 2008) erneut bestätigt und die Chromatin-Organisation von CICCs eingehend untersucht werden. Es wurden vier gendichteabhängige Experimente durchgeführt. Untersucht wurde die Lage der Chromosomen #18 und #19 und der *Alu*-Sequenzen (Abb. 40) sowie die Lage der genreichen und genarmen Subregionen der Chromosomen 1, 12 und X (Abb. 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52).

Zunächst konnten in den Kontrollpräparaten, d.h. in primären, unbehandelten Fibroblasten bereits bestehende Ergebnisse erneut bestätigt werden.

Wurden die Fibroblasten mit Chaetocin behandelt und hatten sie eine unauffällige DAPI-Färbung, kam es interessanterweise dennoch zu einer Aufhebung der gendichteabhängigen Chromatin-Polarität in Bezug zum Zellkernrand und einer statistisch signifikanten Chromatin-Polarität in Bezug zum Chromosomen-Territorium (3.8).

Hatten die Fibroblasten ihr Genom zu CICC's reorganisiert, wurde ebenfalls eine Aufhebung der gendichteabhängigen Zellkernarchitektur zum Zellkernrand beobachtet, die mit einer statistisch signifikanten Polarität des Chromatins zum CTn bzw. CICC einhergeht.

Das genarme Chromosom 18 kolokalisiert mit den CICC's, wohingegen das genreiche Chromosom 19 und die *Alu*-Sequenzen überwiegend zwischen den DAPI-Clustern eingebettet sind.

Die genreichen subchromosomalen Abschnitte der Chromosomen 1, 12 und X liegen auf der Oberfläche der CICC's und die genarmen Abschnitte haben sich in das CICC hinein gestülpt.

Die Lage der Zentromere und Telomere in Bezug zur CICC-Oberfläche ist mit einem P-Wert von 0,003 ebenfalls unterschiedlich verteilt. Zentromere befinden sich innerhalb der CICC's und die Telomere an der Oberfläche (Abb. 39).

### **Eu- und Heterochromatin**

Bereits 1998 wurde von Breznezny und Wei das Konzept von Kernzonen als strukturelle Voraussetzung von Replikation und Transkription vorgeschlagen. Die Organisation des Zellkerns ist durch funktionelle, distinkte, radial angeordnete Zonen charakterisiert. Primäre Fibroblasten haben eine konventionelle Zellkernarchitektur, in der sich das Heterochromatin entlang des Zellkernrandes und am Nukleolus konzentriert. Das Euchromatin liegt in Zonen zwischen dem Heterochromatin (Berchtold et al., 2011; Cremer et al., 2006; Fraser and Bickmore, 2007; Meaburn and Misteli, 2007; Misteli, 2007).

Die Zellkernzonen waren Bestandteil der nächsten Experimente.

Nachdem nun festgestellt worden war, dass sich das Chromosom unter dem Einfluss von Chaetocin neu organisiert, indem es die genreichen Regionen nach außen und die genarmen Regionen nach innen stülpt, wurden die radialen Zellkernzonen mit einer Antikörperfärbung gegen Eu- und Heterochromatin untersucht (3.7.5).

Hierbei kann festgestellt werden, dass H3K9me3 und H4K8ac zwar großflächig kolokalisieren, aber es dennoch eine eindeutige Tendenz gibt, wonach das Heterochromatin sich bevorzugt im Inneren von CICC's und das transkriptionell aktive Euchromatin an der Oberfläche von CICC's befinden.

Die Oberfläche der CICC's hat möglicherweise eine Struktur wie das aktuell diskutierte Polymer-melt-konzept (Elstov et al., 2008), d.h. das Chromatin hat eine offene Chromatinstruktur und liegt frei zugänglich für Transkriptionsfaktoren.

### **Der CICC-Phänotyp und das Interchromatin-Kompartiment-Modell**

Zu den spezialisierten Zonen eines Zellkerns gehört die Perichromatin Region (PR).

Diese spezialisierte Zone befindet sich an der Oberfläche von aktivem Chromatin und grenzt den nahezu DNS-freien Raum, dem Interchromatin-Kompartiment (IC) an. Im PR sind die *transcription factories*, *splicing speckles* und die neu gebildete RNS enthalten (Cremer and Cremer, 2001).

Die Perichromatin-Region besteht aus transkriptionell aktivem Chromatin, welches dem IC zugewandt ist (Fakan and van Driel, 2007; Niedojadlo et al., 2011).

Die Lage des IC in Zellen, die ihr Chromatin zu CICC's reorganisiert haben, zu untersuchen, war das Ziel der nächsten Experimente. Es wurde untersucht, ob die Zellen trotz CICC Formation weiterhin in der Lage sind, RNS zu bilden und wie diese verteilt sind. Außerdem sind die Verteilung von *splicing speckles* und die Lage des *nukleolus* von Interesse.

Chaetocin führt in humanen Fibroblasten zur Heterochromatisierung, indem sich genreiche und genarme Regionen innerhalb eines Chromosoms neu organisieren. Dadurch wird das Interchromatin-Kompartiment aus dem CT verdrängt und es entstehen zwischen den CTn große DNS-freie Räume, die zu Beginn der Heterochromatisierung durch DNS-Brücken miteinander verbunden sind (Abb. 19). In CICCII-Zellen gibt es keine DNS-Verbindungen zwischen den CICC's und der Interchromatin-Raum vergrößert sich kolossal.

Die Perichromatin-Region ist ein funktionelles Kompartiment im Zellkern, in dem Transkription, RNS-Prozessierung, DNS-Reparatur und Chromatin Replikation stattfindet und Speckles gefunden werden (Markaki et al., 2010; Niedojadlo et al., 2011).

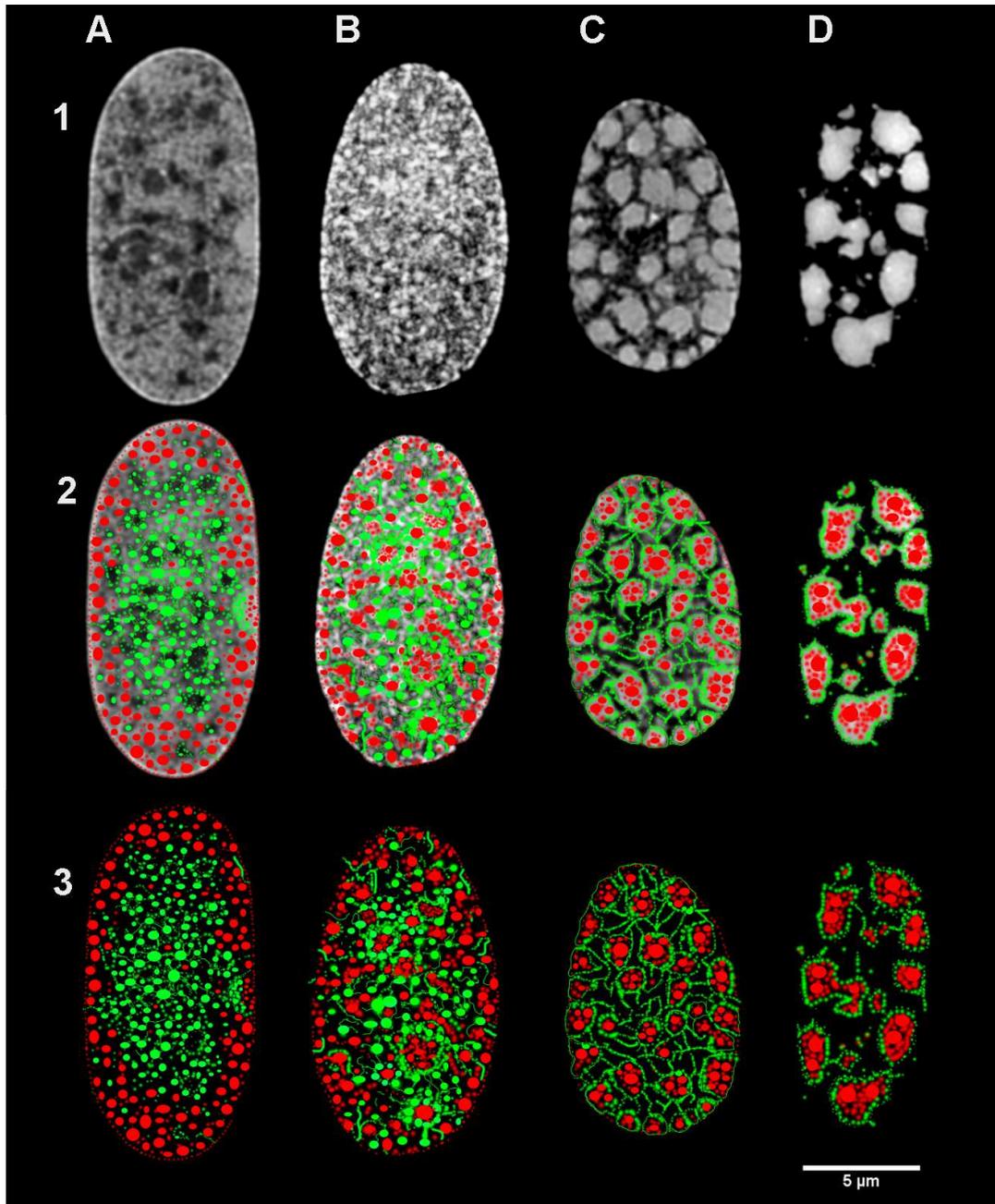
Die PR bleibt nach Chaetocin-Induktion erhalten, jedoch ist sie nicht mehr als feines Netzwerk auch innerhalb des CTs vorhanden, sondern verlagert sich auf die Oberfläche der CICC's.

Neugebildete RNS wurde durch die scratch labeling Methode (Schermelleh et al., 2001) mit BrUTP dargestellt. Bereits nach acht Minuten kann RNS überwiegend an der Oberfläche von CICC's und im DAPI-freien Raum gefunden werden. Nach 30 Minuten konnte RNS im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Die aktive Polymerase II, Splicing Speckles und der Nukleolus war ebenfalls in dem stark vergrößerten Interchromatin-Kompartiment vorhanden. Ihre Lage innerhalb des Zellkerns, sowie ihre Form und Größe erscheinen unspektakulär (3.7).

Mit den Methoden der 3D-FISH und der Immunfluoreszenz konnte mit unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass sich das Chromatin nicht willkürlich oder zufällig verändert. Stattdessen kommt es zu einem reproduzierbaren, einzigartigen Chromatin-

Arrangement auf der Ebene der einzelnen Chromosomen, die mit der Aufhebung der konventionellen Zellkernarchitektur (funktionelle radiale Zonen) einhergeht. Das Chromosom bleibt weiterhin als Einheit erhalten, jedoch faltet es sich hinsichtlich seiner Gendichte neu.



**Abb. 76: Stadien der Heterochromatisierung**

Die Spalten A-D zeigen das Chromatin<sup>7</sup> mit verschiedenen Stufen der Kompaktierung, von wenig (A) bis sehr stark (D) heterochromatisiert. In der Zeile 1 ist das Chromatin durch eine DAPI-Färbung (in grau) dargestellt, Zeile 2 zeigt eine Überlagerung von Zeile 1 und 3, Zeile 3 ist eine in Photoshop erstellte Illustration genreicher (grün) und genärmer (rot) Chromatin-Subregionen.

<sup>7</sup> verschiedener Zellkerne

---

Die Abbildung 76 3D zeigt einen CICCII-Zellkern, in dem nun auch die genreiche DNS heterochromatisiert ist und sich um genarmne DNS-Cluster herum angelagert.

In der vorliegenden Dissertation wurden die Chaetocin-induzierten Zellen mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die Mikroskopie hat sich in den letzten Jahren rasant weiter entwickelt. Neue fluoreszenzoptische Verfahren ermöglichen eine Auflösung unterhalb des Abbe-Limits der klassischen Lichtmikroskopie. Mit solchen Verfahren können mittlerweile Strukturen im Nanometerbereich dargestellt werden (Review: Schermelleh et al., 2010).

Auch die Kombination aus hochauflösender Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie, die sogenannte korrelative Mikroskopie (Rouquette et al., 2010) kann einen noch besseren Einblick in die Strukturen von Zellkernen geben.

Mit diesen neuen mikroskopischen Verfahren könnte in Chaetocin-behandelten Fibroblasten der massiv erweiterte Interchromatin-Raum und die Perichromatinregion noch besser untersucht werden.

---

## Teil II - Untersuchungen zur Chromatin-Organisation

### in humanen Granulozyten

#### Gendichteabhängige Experimente in humanen Granulozyten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Chromatin in humanen Granulozyten. Granulozyten des peripheren Blutes sind terminal differenziert und weitgehend transkriptionell inaktiv (Borregaard and Cowland, 1997).

Ihre Zellkerne sind klein (6µm x 6µm) und segmentiert (Heckner, 2001). Sie können sich amöboid fortbewegen und verändern dabei die Kontur ihres Zellkerns (Köbberling, 1966). Die morphologischen Veränderungen des Zellkerns während der Differenzierung sind im Zusammenhang mit ihren vielfältigen immunologischen Aufgaben zu betrachten. Die Zellkernsegmentierung ist die Folge von der Zusammensetzung verschiedener Proteine in der Zellkernhülle. Eine wichtige Rolle spielen hierbei der Lamin-B-Rezeptor, B1 und B2, LAP2β und Emmerin, so wie die verschiedenen Isoformen von HP1 (α, β, und γ) sowie das Cytoseklett (Olins and Olins, 2004; Olins et al., 2008; Olins and Olins, 2005; Zwerger et al., 2008). Auch der LINC-Komplex und die Zusammensetzung von Heterochromatin beeinflussen die Zellkernform von Granulozyten (Olins et al., 2009).

Die Metaphasechromosomen von humanen Zellen haben einen charakteristischen Aufbau. Sie unterscheiden sich in ihrer Größe, Form und der Anordnung von genreichen und genarmen Subregionen, sowie der Verteilung von repetitiven Sequenzen (Sellis et al., 2007). Mittlerweile ist die lineare Organisation humaner Metaphasechromosomen gut verstanden, ebenso die Organisation einiger Chromosomen bzw. der Territorien im Interphasezellkern von Fibroblasten, Lymphozyten und Tumorzellen.

Mit bereits vorhanden DNS-Sonden für die Chromosomen #1, #12 und #X wurden 3D-FISH-Experimente im Interphasezellkern von Granulozyten durchgeführt.

Des Weiteren wurde die Chromatin-Kompaktierung des potentiell aktiven und des inaktiven X-Chromosoms, welches bereits im Drumstick lokalisiert ist, mittels DNS-Sonden untersucht.

Durch eine Inkubation mit BrU und anschließender Antikörper-Färbung gegen Br und pKi67 konnte ein transkriptionell inaktiver Status der Zellen gezeigt werden (G1). Diese IF wurde durchgeführt, um in den nachfolgenden 3D-FISH-Experimenten den Parameter Genexpression für die quantitative Analyse auszuschließen.

Obwohl unstimulierte Granulozyten des peripheren Blutes kaum mehr RNS mehr bilden, reichern sie im Zentrum des Zellkerns aktives Chromatin H4K8ac an (Abb. 54). Dies bedeutet, dass die verwendeten Granulozyten transkriptionell kompetent sind.

Eine quantitative Analyse mit der bildverarbeitenden Software eADS ergab eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung von DAPI und H4Kac.

Des Weiteren wurde die Chromatin-Polarität mit den DNS-Farbstoffen DAPI und 7-AAD untersucht. DAPI hat eine hohe Affinität zu AT-reichen Sequenzen (Crissman and Hirons, 1994) und färbt somit genarme Regionen, wohingegen 7-AAD überwiegend GC-reiche und somit genreiche Regionen anfärbt. Obwohl sich die 7-AAD- und DAPI-Signale großflächig überlappen, gibt es für die jeweiligen Farbstoffe bevorzugte radiale Positionen innerhalb des Zellkernes.

Um zu testen, ob sich 7-AAD- und DAPI-Signale hinsichtlich ihrer radialen Position im segmentierten Granulozyten-Zellkern unterscheiden, wurde der Mann-Whitney Rank Sum-Test durchgeführt. Er ergab einen P-Wert von  $P < 0,001$ .

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, ist das Chromatin in unstimulierten Granulozyten nicht gleichmäßig verteilt. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Polarität des Chromatins mit DNS-Sonden. Nachdem Granulozyten keine RNS mehr bilden, musste bei den nachfolgenden FISH-Experimenten die Expressionsstärke der BAC-Pools nicht berücksichtigt werden. Die Lage des Chromatins ist über deren Gen-Reichtum definiert.

#### Die Gendichte als der wichtigste Faktor für die radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern

Eine Fülle von Daten konnte den Einfluss der Gendichte auf die Anordnung von Chromatin im Zellkern belegen. Dieses Phänomen ist seit vielen Jahren bekannt und wurde zunächst an den Chromosomen 18 und 19, die sich hinsichtlich ihrer Gendichte erheblich unterscheiden, beschrieben (Croft et al., 1999). Auch in Fibroblasten-Zellkernen von Wolfmeerkatzen, deren Chromosomen fast gleich groß sind konnte eine eindeutige gendichteabhängige Anordnung der Chromosomen beobachtet werden (Neusser et al., 2007). Die Gendichte beeinflusst nicht nur die Lage ganzer Chromosomen, sondern auch die Anordnung subchromosomaler Regionen. Küpper untersuchte in ihrer Dissertation die Chromosomen #11, #12, #18 und #19 in runden und flachen Zellkernen und konnte eine gendichteabhängige radiale Verteilung feststellen (Küpper 2007, Küpper et al., 2007).

Die räumliche Verteilung von subchromosomalen Segmenten mit genreichen und genarmen Regionen wurde in dieser Arbeit in segmentierten, unstimulierten Granulozyten untersucht.

Es wurde die Organisation von Chromatin von den Chromosomen #12 und #1 in humanen Granulozyten untersucht. Das Chromosom 12 besitzt eine durchschnittliche Länge von 134Mb, hat eine mittlere Gendichte von 10 Genen pro Mb und einen mittleren CG-Gehalt von 41,2% (www.ensembl.org). Es gibt drei subchromosomale Regionen mit dicht gepackten Genclustern bei denen es sich jedoch nicht um RIDGEs handelt, also Cluster von Genen die in verschiedenen Geweben eine extrem hohe Expression zeigen (Caron et al., 2001; Versteeg et al., 2003). Die genreichen Regionen befinden sich in der Nähe der Telomere (12p12.3 – 12p13.32, 12q21.2 – 12q12.3) und unterhalb des Zentromers (12q13.11 – 12q12.3) (Küpper et al., 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation gehen konform mit den eben genannten Beobachtungen von Küpper und Mitarbeitern. Es konnte gezeigt werden, dass auch in humanen Granulozyten die subchromosomalen Regionen von den Chromosomen #1 und #12 auf Grund ihrer Gendichte innerhalb des Zellkerns angeordnet sind. In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob auch im Drumstick von Granulozyten dasselbe, gendichteabhängige Ordnungsprinzip Gültigkeit hat.

#### Das humane X-Chromosom in Granulozyten.

1949 entdeckten Barr und Bertram in Zellkernen von weiblichen Katzen das Barr-Körperchen (Barr and Bertram, 1949). Mary Lyon gelang schließlich der Schritt von der morphologischen Veränderung des inaktiven X-Chromosoms zur Erklärung der funktionellen Bedeutung.

Sie entwickelte 1961 die Hypothese der X-Inaktivierung (Lyon, 1961), die erst in jüngster Zeit durch biochemische Methoden, wie Histonmarkern, Expressionsprofile oder die Xist-RNA bewiesen werden konnte.

Mittlerweile sind die Mechanismen der X-Inaktivierung und deren molekulare Funktion gut verstanden (Chan et al., 2011; Ng et al., 2007; Sun et al., 2006), jedoch gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der Verteilung von Chromatin und der unterschiedlichen Kompaktierung des aktiven und inaktiven X-Chromosoms in Interphasezellkernen beschäftigen. Das inaktive X-Chromosom hat offensichtlich eine andere Form und Lokalisation im Zellkern. Das aktive X-Chromosom ist flach und ausgebreitet, ebenso wie autosomale Chromosomen. Hingegen ist das inaktive X-Chromosom kondensiert und ründlich (Teller et al., 2011). Dennoch ist der Kompaktierungsgrad des inaktiven X-Chromosoms nur 1,4-fach höher. Der Unterschied in der Chromatin-Kompaktierung ist durch distinkte subchromosomale Regionen verursacht, diese korrelieren jedoch nicht mit der Genaktivität, der Gen- oder LINE-Dichte und auch nicht mit epigenetischen Markern (Teller et al., 2011).

In der Literatur wurde keine Arbeit gefunden, die den Kompaktierungsgrad und die Polarität von Chromatin im Drumstick von neutrophilen Granulozyten untersucht. Dies war ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation.

In Interphasekernen lässt sich das inaktive X-Chromosom als Barr-Körperchen (Teller et al., 2011) darstellen bzw. als Drumstick in Leukozyten. Wie bereits durch Köbberling (1966) bekannt, ist die Drumstick-Bildung von der Präparationsmethode der Zellen abhängig. Er konnte Drumsticks in Blutaussstrichen und Tropfpräparaten<sup>8</sup> feststellen, jedoch nicht in lebenden Zellen und in Paraffin-Schnittpräparaten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Granulozyten mit 4% PFA in 1x PBS oder mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und aufgetropft. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Zellkerne, die mit 4% PFA in 1xPBS fixiert wurden, keinen Drumstick zeigen. Wurden die Zellkerne jedoch mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und aufgetropft, kam es zu einer hohen Drumstick-Frequenz. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der Kernsegmente und der Drumstick-Häufigkeit festgestellt werden.

Je stärker der Zellkern segmentiert ist, desto höher ist die Frequenz der Drumstick-Bildung und desto häufiger befinden sich die X-Chromosomen in unterschiedlichen Zellkernsegmenten (Abb. 64). In Zellkernen mit zwei Segmenten befanden sich die X-Chromosomen zu 46,80% in räumlich verschiedenen Lobuli und es konnten 8,51% Drumsticks festgestellt werden. Haben die Granulozyten drei Kernsegmente, befinden sich 70,21% der X-Chromosomen in unterschiedlichen Lobuli und ein Drittel der Zellkerne hatte eine Drumstick-Bildung. Bei vier segmentkernigen Granulozyten sind nahe zu alle X-Chromosomen räumlich voneinander getrennt und die Hälfte der Zellkerne haben einen Drumstick.

Als Nächstes wurde mit DNS-Sonden die radiale Organisation des inaktiven X-Chromosoms in humanen Granulozyten untersucht. Das humane X-Chromosom besitzt bis dato 1336 Gene, dies entspricht einer Gendichte 8,6 Genen pro Mb ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Somit ist die Gendichte ungewöhnlich niedrig, vermutlich wurden Gene von denen zwei Kopien benötigt werden, im Laufe der Evolution auf Autosomen ausgelagert. Die Verteilung der Gendichte entlang des X-Chromosoms ist inhomogen aufgebaut. Es gibt zwei RIDGEs Xp11 (31-40Mb) und Xq in der Telomer-Region sowie Bereiche mit einer besonders niedrigen Gendichte Xp (1-20Mb) und (61-120Mb) (Versteeg et al., 2003).

Um den Grad der Kompaktierung des inaktiven X-Chromosoms im Drumstick zu untersuchen, wurden der Xp und Xq-Arm nochmals in gleich große Teile untergliedert (Abb. 65 B).

Der Pool 1 beginnt an der Telomer-Region von Xp und der Pool 4 endet an der Telomer Region von Xq. Pool 1 und 2 beinhalten je 30Mb und in Pool 4 und 5 sind 50Mb zusammengefasst. Eine Auswertung der 3D-FISH-Experimente (Abb. 65 C) ergaben einen signifikant höheren Kompaktierungsgrad (1,55-fach) des inaktiven X-Chromosoms.

---

<sup>8</sup> Nach May-Grünwald und Giemsa

Um die Polarität des Chromatins im Drumstick zu untersuchen, mussten diese zunächst durch eine Methanol-Eisessig-Fixierung und Auftropfen auf den Objektträger erzeugt werden. Mit zwei verschiedenen Experimenten wurde die gendichteabhängige Anordnung von Chromatin untersucht. Im ersten Experiment lag der Fokus auf zwei kleinen Subregionen, die sich hinsichtlich ihrer Gendichte erheblich unterscheiden. Die genreiche Region liegt innerhalb des RIDGEs auf Xp11 und beinhaltet acht BACs. Die genarme Region befindet sich auf Xq25 und beinhaltet ebenfalls acht BACs

Hierbei konnte eine statistisch signifikant unterschiedliche Verteilung genreicher und genarmer Subregionen innerhalb des Zellkerns und innerhalb des Drumsticks festgestellt werden. Diese Daten sprechen für eine gendichteabhängige Polarität des Chromatins innerhalb des Drumsticks. Auch ist das inaktive X-Chromosom signifikant höher kompaktiert (1,7-fach) als das X-Chromosom, welches sich im Zellkern befindet.

In dem voran gegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass genreiche und genarme Subregionen innerhalb des Drumsticks unterschiedlich verteilt sind. Es wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, welches ebenfalls den Einfluss der Gendichte auf die radiale Anordnung von Chromatin im Drumstick untersuchte. Das humane X-Chromosom besitzt zwei RIDGEs einer befindet sich auf dem p-Arm (41-50 Mb) und einer auf dem q-Arm in der Nähe der Telomere. Die genarmen Regionen befinden sich in Xp (1-20Mb) und Xq (61-120 Mb).

In diesem Experiment konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung von RIDGE-Xp, RIDGE-Xq, Xp-genarm und Xq-genarm des inaktiven X-Chromosoms in Bezug zur Zellkernoberfläche des Drumsticks und des aktiven X-Chromosoms in Bezug zur Zellkernoberfläche festgestellt werden. Dies kann u.a. an der Zellfixierung liegen, d.h. an der Methanol-Eisessig-Fixierung, dem Auftropfen der Zellkerne auf Objektträger der Dehydrierung mit Alkohol und der anschließenden Lufttrocknung der Präparate (Hepperger et al., 2007).

## **A U S B L I C K**

Chaetocin ist durch die ungebundene –SH (Hauser et al., 1970) eine hoch reaktive Substanz, die Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Aminosäuren, Proteinen und Lipiden eingehen kann. In welche biologischen Regelkreise Chaetocin eingebunden ist, ist ein kompliziertes Thema. Das Spektrum an Schäden, die Chaetocin in einer lebenden Zelle ausüben kann, ist mehr als die Summe seiner Einzelteile, daher ist eine lineare Ursache – Wirkung - Beschreibung definitiv nicht möglich.

Chaetocin ist ein Substrat der Thioredoxin-Reductase-1 und hemmt verschiedene downstream regulierte Stoffwechselwege in Säugerzellen. Somit hat Chaetocin einen Einfluss auf den Gluthathion-Stoffwechsel, auf die DNS-Synthese sowie auf den antioxidativen Schutz der Zelle (Lu et al., 2007).

In dieser Dissertation wurde der Einfluss von Chaetocin auf die Organisation von Chromatin und die radialen Zellkernzonen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops bestens untersucht.

Jedoch könnten mit Hilfe des OMX-Mikroskops die Strukturen der Perichromatin-Region eines CICC, das massiv erweiterte Interchromatinkompartiment und auch das heterochromatisierte Cluster besser aufgelöst werden.

Im Folgenden soll noch ein Ausblick gegeben werden, was die Polarität von Chromatin beeinflussen kann und welche Chaetocin bedingten Veränderungen noch nicht untersucht wurden.

### **CICC Formation**

Die Ursachen einer Chromatin-Kompaktierung sind vielfältig. Sie werden unter anderem auch durch die Salzkonzentration im Zellkern beeinflusst. Eine hohe Konzentration von Ionen führt zu kondensiertem Chromatin (Albiez et al., 2006; Finch and Klug, 1976; Gerchman and Ramakrishnan, 1987; Hansen, 2002; Martin et al., 2007). Daher könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Chaetocin einen Einfluss auf den Ionenhaushalt des Zellkerns hat.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass eine Erschöpfung des ATP-Haushaltes eine Heterochromatisierung zur Folge hat (Lleres et al., 2009). Dies ist ein interessanter Aspekt, da Chaetocin einen pleiotrophen Einfluss auf Mitochondrien ausüben könnte und insbesondere deren Thioredoxin-Reductase-System-II (TrxRa) inhibieren kann. Eine Inhibierung des Thioredoxin-Reductase-I (TrxRa) in Hela Zellen wurde bereits beschrieben (Tibodeau et al., 2009).

### Einfluss von Chaetocin auf die DNS

In einem weiteren Projekt kann der Einfluss von Chaetocin auf die DNS untersucht werden. Wie bereits bekannt, schädigen freie Radikale die DNS (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Chaetocin verfügt über eine ungebundene S-S-Brücke und kann daher als Radikalbildner fungieren. Eine Reaktion von Chaetocin mit intrazellulärem Wasser und die dadurch entstehenden Sauerstoff- und Wasserstoffradikale sind denkbar.

Es ist bekannt, dass Pilze Substanzen synthetisieren, die bakteriozid wirken und daher als Antibiotika eingesetzt werden. Die antibiotische Wirkung ist vielfach beschrieben und gut charakterisiert. Dieses Wissen und die Methoden könnten genutzt werden, um zu klären, ob Chaetocin wie andere Antibiotika, beispielsweise in die DNS interkaliert, doppelsträngige DNS spaltet, komplementäre DNS-Stränge vernetzt, ob einfache und doppelte Strangbrüche entstehen oder Nukleotidbasen modifiziert werden.

Des Weiteren ist der Einfluss von Chaetocin auf die DNS bzw. eine „*DNS-Damage-Response*“ von Interesse. Um Antworten auf dies Fragen zu gewinnen ist eine IF mit Antikörper gegen die Proteine gamma-H2AX, 53BP1, MDC1 NBS1 MRE11, Rad17 durchzuführen und DNS-Strangbrüche nach Chaetocin Induktion könnten mit einem TUNEL-assay erkannt werden (Gavrieli et al., 1992).

### Einfluss von Chaetocin auf den LINC complex

bzw. Modifikationen der Zellkern-Membranproteine durch Chaetocin?

**LINC** complex ist die Abkürzung für *Linkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton* und beschreibt damit dessen die biologische Funktion. Der LINC Komplex ist eine physikalische Brücke zwischen dem Zellkern und dem Zytoskelett (Mejat and Misteli, 2009).

Von Bedeutung sind Lamin-assoziierte Proteine wie Emerin, Lamine A/C, SUN und Nesperin. Dem LINC Komplex werden zahlreiche Eigenschaften zugeschrieben, d.h. er wird für die Signaltransduktion benötigt (Muchir et al., 2009a; Muchir et al., 2009b), hat einen Einfluss auf die Genregulation, da er in der Lage ist Chromatin zu binden, und beeinflusst die Zellkernform sowie die Lage von Chromatin (Shimi et al., 2008).

Durch Chaetocin kommt es in humanen Fibroblasten zu einer Ablösung von Chromatin von der Lamina und zu einer Aufhebung der gendichteabhängigen Polarität von Chromatin. Daher könnte der Einfluss von Chaetocin auf Lamin-assoziierte, Heterochromatin-bindende Proteinen untersucht werden.

### **3D-Genom-Organisation von CICCs**

Die vorliegende Dissertation wurde in einem Labor für Zellkernarchitektur durchgeführt.

Daher ist die Polarität von Chromatin in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung in Bezug zum Zellkernrand, zum CT und zu CICC mit vielen, unabhängigen Experimenten bestens untersucht.

Frühreplizierende, genreiche DNS befindet sich überwiegend außerhalb der CICC, dies konnten in der vorliegenden Arbeit durch eine Hybridisierung mit *Alu*-Sonden gezeigt werden.

Um die vorhandenen Ergebnisse weiter zu festigen, könnte früh- mittel- und spät-replizierende DNS in Bezug zu CICC und zum Zellkernrand untersucht werden. Das kann durch 3D-FISH-Experimente mit humanen Isochoren (Saccone and Bernardi, 2001) durchgeführt werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann antizipiert werden, dass sich spät-replizierendes Chromatin (*LINES*) im „Herzen“ des CICC befindet, gefolgt von mittel-replizierendem Chromatin.

Die Lage von aktiven und inaktiven Genen in Bezug zu CICC wurde in dieser Dissertation nicht untersucht. Hierzu gibt es vielfältige Variationen der Projektplanung.

Chaetocin führt zur Heterochromatisierung und zum Zellzyklusarrest. Es kann die 3D-Topologie von Genen (BAC-Pools) untersucht werden, welche für Heterochromatisierung zuständig sind, beispielsweise HP1 (heterochromatisches Protein 1) und Su(var)-3-4 und diese in Korrelation zu inaktiven Genen wie S-Phasenproteine, Cykline, pKi67 und PCNA gesetzt werden. Mit diesem Experiment könnte geklärt werden, ob sich aktive Gene (z.B. SA- $\beta$ -Gal) an der CICC Oberfläche und inaktive Gene (z.B. pKi67) im Inneren eines CICC befinden.

### **3D-Genomorganisation in Kernmorphologien mit hyperkondensiertem Chromatin**

Generell ist es weiterhin interessant, die Polarität von Chromatin in heterochromatisierten Zellen mit großen Chromatin-Clustern zu untersuchen.

Hierzu wurde bereits ein Ansatz von Frau Dipl. Biologin Klement Karolin gestartet. Sie verwendete von mir hergestellte Hybmixe für die Chromosomen #18, #19, *Alu*-Sequenzen und stellte HybMixe für die subchromosomalen genreichen und genarmen BAC-Pools für die Chromosomen #1 und 12# her. Sie lernte die Methoden der 3D-FISH um diese an SAHFs durch zu führen.

Interessant wäre auch die 3D-Genom-Organisation von aktiven bzw. inaktiven Gene in der Seneszenz zu untersuchen und wie sich diese Gene in Abhängigkeit ihrer Expression in Bezug zu SAHFs bzw. zum Zellkernrand anordnen. Denkbar wäre hier ein 3D-FISH Experiment mit BAC-Pools für aktive Genen, wie die  $\beta$ -Galatosidase, p16 (INK4A), p21, p53 und ein weiterer BAC-Pool für Gene, die durch die eben genannten Proteine herunter-reguliert sind, z.B. S-Phasen Proteine (Lanigan et al., 2011).

## **ZUSAMMENFASSUNG**

In der Genomregulation und Genexpression spielt die räumliche Anordnung von DNS eine wichtige Rolle. Verschiedene Aspekte der Chromatin-Organisation wurden in den letzten Jahrzehnten untersucht und allgemein gültige Regeln aufgestellt.

In der Arbeitsgruppe von Thomas Cremer stehen zahlreiche, bereits etablierte DNS-Sonden zur Verfügung, um Modelle der Zellkernarchitektur zu untersuchen. Diese wurden in humanen Fibroblasten nach Chaetocin-Induktion und in unbehandelten Fibroblasten verwendet.

Dadurch konnten bereits bestehende Modelle der Chromatin-Verteilung in Kontroll-Fibroblasten erneut bestätigt und die durch Chaetocin induzierten massiven Veränderungen eingehend untersucht werden.

CICC ist die Abkürzung für ***Chaetocin Induced Chromatin Condensation/Clustering***.

Außerdem wurden die DNS-Sonden in humanen Granulozyten, einem weiteren Zelltyp mit interessanter Zellkernmorphologie, getestet und auch dort konnten die bereits bekannten Modelle der gendichteabhängigen Chromatin-Verteilungen bestätigt werden.

### **1. Chaetocin-induzierte Veränderungen der Zellkernarchitektur**

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit der Frage, welchen Einfluss Chaetocin auf die Zellphysiologie und Zellkernarchitektur von humanen Fibroblasten hat.

Chaetocin führt zur Heterochromatisierung und zur Chromatin-Kondensation. Eine Chromatin-Kondensation kann verschiedene Ursachen haben. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit CICC vital sind und Parallelen zur Seneszenz zeigen, jedoch stellt der CICC-Phänotyp eine eigene, spektakuläre, reproduzierbare Zellkernarchitektur dar.

Die Wirkung von Chaetocin kann durch GSH, GSH-EE und N-Acetyl-Cystein unterbunden werden. Dies spricht für eine Erschöpfung des Glutathion-Vorrates während der Chaetocin Behandlung und dafür, dass oxidiertes Chaetocin zu einer Heterochromatisierung führt.

Mit den Methoden der 3D-FISH und der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass sich das Chromatin nicht willkürlich oder zufällig verändert, sondern es kommt zu einem reproduzierbaren, einzigartigen Chromatin-Arrangement auf der Ebene der einzelnen Chromosomen, die mit der Aufhebung der konventionellen Zellkernarchitektur einhergeht.

Chaetocin führt zur Heterochromatisierung und beeinflusst die räumliche Organisation von Chromatin im Zellkern. Bei einem CICC handelt es sich meist um ein ganzes Chromosomen-Territorium, in dem sich das Chromosom neu organisiert. Im Inneren eines CICC wird das fein verzweigte Interchromatin-Kompartiment und die Perichromatin-Region verdrängt. Das

Chromosom stülpt seine genreichen, transkriptionell aktiven Regionen nach außen, die dem Interchromatin-Kompartiment zugewandten Seiten und die genarmen, transkriptionell inaktiven Regionen werden in das CICC hinein verlagert. Innerhalb eines CICC entsteht ein statistisch signifikanter, gendichteabhängiger Chromatin-Gradient. Dieser Chromatin-Gradient konnte auch durch Immunfluoreszenz-Experimente mit Antikörpern gegen Eu- und Heterochromatin bestätigt werden. Nach einer Chaetocin-Behandlung entstehen neue, funktionelle, radiale Zonen, indem sich das Interchromatin-Kompartiment um das heterochromatisierte Chromosomen-Territorium organisiert. Das perinukleäre Heterochromatin befindet sich nun im Inneren der CICC und verdrängt das feine Netzwerk, welches für gewöhnlich das Chromosom durchzieht.

Die Perichromatin-Region befindet sich ausschließlich an der Oberfläche der Territorien. Dort konnten RNS-Synthese, die aktive Polymerase II, Splicing Speckles, Nukleoli und aktives Chromatin (H4K8ac) nachgewiesen werden.

Dadurch ist das CICC-System ein attraktives Modell, um das Interchromatin-Kompartiment, die Perichromatin-Region, aktive Chromatin-Fibern und die Transkription an der Oberfläche von Territorien zu untersuchen.

## 2. Chromatin-Organisation in humanen Granulozyten

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Polarität von Chromatin in weiblichen, segmentierten, unstimulierten humanen Granulozyten.

Wie bereits bekannt, konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Granulozyten aus dem peripheren Blut einer gesunden Spenderin pKi67 negativ sind und sehr wenig RNS produzieren. Granulozyten-Zellkerne zeigen in der DAPI-Färbung stark kondensierte DNS am Zellkernrand und einen nicht mit DAPI gefärbten Raum im Zentrum eines Zellkernsegmentes. In diesem DAPI-freien Raum reichern sich aktives Chromatin (H4K8ac) und GC-reiche DNS an.

Nachdem Granulozyten-Zellkerne transkriptionell überwiegend inaktiv sind, musste bei FISH-Experimenten der Parameter Expressionsstärke nicht berücksichtigt werden. Mit bereits etablierten DNS-Sonden für die Chromosomen #1 und #12 konnte in segmentierten, unstimulierten Granulozyten-Zellkernen eine gendichteabhängige Chromatin-anordnung gezeigt werden.

Wie bereits bekannt, befindet sich das inaktive X-Chromosom in neutrophilen Granulozyten u.a. im Drumstick. Jedoch ist nicht jedes inaktives X-Chromosom als Drumstick organisiert.

Die Drumstick-Bildung hängt von der Fixierungsmethode ab. Zellkerne, die mit 4%PFA in 1xPBS fixiert wurden, zeigen keinen Drumstick. Werden sie jedoch mit Methanol / Eisessig (3:1) fixiert und aufgetropft, können zahlreiche Drumsticks beobachtet werden.

Es gibt eine Korrelation zwischen der Anzahl der Kernsegmente und der Drumstick-Häufigkeit. Je stärker der Zellkern segmentiert ist, desto höher ist die Drumstick-Frequenz und desto häufiger kam es zur räumlichen Trennung der X-Chromosomen.

Außerdem wurde die Organisation von Chromatin im Drumstick (= inaktives X-Chromosom) mit DNS-Sonden untersucht. Hierbei konnte ein signifikant unterschiedlicher Kompaktierungsgrad von Chromatin zwischen dem aktiven und inaktiven X-Chromosom festgestellt werden.

Die Beurteilung einer gendichteabhängigen Chromatin-Polarität im Drumstick gestaltet sich schwierig. Mit einem Experiment konnte im Drumstick eine GC- und AT-abhängige Chromatin-Anordnung bestätigt werden und in einem weiteren Experiment waren genreiche und genarme Subregionen im Drumstick gleich verteilt. In beiden Experimenten wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und nach anschließender MAA-Fixierung nach der Methode von Deng et al. (2003) aufgetropft. Dieses Vorgehen hat zwar den Vorteil, dass die Drumsticks gut dargestellt werden, aber den Nachteil, dass es zu einer starken Abflachung des Zellkerns und damit auch zu Veränderungen der fragilen Drumstick-Architektur kommt.

## ANHANG

### Interne BAC-Liste des X-Chromosoms

Die BAC –Pools, die für das Experiment 4.4.2.1 verwendet wurden.

	P1	P2	P3	P4
	1	50	120	204
2	53	122	207	
4	55	124	211	
6	58	125	213	
8	61	127	215	
9	63	130	217	
11	65	132	219	
14	68	135	333	
15	70	138	222	
16	72	140	226	
19	74	181	229	
76	85	274	230	
24	88	276	233	
26	91	279	235	
77	93	281	237	
29	95	283	151	
31	98	285	154	
80	100	288	155	
82	105	291	159	
34	107	284	162	
36	178	298	164	
38	179	300	167	
40	112	302	170	
43	114	304	173	
45	117	306	176	
47	118	308	242	
49	119	312	244	
Interne BAC ID-Nummer		315	245	
		317	248	
		319	251	
		321	253	
		146	255	
		323	258	
		326	261	
		328	262	
		147	264	
		186	265	
		149	267	
		322	268	
		189	270	
		192	271	
		194	272	
		196	273	
		199		
		202		

Die BAC –Pools, die für das Experiment 4.4.2.2 verwendet wurden.

Interne BAC ID-Nummer	Genarm-Tail	RIDGE Xp	Genarm-Mitte		RIDGE Xq
	1		88	105	291
2		89	107	294	264
4		90	178	298	265
6		91	179	300	266
8		92	112	302	267
9		93	114	304	268
11		94	117	306	269
14		95	118	308	270
15		96	119	312	271
16		97	120	315	272
19		98	122	317	273
76		99	124	319	
24		100	125	321	
26		101	127	146	
77		102	130	323	
29		103	132	326	
31		104	135	328	
80		105	138	147	
		106	140	186	
		107	181	149	
		108	274	332	
		178	276	189	
			279	192	
			281	194	
			283	196	
			285	199	
			288	201	

Die BAC –Pools, die für das Experiment 4.4.2.3 verwendet wurden.

Interne BAC ID-Nummer	Xp11	Xq25
	93	
94		228
95		229
96		230
97		231
98		233
99		234
100		235

## Verwendete Zell-Linien

name		Origin and description	provider	Maximal dosis compatible with undisturbed chromatin texture and proliferation		
adherent cells	CICC no Tumor	HFb (G0 and cycling)	human primary fibroblasts of a skin biopsy from a young female	Klinikum Amsterdam, Niederlande	0.01 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		MRC5-SV	SV-40 immortalized human fibroblasts	M. Luijsterburg, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, NL	0.02 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		BJ1	hTERTcompetent immortalized human skin fibroblasts	Clontech Inc. , USA	0.02 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		HGPS-Fb	Cells from a female HUTCHINSON-GILFORD PROGERIA SYNDROME; HGPS patient	Coriell Institute for Medical Research (AG11513)	0.01 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		HFB H1	human fibroblasts with small accessory chromosome (SAC)	I. Solovei Univ. Munich (LMU), Germany	0.02 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		RPE1 Retina Pigment Epithel	transgene Zell-Linie Mit Telomerase Plasmid	Clon Tec	0.02 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		AMF	Amniotic fluid cells	Marion Cremer, Univ. Munich (LMU), Germany	0.03 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		orangutan fibroblast	orangutan fibroblast	Stefan Müller, Univ. Munich (LMU), Germany	0.01 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ CICC)	
		Hepatocyte		I. Solovei Univ. Munich (LMU), Germany	0.06 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ 2% CICC)	
		no CICC conformation Tumor	HT1080	Fibrosarcoma cell line	A. Nemeth, Univ. Regensburg, Germany	$\sim$ 0.04 $\mu$ M( $\Rightarrow$ cell death)
			HEK 293T	Human Embryonic Kidney 293 cells	Christian Schiller, Univ. Munich (LMU), Germany	$\sim$ 0.1 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ no CICC)
			DLD-1	colon cancer derived cell line	John Hopkins Hospital, Baltimore, MD	$\sim$ 0.2 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ cell death)
			MCF-7	breast cancer derived cell line	NIH, Bethesda, MD	$\sim$ 0.2 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ cell death)
			HeLa-H2B-GFP	Cervix carcinoma derived cell line	K. Sullivan, Scripps Institute, L Jolla, California	$>$ 1 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ cell death)
			SH-EP N14	neuroblastoma line	Robert A. Ross Univ. Fordham	0.05 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ no CICC)
			Astrocyten		I. Solovei Univ. Munich (LMU), Germany	0.06 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ no CICC)
		Melanom		I. Solovei Univ. Munich (LMU), Germany	0.06 $\mu$ M ( $\Rightarrow$ no CICC)	

hämatopoetic cells	no CICC conformation	PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells unstimulated human lymphocytes	Healthy female donor	~ 0.05 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		T-Zells	stimulated (Phytohämagglutinin) human lymphocytes from peripheral blood	Healthy female donor	~ 0.05 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		RPMI 8226	Myeloma cell line	DSMZ, Germany (Acc no. 402)	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		K562 cells	chronic myelogenous leukaemia cell line CML	Christian Schiller, Univ. Munich (LMU), Germany	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		DG75	EBV-immortalized human lymphoblastoid cell line	S. Bohlander, GSF, Munich	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		HL60	Human promyelocytic leukemia cells unstimulated	DKFZ Univ. Heidelberg	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		HL60	Human promyelocytic leukemia cells stimulated (retin-acid)	DKFZ Univ. Heidelberg	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)
		Jurkat	T cell leukemia	Dr Peter Sommer	~ 0.04 $\mu\text{M}$ ( $\Rightarrow$ cell death)

### Beispiel für eine eADS-Parametadatei

```
path_to_the_image_stacks==> C:\_Ganulozyten\#12\Eingabe\  
path_to_save_data==> C:\_Ganulozyten\#12\Ergebnis\  
number_of_samples/nuclei==> 10  
x_voxel_dimension==> 50,50,50,50,50,50,50,50,50,50  
y_voxel_dimension==> 50,50,50,50,50,50,50,50,50,50  
z_voxel_dimension==> 200,200,200,200,200,200,200,200,200,200  
shell_threshold==> 0  
shell_thickness==> 1  
object_threshold==> 4,4,4,4,4,4,4,4,4,4  
number_of_signal_channels==> 3  
threshold_for_channel1==> 50,50,50,50,50,50,50,50,50,50  
threshold_for_channel2==> 24,20,14,28,32,4,33,43,34,12  
threshold_for_channel3==> 34,22,26,28,34,8,33,43,34,14  
threshold_for_channel4==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
threshold_for_channel5==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
threshold_for_channel6==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
threshold_for_reference==> 26,21,14,28,32,4,33,43,36,12  
x_axis_grading==> 200  
shell_scale_proofing==> 0  
prefix_for_channel_and_reference==> Result of b_,g_,o_,no,no,no,b_  
suffix_for_channel_and_reference==> .tif,.tif,.tif,.tif,.tif,.tif  
no_of_first_sample==> 1
```

### Beispiel für eine Distangles-Parametadatei

```
pfad_zu_den_bildern==> D:\DistAngels\Eingabe\  
speicherpfad==> D:\DistAngels\Ergebnis\  
kern_bilder_anzahl==> 10  
weite_des_x_pixels==> 50  
weite_des_y_pixels==> 50  
weite_des_z_pixels==> 200,  
objekt_threshold==> 1  
channelcount==> 4  
threshold_für_kanal1==> 45,32,22,23,43,51,38,28,25,29  
threshold_für_kanal2==> 48,32,28,23,46,51,38,28,44,23  
threshold_für_kanal3==> 45,36,26,23,43,51,38,28,25,44  
threshold_für_kanal4==> 44,36,26,26,47,52,34,22,22,29  
threshold_für_kanal5==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
threshold_für_kanal6==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
threshold_für_Referenz==> 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0  
Skalierung_für_X-Achse_in_nm==> 0.1  
Praefix_fuer_kanaele==> g_,o_,r_,f_,no,no  
Suffix_fuer_kanaele==> .tif,.tif,.tif,.tif,.tif,.tif  
start_kern==> 1  
fill_holes==> 0  
conn_neigh==> 0  
neighbours==> 26
```

---

## Abbildungsverzeichnis:

### Einleitung

- Abb. 1: humane Chromosomen der Augenhornhaut
- Abb. 2: Muntjak-Karyogramme
- Abb. 3: *Alu*-Sequenzen in einer weiblichen, humanen Metaphase
- Abb. 4: Modell der Chromatinfaltung
- Abb. 5: Polymer-melt Konzept
- Abb. 6: Modelle der Zellkernarchitektur
- Abb. 7: neutrophile Granulozyten
- Abb. 8: CT-IC- Modell
- Abb. 9: Zellkernorganisation in 2D-*in-vitro*-Zellkulturen
- Abb. 10: 3D-M-FISH eines menschlichen Fibroblasten Zellkerns
- Abb. 11: Barr-Körperchen
- Abb. 12: Signal aktivierte Seneszenz
- Abb. 13: molekulare Mechanismen zellulärer Seneszenz
- Abb. 14: Struktur von Chaetocin
- Abb. 15: Effekte von Chaetocin auf den Trx/Trx1 Stoffwechselweg
- Abb. 16: Thioredoxin Reductase- und Glutathion-Stoffwechselwege
- Abb. 17: Histologie verschiedener Granulozyten
- Abb. 18:  $\beta$ -Galaktosidase Test

### Ergebnisse Chaetocin:

- Abb. 19: Hypothetischer Verlauf der Clusterbildung und Klassifizierung der CICC's
- Abb. 20: Chromatin Volumen
- Abb. 21: 7-AAD-Lebend-Färbung
- Abb. 22: IF Cleaved-caspase-3
- Abb. 23: CICC-Phänotyp und Zell-Vitalität
- Abb. 24: Gesamtzellprojektionen von Myelomzellen (RPMI 8226)  
nach Chaetocin Behandlung
- Abb. 25: Chromatin-Stadien
- Abb. 26 A-C: Zellzyklusmarker in Kombination mit verschiedenen Chromatin-Phänotypen
- Abb. 26 D: Zellkern-Phänotyp eines humanen Fibroblasten nach L-Suthionine Sulfoxim  
Inkubation
- Abb. 27: DCF FACS-Analyse
- Abb. 28: optische Struktur des Zytoplasmas von unbehandelten Zellen vs.  
Chaetocin behandelten Zellen

- Abb. 29: Lipofuchsin-Anreicherung in der Positivkontrolle
- Abb. 30: IF Färbung mit p53
- Abb. 31: Western Blot p16, p21, p53
- Abb. 32 : Phasenkontrastbilder nach einer SA- $\beta$ -Gal (pH6) Färbung
- Abb. 33: Excel-Graphen über die Frequenz der SA- $\beta$ -Gal (pH6) positiven Zellen
- Abb. 34: Erhalt von Chromosomen-Territorien; 3D-FISH #7, #8, #10, #17
- Abb. 35: Radiale Verteilung neu gebildeter RNS und H4K8ac
- Abb. 36: Radiale Verteilung von SC35, H3K9me3 und der aktiven Polymerase II
- Abb. 37: 3D-Topologie von SC35 und H3K27me3 in Bezug zur CICC-Oberfläche
- Abb. 38: Diagramm der radialen Verteilung von H4K8ac und H3K9me3 in humanen Fibroblasten nach Chaetocin Induktion in Bezug zur CICC-Oberfläche
- Abb. 39: 3D-Topologie von Zentromeren und Telomeren nach Chaetocin Induktion
- Abb. 40: DNS-Sonden für die Chromosomen 18, 19 und humane *Alu*-Sequenzen
- Abb. 41: eADS-Graphen von den Chromosomen 18, 19 und *Alu*-Sequenzen in Bezug zur Zellkernoberfläche
- Abb. 42: eADS-Graphen von den Chromosomen 18, 19 und *Alu*-Sequenzen in Bezug zur CICC-Oberfläche im Zellkern humaner Fibroblasten
- Abb. 43: Idiogramm des X-Chromosoms und eine 2D-Metaphase mit der genreichen Subregion Xp11 (in grün) und der genarmen Subregion Xq25 (in rot)
- Abb. 44: Radiale Verteilung von Xp11 und Xq25 in humanen Fibroblasten
- Abb. 45: Radiale Verteilung von Xp11 und Xq25 in humanen Fibroblasten Nach einer Chaetocin-Behandlung
- Abb. 46: 2D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1
- Abb. 47: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 in humanen Kontroll-Fibroblasten
- Abb. 48: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 humanen Fibroblasten nach Chaetocin Behandlung
- Abb. 49: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 1 in humanen Fibroblasten nach Chaetocin Behandlung
- Abb. 50: genreiche und genarme BAC-Pools von Chromosom 12
- Abb. 51: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Kontroll-Fibroblasten
- Abb. 52: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Fibroblasten nach Chaetocin Behandlung
- Abb. 53: Radiale Verteilung von genreichen und genarmen Subregionen von Chromosom 12 in Fibroblasten nach Chaetocin-Behandlung mit CICC II Chromatin

### Ergebnisse von Granulozyten

- Abb. 54: RGB-Projektion von zwei RPE1-Fibroblasten und einem Granulozyten nach pKi67- und RNS- Färbung
- Abb. 55: Montage von zwei Fibroblasten und einem Granulozyten nach pKi67- und RNS- Färbung
- Abb. 56: Montage eines humanen, unstimulierten und segmentierten Granulozyten mit einer Antikörperfärbung für H4K8ac
- Abb. 57: eADS-Kurve der radialen Verteilung von H4K8ac in Bezug zu DAPI in humanen, unstimulierten, lobulierten Granulozyten
- Abb. 58: eADS-Kurve der radialen Verteilung von H4K8ac und DAPI in humanen, unstimulierten, lobulierten, Granulozyten in Bezug zur Zellkernoberfläche
- Abb. 59: 2 mittlere Z-Projektionen ( $\Sigma=400\text{nm}$ ) von vier humanen Granulozyten nach 7-AAD- und DAPI-Färbung
- Abb. 60: radiale Verteilung von 7-AAD und DAPI in Bezug zur Zellkernoberfläche
- Abb. 61: 2D-FISH und 3D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1
- Abb. 62:A: Kurve der radialen Verteilung genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 1 in Bezug auf den Zellkernrand in humanen Granulozyten  
B: Kurve der radialen Verteilung genreicher und genamer BAC-Pools in Bezug zur CT-1 Oberfläche in humanen Granulozyten
- Abb. 63: 2D-FISH und 3D-FISH genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 12
- Abb. 63: A: Kurve der radialen Verteilung genreicher und genarmer BAC-Pools von Chromosom 12 in Bezug auf den Zellkernrand in humanen Granulozyten  
B: Kurve der radialen Verteilung genreicher und genamer BAC-Pools in Bezug zur CT-12 Oberfläche in humanen Granulozyten
- Abb. 64: Excel-Graph über die Frequenz der Drumstick Bildung und die Verteilung des X-Chromsoms im Zellkern von Granulozyten
- Abb. 65: 2D-FISH und 3D-FISH mit den BAC-Pools P1, P2, P3, P4 vom X-Chromosom
- Abb. 66: Radiale Verteilung der BAC-Pools 1,2,3,4 des inaktiven X-Chromosoms im Drumstick von humanen Granulozyten
- Abb. 67: Radiale Verteilung der BAC-Pools 1,2,3 und 4 des inaktiven X-Chromosoms im Zellkern von humanen Granulozyten
- Abb. 68: DNS Kompaktierung des X-Chromosoms

Abb. 69: 2D-FISH und 3D-FISH mit genreichen und genarmen BAC-Pools;  
Xp-genarm, Xp-RIDGE, Xq-genarm, Xq-RIDGE

Abb. 70: Kurve der radialen Verteilung von RIDGE-Xp, RIDGE-Xq,  
Xp-genarm und Xq-genarm im Zellkern

Abb. 71: Kurve radialer Verteilung von RIDGE-Xp, RIDGE-Xq, Xp-genarm  
und Xq-genreich im Drumstick

Abb. 72: Verteilung der einzelnen Distanzen zwischen den Intensity Gravity Centren  
des aktiven (grün) und inaktiven (rot) X-Chromosoms

Abb. 73: 2D-FISH und 3D-FISH der Regionen Xp11 und Xq25

Abb. 74: Kurve der radialen Verteilung von Xp11 und Xq25  
im Zellkern von humanen Granulozyten

Abb. 75: Kurve der radialen Verteilung Xp11 und Xq25 im Drumstick von humanen Granulozyten

Abb. 76: Stadien der Heterochromatisierung

Abb. 77: Chromatin Kondensation in humanen Fibroblasten (Anhang)

Tabellenverzeichnis:

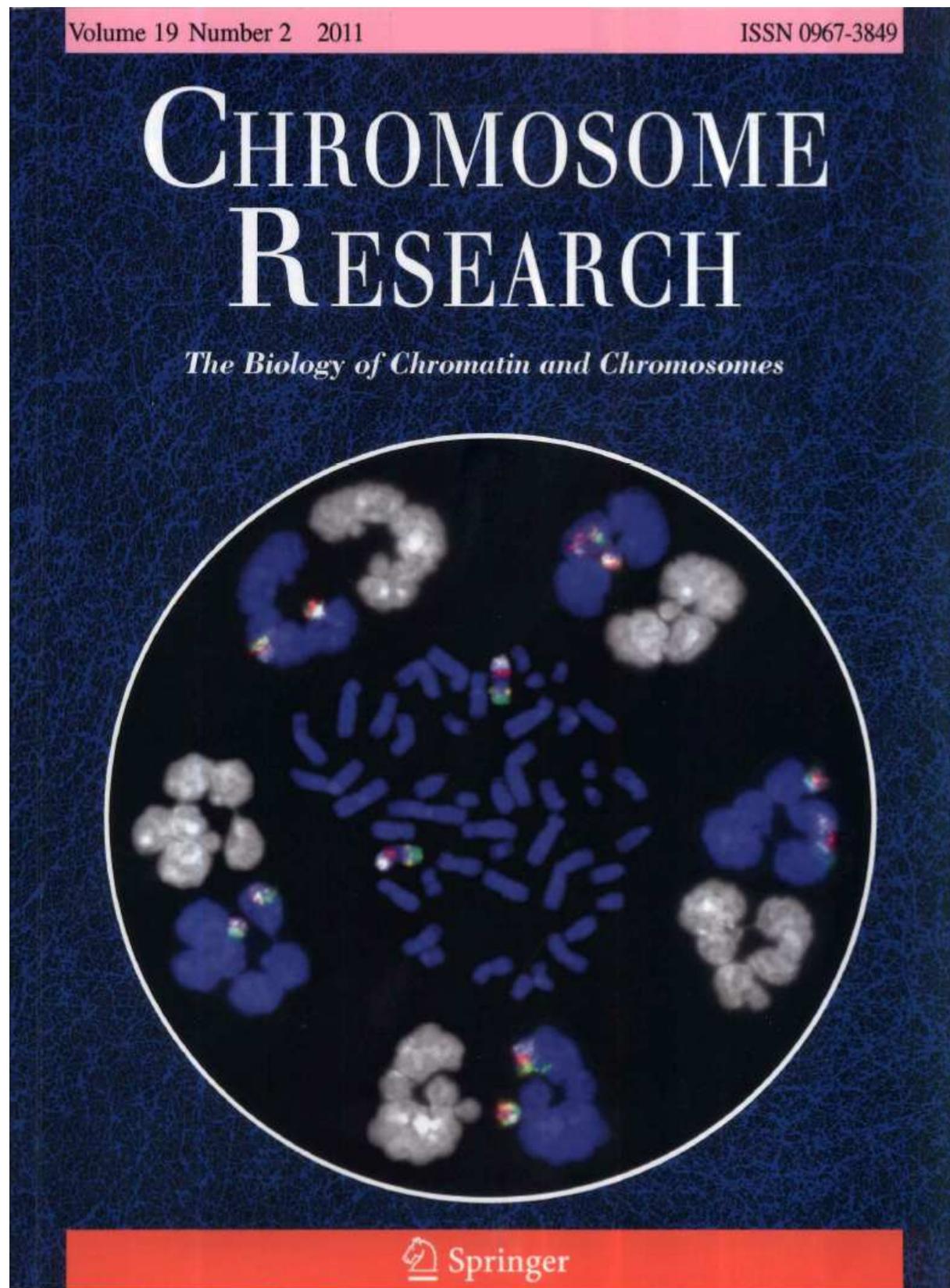
Tabelle 1: Epigenetische Modifikationen – ein Überblick

Tabelle 2: Verteilung der BAC-Sonden auf dem X-Chromosom

Tabelle 3: Effekte von Antioxidantien und Enzyminhibitoren

Tabelle 4: Übersicht über die Frequenz der gezählten Zellen

Front cover Chromosome Research



Chromatin-Kondensation in humanen Fibroblasten

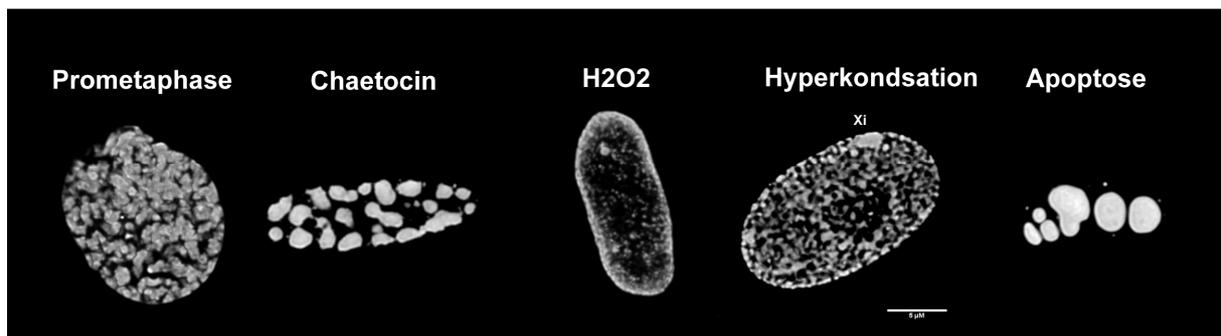


Abb. 77: Chromatin-Kondensation in humanen Fibroblasten

Literaturverzeichnis

- Agarwal, S., and R.S. Sohal. 1996. Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging, and maximum life span potential of different species. *Exp Gerontol.* 31:365-72.
- Alberts. 2011. *Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH*
- Albiez, H., M. Cremer, C. Tiberi, L. Vecchio, L. Schermelleh, S. Dittrich, K. Kupper, B. Joffe, T. Thormeyer, J. von Hase, S. Yang, K. Rohr, H. Leonhardt, I. Solovei, C. Cremer, S. Fakan, and T. Cremer. 2006. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res.* 14:707-33.
- Bacher, C.P., M. Guggiari, B. Brors, S. Augui, P. Clerc, P. Avner, R. Eils, and E. Heard. 2006. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat Cell Biol.* 8:293-9.
- 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.* 163:676.
- Bartova, E., and S. Kozubek. 2006. Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies. *Biol Cell.* 98:323-36.
- Bartova, E., S. Kozubek, P. Jirsova, M. Kozubek, E. Lukasova, M. Skalnikova, A. Cafourkova, I. Koutna, and R. Pasekova. 2001. Higher-order chromatin structure of human granulocytes. *Chromosoma.* 110:360-70.
- Baumberger, N., and D.C. Baulcombe. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11928-33.
- Bemiller, PM., Lee, LH., 1978. Nucleolar changes in senescing WI-38 cells. *Mech Ageing Dev.* 8(6):417-27.
- Ben-Porath, I., and R.A. Weinberg. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:961-76.
- Berchtold, D., S. Fesser, G. Bachmann, A. Kaiser, J.C. Eilert, F. Frohns, N. Sadoni, J. Muck, E. Kremmer, D. Eick, P.G. Layer, and D. Zink. 2011. Nuclei of chicken neurons in tissues and three-dimensional cell cultures are organized into distinct radial zones. *Chromosome Res.* 19:165-82.
- Berezney, R., and X. Wei. 1998. The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:238-42.
- Biaglow JE and Miller RA. 2005. The thioredoxin reductase-thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Can Biol Ther* 4: 6–13.
- Bolzer, A., G. Kreth, I. Solovei, D. Koehler, K. Saracoglu, C. Fauth, S. Muller, R. Eils, C. Cremer, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3:e157.
- Borregaard, N., and J.B. Cowland. 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89:3503-21.
- Boveri, T. 1888. "Zellen-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von Ascaris Megalocephala." *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft.* (22):685-882.
- Boveri, T. 1909. "Die Blastomerenkerne von Ascaris megalcephala und die Theorie der Chromosomenindividualität." *Archiv für Zellforschung.* 3:181-286.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532-5.
- Brunk, U.T., and A. Terman. 2002. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 269:1996-2002.
- by K Murphy, P.T., Mark Walport. 2009. Janeway Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag HeidelbergBerlinOxford.* 7 Auflage

- Campisi, J. and di Fagana, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *molecular cell biology*.
- Caplen, N.J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R.A. Morgan. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:9742-7.
- Carey, J.W., E.Y. Pinarci, S. Penugonda, H. Karacal, and N. Ercal. 2010. In vivo inhibition of l-buthionine-(S,R)-sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, N-acetylcysteine amide. *Free Radic Biol Med*. 50:722-9.
- Caron, H., B. van Schaik, M. van der Mee, F. Baas, G. Riggins, P. van Sluis, M.C. Hermus, R. van Asperen, K. Boon, P.A. Voute, S. Heisterkamp, A. van Kampen, and R. Versteeg. 2001. The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science*. 291:1289-92.
- Ceuppens, J.L., M.L. Baroja, K. Lorre, J. Van Damme, and A. Billiau. 1988. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol*. 141:3868-74.
- Chambeyron, S., N.R. Da Silva, K.A. Lawson, and W.A. Bickmore. 2005. Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. *Development*. 132:2215-23.
- Chan, K.M., H. Zhang, L. Malureanu, J. van Deursen, and Z. Zhang. 2011. Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:16699-704.
- Chaudhuri, J., and F.W. Alt. 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*. 4:541-52.
- Clemson, C.M., L.L. Hall, M. Byron, J. McNeil, and J.B. Lawrence. 2006. The X chromosome is organized into a gene-rich outer rim and an internal core containing silenced nongenic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:7688-93.
- Craig, J.M. 2005. Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays*. 27:17-28.
- Cremer, M., F. Grasser, C. Lanctot, S. Muller, M. Neusser, R. Zinner, I. Solovei, and T. Cremer. 2008. Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol*. 463:205-39.
- Cremer, M., K. Kupper, B. Wagler, L. Wizelman, J. von Hase, Y. Weiland, L. Kreja, J. Diebold, M.R. Speicher, and T. Cremer. 2003. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol*. 162:809-20.
- Cremer, M., J. von Hase, T. Volm, A. Brero, G. Kreth, J. Walter, C. Fischer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2001. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*. 9:541-67.
- Cremer, T. 1985. Von der Zellenlehre zu Chromosomentheorie. *Springer Verlag*.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2:292-301.
- Cremer, T., and M. Cremer. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2:a003889.
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Muller, I. Solovei, and S. Fakan. 2006. Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*. 18:307-16.
- Cremer, T., G. Kreth, H. Koester, R.H. Fink, R. Heintzmann, M. Cremer, I. Solovei, D. Zink, and C. Cremer. 2000. Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 10:179-212.
- Cremer, T., K. Küpper, S. Dietzel, and S. Fakan. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell*. 96:555-67.
- Crissman, H.A., and G.T. Hirons. 1994. Staining of DNA in live and fixed cells. *Methods Cell Biol*. 41:195-209.
- Cristofalo, V.J. 2005. SA beta Gal staining: biomarker or delusion. *Exp Gerontol*. 40:836-8.
- Croft, J.A., J.M. Bridger, S. Boyle, P. Perry, P. Teague, and W.A. Bickmore. 1999. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol*. 145:1119-31.

- Cuzzocrea, S., B. Zingarelli, M. O'Connor, A.L. Salzman, and C. Szabo. 1998. Effect of L-buthionine-(S,R)-sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite- and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br J Pharmacol.* 123:525-37.
- Dean, F.B., J.R. Nelson, T.L. Giesler, and R.S. Lasken. 2001. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.* 11:1095-9.
- Dechat, T., K. Pflieger, K. Sengupta, T. Shimi, D.K. Shumaker, L. Solimando, and R.D. Goldman. 2008. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22:832-53.
- Dehghani, H., G. Dellaire, and D.P. Bazett-Jones. 2005. Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. *Micron.* 36:95-108.
- Deiningner, M.W., S. Bose, J. Gora-Tybor, X.H. Yan, J.M. Goldman, and J.V. Melo. 1998. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 58:421-5.
- Dekker, J. 2008. Mapping in vivo chromatin interactions in yeast suggests an extended chromatin fiber with regional variation in compaction. *J Biol Chem.* 283:34532-40.
- Deng, W., S.W. Tsao, J.N. Lucas, C.S. Leung, and A.L. Cheung. 2003. A new method for improving metaphase chromosome spreading. *Cytometry A.* 51:46-51.
- Deniaud, E., and W.A. Bickmore. 2009. Transcription and the nuclear periphery: edge of darkness? *Curr Opin Genet Dev.* 19:187-91.
- Dewannieux, M., and T. Heidmann. 2005. LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet Genome Res.* 110:35-48.
- Dietzel, S., A. Jauch, D. Kienle, G. Qu, H. Holtgreve-Grez, R. Eils, C. Munkel, M. Bittner, P.S. Meltzer, J.M. Trent, and T. Cremer. 1998. Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chromosome Res.* 6:25-33.
- Dietzel, S., K. Schiebel, G. Little, P. Edelmann, G.A. Rappold, R. Eils, C. Cremer, and T. Cremer. 1999. The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. *Exp Cell Res.* 252:363-75.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9363-7.
- Dorigo, B., T. Schalch, A. Kulangara, S. Duda, R.R. Schroeder, and T.J. Richmond. 2004. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science.* 306:1571-3.
- Dundr, M., J.K. Ospina, M.H. Sung, S. John, M. Upender, T. Ried, G.L. Hager, and A.G. Matera. 2007. Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo. *J Cell Biol.* 179:1095-103.
- Efroni, S., R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D.J. Hoepfner, C. Dash, D.P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R.D. McKay, K.H. Buetow, T.R. Gingeras, T. Misteli, and E. Meshorer. 2008. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2:437-47.
- Eldred, G.E., G.V. Miller, W.S. Stark, and L. Feeney-Burns. 1982. Lipofuscin: resolution of discrepant fluorescence data. *Science.* 216:757-9.
- Elliott, B., and M. Jasin. 2002. Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 59:373-85.
- Eltsov, M., K.M. Maclellan, K. Maeshima, A.S. Frangakis, and J. Dubochet. 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:19732-7.
- Eriksson, M. et al. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-8.
- Fakan, S., and R. van Driel. 2007. The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. *Semin Cell Dev Biol.* 18:676-81.
- Fan, Y., T. Nikitina, J. Zhao, T.J. Fleury, R. Bhattacharyya, E.E. Bouhassira, A. Stein, C.L. Woodcock, and A.I. Skoultchi. 2005. Histone H1 depletion in mammals alters global

- chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*. 123:1199-212.
- Finch, J.T., and A. Klug. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:1897-901.
- Finch, J.T., L.C. Lutter, D. Rhodes, R.S. Brown, B. Rushton, M. Levitt, and A. Klug. 1977. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*. 269:29-36.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.
- Flindt, R. 2000. Biologie in Zahlen. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2000, ISBN 3827409748*.
- Fraser, P., and W. Bickmore. 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*. 447:413-7.
- Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 176:231-41.
- Funayama, R., M. Saito, H. Tanobe, and F. Ishikawa. 2006. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol*. 175:869-80.
- Fussner E, Ching RW, Bazett-Jones DP. 2011. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci*. 36(1):1-6.
- Gaines, P., C.W. Tien, A.L. Olins, D.E. Olins, L.D. Shultz, L. Carney, and N. Berliner. 2008. Mouse neutrophils lacking lamin B-receptor expression exhibit aberrant development and lack critical functional responses. *Exp Hematol*. 36:965-76.
- Gao J., D.K., R. Eils, I. Solovei, T. Cremer and J. Mattes. 2004. "Assessing The Similarity of Spatial Configurations Using Distance Differences and Bending Energy: Application To Chromosomal Interphase Arrangements In HeLa Cell Clones". . *IEEE ISBI 2004: 1400-1403 (Proceedings of the 2004 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, Arlington, VA, USA.)*.
- Gartler, S.M. 2006. The chromosome number in humans: a brief history. *Nat Rev Genet*. 7:655-60.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation". *J Cell Biol*119 (3): 493–501.
- Gazave, E., P. Gautier, S. Gilchrist, and W.A. Bickmore. 2005. Does radial nuclear organisation influence DNA damage? *Chromosome Res*. 13:377-88.
- Genes, d. 1979. Scaling concepts in polymer physics. *Cornell University Press*.
- Gerchman, S.E., and V. Ramakrishnan. 1987. Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7802-6.
- Gerdes, J., U. Schwab, H. Lemke, and H. Stein. 2006. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*. 31.
- Gershenson, N.I., G.D. Stormo, and I.P. Ioshikhes. 2005. Computational technique for improvement of the position-weight matrices for the DNA/protein binding sites. *Nucleic Acids Res*. 33:2290-301.
- Gilbert, N., and B. Ramsahoye. 2005. The relationship between chromatin structure and transcriptional activity in mammalian genomes. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 4:129-42.
- Gillespie, M.A., F. Le Grand, A. Scime, S. Kuang, J. von Maltzahn, V. Seale, A. Cuenda, J.A. Ranish, and M.A. Rudnicki. 2009. p38- $\gamma$ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J Cell Biol*. 187:991-1005.
- Goldman, R. D. et al. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8963-804.
- Gotoh, E. 2009. Drug-induced premature chromosome condensation (PCC) protocols: cytogenetic approaches in mitotic chromosome and interphase chromatin. *Methods Mol Biol*. 523:83-92.

- Gotoh, E., and M. Durante. 2006. Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol.* 209:297-304.
- Graw. 2010. Genetik. *Springer Verlag.* 5. Auflage:835.
- Gregory, T.R. 2005a. Genome size evolution in animals In: *The Evolution of the Genome, Elsevier, San Diego.* . 3-87.
- Gregory, T.R., J.A. Nicol, H. Tamm, B. Kullman, K. Kullman, I.J. Leitch, B.G. Murray, D.F. Kapraun, J. Greilhuber, and M.D. Bennett. 2007. Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Res.* 35:D332-8.
- Greiner, D., T. Bonaldi, R. Eskeland, E. Roemer, and A. Imhof. 2005. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol.* 1:143-5.
- Greiner, R.A., Y. Meier, G. Papadopoulos, A.K. O'Sullivan, and A. Imhof. Cost-effectiveness of posaconazole compared with standard azole therapy for prevention of invasive fungal infections in patients at high risk in Switzerland. *Oncology.* 78:172-80.
- Grigoryev, S.A., G. Arya, S. Correll, C.L. Woodcock, and T. Schlick. 2009. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:13317-22.
- Guelen, L., L. Pagie, E. Brassat, W. Meuleman, M.B. Faza, W. Talhout, B.H. Eussen, A. de Klein, L. Wessels, W. de Laat, and B. van Steensel. 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature.* 453:948-51.
- Habermann, F.A., M. Cremer, J. Walter, G. Kreth, J. von Hase, K. Bauer, J. Wienberg, C. Cremer, T. Cremer, and I. Solovei. 2001. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res.* 9:569-84.
- Hansen, J. C. 2012. Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *The EMBO Journal* (2012) 31, 1621 - 1623
- Hansen, J.C. 2002. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 31:361-92.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 345:458-60.
- Hauser, D., H.P. Weber, and H.P. Sigg. 1970. [Isolation and configuration of Chaetocin]. *Helv Chim Acta.* 53:1061-73.
- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 25:585-621.
- Heckner, F. 2001. Praktikum der mikroskopischen Hämatologie. *Urban und Fischer.* 10. Auflage.
- Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbuch der Wissenschaftlichen Botanik.* 1.
- Hepperger, C., A. Mayer, J. Merz, D.K. Vanderwall, and S. Dietzel. 2009. Parental genomes mix in mule and human cell nuclei. *Chromosoma.* 118:335-47.
- Hepperger, C., S. Otten, J. von Hase, and S. Dietzel. 2007. Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments. *Chromosoma.* 116:117-33.
- Hofmann, W., B. Reichart, A. Ewald, E. Muller, I. Schmitt, R.H. Stauber, F. Lottspeich, B.M. Jockusch, U. Scheer, J. Hauber, and M.C. Dabauvalle. 2001. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol.* 152:895-910.
- Hornebeck W, Maquart FX. 2003: Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression. *Biomed Pharmacother.* 2003 Jul-Aug;57(5-6):223-30.
- Hsu, T.C. 1975. A possible function of constitutive heterochromatin: the bodyguard hypothesis. *Genetics.* 79 Suppl:137-50.
- Illner, D. 2007. Räumliche Anordnung von transkriptionell aktivem und inaktivem Chromatin in genreichen und genarmen Subregionen des aktiven und inaktiven X-Chromosoms; Diplomarbeit
- Illner, D., R. Zinner, V. Handtke, J. Rouquette, H. Strickfaden, C. Lanctot, M. Conrad, A. Seiler, A. Imhof, T. Cremer, and M. Cremer. 2010. Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin.

- Exp Cell Res.* 316:1662-80.
- Isham, C.R., J.D. Tibodeau, W. Jin, R. Xu, M.M. Timm, and K.C. Bible. 2007. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood.* 109:2579-88.
- Isham, C.R., J.D. Tibodeau, AR Bossou, JR Merchan, and KC Bible. 2012. The anticancer effects of chaetocin are independent of programmed cell death and hypoxia, and are associated with inhibition of endothelial cell proliferation *British Journal of Cancer.* 106, 314 – 323.
- Jenuwein, T., and C.D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science.* 293:1074-80.
- Johnson, R.T., and P.N. Rao. 1970. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature.* 226:717-22.
- Jolly, R.D., D.N. Palmer, and R.R. Dalefield. 2002. The analytical approach to the nature of lipofuscin (age pigment). *Arch Gerontol Geriatr.* 34:205-17.
- Kabir, J., M. Lobo, and I. Zachary. 2002. Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *Biochem J.* 367:145-55.
- Kato, H., and A.A. Sandberg. 1967. Chromosome pulverization in human binucleate cells following colcemid treatment. *J Cell Biol.* 34:35-45.
- Kim, J.K., M. Samaranyake, and S. Pradhan. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 66:596-612.
- Köbberling. 1966. Die Häufigkeit von Drumsticks in Abhängigkeit von der Präparation der Zellen. *Human genetics:*p. 104-112.
- Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 184:868-71.
- Kornberg, R.D. 1977. Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem.* 46:931-54.
- Kornberg, R.D., and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 98:285-94.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128:693-705.
- Krauss, S.W., C. Chen, S. Penman, and R. Heald. 2003. Nuclear actin and protein 4.1: essential interactions during nuclear assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10752-7.
- Kriaucionis, S., and N. Heintz. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science.* 324:929-30.
- Kruithof, M., F.T. Chien, A. Routh, C. Logie, D. Rhodes, and J. van Noort. 2009. Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol.* 16:534-40.
- Kupper, K., A. Kolbl, D. Biener, S. Dittrich, J. von Hase, T. Thormeyer, H. Fiegler, N.P. Carter, M.R. Speicher, T. Cremer, and M. Cremer. 2007. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma.* 116:285-306.
- Kurz, A., S. Lampel, J.E. Nickolenko, J. Bradl, A. Benner, R.M. Zirbel, T. Cremer, and P. Lichter. 1996. Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol.* 135:1195-205.
- Kwak, I.H., H.S. Kim, O.R. Choi, M.S. Ryu, and I.K. Lim. 2004. Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res.* 64:572-80.
- Lamond, A.I., and D.L. Spector. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:605-12.
- Lanctot, C., T. Cheutin, M. Cremer, G. Cavalli, and T. Cremer. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 8:104-15.
- Lane, N.J. 1969. Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J Cell Biol.* 40:286-91.
- Lanigan, F., J.G. Geraghty, and A.P. Bracken. 2011. Transcriptional regulation of cellular senescence. *Oncogene.* 30:2901-11.
- Lecoqeur, H., E. Ledru, M.C. Prevost, and M.L. Gougeon. 1997. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods.* 209:111-23.

- Lee, B.Y., J.A. Han, J.S. Im, A. Morrone, K. Johung, E.C. Goodwin, W.J. Kleijer, D. DiMaio, and E.S. Hwang. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 5:187-95.
- Leitch, A.R., Brown, J.K., Mosgoller, W., Schwarzacher, T., and Heslop-Harrison, J.S., 1994. The spatial localization of homologous chromosomes in human fibroblasts at mitosis. *Hum Genet* 93, 275-280.
- Lengauer, C., H.C. Riethman, M.R. Speicher, M. Taniwaki, D. Konecki, E.D. Green, R. Becher, M.V. Olson, and T. Cremer. 1992. Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res*. 52:2590-6.
- Lewin. 1998. Molekularbiologie der Gene. . *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin*.
- Lichter, P., T. Cremer, J. Borden, L. Manuelidis, and D.C. Ward. 1988. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*. 80:224-34.
- Lin, C., L. Yang, B. Tanasa, K. Hutt, B.G. Ju, K. Ohgi, J. Zhang, D.W. Rose, X.D. Fu, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2009. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 139:1069-83.
- Linder Biologie, 2010. Horst Bayrhuber, Ulrich Kull (Hrsg.),  
zusammen mit Ulrich Bäßler, Hans Hopmann und Wolfgang Rüdiger  
Schroedel Verlag GmbH, 23 Auflage.
- Lleres, D., J. James, S. Swift, D.G. Norman, and A.I. Lamond. 2009. Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J Cell Biol*. 187:481-96.
- Lomvardas, S., G. Barnea, D.J. Pisapia, M. Mendelsohn, J. Kirkland, and R. Axel. 2006. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*. 126:403-13.
- Lü MH, Deng JQ, Cao YL, Fang DC, Zhang Y, Yang SM 2012. Prognostic role of telomerase activity in gastric adenocarcinoma: A meta-analysis. *Exp Ther Med* . 2012 Apr; 3 (4) :728-734.
- Luger, K., A.W. Mader, R.K. Richmond, D.F. Sargent, and T.J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-60.
- Lukasova, E., Z. Koristek, M. Falk, S. Kozubek, S. Grigoryev, M. Kozubek, V. Ondrej, and I. Kroupova. 2005. Methylation of histones in myeloid leukemias as a potential marker of granulocyte abnormalities. *J Leukoc Biol*. 77:100-11.
- Lyon, M.F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*. 190:372-3.
- Maeshima, K., S. Hihara, and M. Eltsov. 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol*. 22:291-7.
- Mahy, N.L., P.E. Perry, and W.A. Bickmore. 2002a. Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. *J Cell Biol*. 159:753-63.
- Makalowski, W. 2003. Genomics. Not junk after all. *Science*. 300:1246-7.
- Manuelidis, L. 1985. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Hum Genet*. 71:288-93.
- Markaki, Y., M. Gunkel, L. Schermelleh, S. Beichmanis, J. Neumann, M. Heidemann, H. Leonhardt, D. Eick, C. Cremer, and T. Cremer. 2010. Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 75:475-92.
- Martin, R.M., S.M. Gorisch, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. 2007. An unexpected link between energy metabolism, calcium, chromatin condensation and cell cycle. *Cell Cycle*. 6:2422-4.
- McDonald, D., G. Carrero, C. Andrin, G. de Vries, and M.J. Hendzel. 2006. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol*. 172:541-52.
- Meaburn, K.J., and T. Misteli. 2007. Cell biology: chromosome territories. *Nature*. 445:379-781.
- Mejat, A., and T. Misteli. 2009. LINC complexes in health and disease. *Nucleus*. 1:40-52.

- Meshorer, E. 2007. Chromatin in embryonic stem cell neuronal differentiation. *Histol Histopathol.* 22:311-9.
- Meshorer, E., and T. Misteli. 2006. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:540-6.
- Meshorer, E., D. Yellajoshula, E. George, P.J. Scambler, D.T. Brown, and T. Misteli. 2006. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell.* 10:105-16.
- Misteli, T. 2007. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell.* 128:787-800.
- Muchir, A., J. Shan, G. Bonne, S.E. Lehnart, and H.J. Worman. 2009a. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet.* 18:241-7.
- Muchir, A., W. Wu, and H.J. Worman. 2009b. Reduced expression of A-type lamins and emerin activates extracellular signal-regulated kinase in cultured cells. *Biochim Biophys Acta.* 1792:75-81.
- Murmann, A.E., J. Gao, M. Encinosa, M. Gautier, M.E. Peter, R. Eils, P. Lichter, and J.D. Rowley. 2005. Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. *Exp Cell Res.* 311:14-26.
- Nagele, R., T. Freeman, L. McMorrow, and H.Y. Lee. 1995. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science.* 270:1831-5.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703-16.
- Neumann, B., T. Walter, J.K. Heriche, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held, U. Liebel, C. Cetin, F. Sieckmann, G. Pau, R. Kabbe, A. Wunsche, V. Satagopam, M.H. Schmitz, C. Chapuis, D.W. Gerlich, R. Schneider, R. Eils, W. Huber, J.M. Peters, A.A. Hyman, R. Durbin, R. Pepperkok, and J. Ellenberg. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. 2010 *Nature.* 464:721-7.
- Neusser, M., V. Schubel, A. Koch, T. Cremer, and S. Müller. 2007. Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma.* 116:307-20.
- Ng, K., D. Pullirsch, M. Leeb, and A. Wutz. 2007. Xist and the order of silencing. *EMBO Rep.* 8:34-9.
- Niedojadlo, J., C. Perret-Vivancos, K.H. Kalland, D. Cmarko, T. Cremer, R. van Driel, and S. Fakan. 2011. Transcribed DNA is preferentially located in the perichromatin region of mammalian cell nuclei. *Exp Cell Res.* 317:433-44.
- Nishino Y, Eltsov M, Joti Y, Ito K, Takata H, Takahashi Y, Hihara S, Frangakis AS, Imamoto N, Ishikawa T, Maeshima K. 2012. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J* 31: 1644-1653.
- Nunez, E., Y.S. Kwon, K.R. Hutt, Q. Hu, M.D. Cardamone, K.A. Ohgi, I. Garcia-Bassets, D.W. Rose, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, and X.D. Fu. 2008. Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell.* 132:996-1010.
- Olins, A.L., T.V. Hoang, M. Zwerger, H. Herrmann, H. Zentgraf, A.A. Noegel, I. Karakesisoglou, D. Hodzic, and D.E. Olins. 2009. The LINC-less granulocyte nucleus. *Eur J Cell Biol.* 88:203-14.
- Olins, A.L., and D.E. Olins. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* 183:330-2.
- Olins, A.L., and D.E. Olins. 2004. Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol.* 5:30.
- Olins, A.L., M. Zwerger, H. Herrmann, H. Zentgraf, A.J. Simon, M. Monestier, and D.E. Olins. 2008. The human granulocyte nucleus: Unusual nuclear envelope and heterochromatin composition. *Eur J Cell Biol.* 87:279-90.
- Olins, D.E., and A.L. Olins. 2005. Granulocyte heterochromatin: defining the epigenome. *BMC Cell Biol.* 6:39.

- Omura, S., Y. Sasaki, Y. Iwai, and H. Takeshima. 1995. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo)*. 48:535-48.
- Osborne, C.S., L. Chakalova, K.E. Brown, D. Carter, A. Horton, E. Debrand, B. Goyenechea, J.A. Mitchell, S. Lopes, W. Reik, and P. Fraser. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet*. 36:1065-71.
- Peng, J.C., and G.H. Karpen. 2008. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr Opin Genet Dev*. 18:204-11.
- Polychronidou, M., and J. Grobhans. 2011. Determining nuclear shape: the role of farnesylated nuclear membrane proteins. *Nucleus*. 2:17-23.
- Postberg, J., O. Alexandrova, T. Cremer, and H.J. Lipps. 2005. Exploiting nuclear duality of ciliates to analyse topological requirements for DNA replication and transcription. *J Cell Sci*. 118:3973-83.
- Postberg, J., H.J. Lipps, and T. Cremer. Evolutionary origin of the cell nucleus and its functional architecture. *Essays Biochem*. 48:1-24.
- Ragnauth, C.D., D.T. Warren, Y. Liu, R. McNair, T. Tajsic, N. Figg, R. Shroff, J. Skepper, and C.M. Shanahan. 2009. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*. 121:2200-10.
- Reis, T., and B.A. Edgar. 2004. Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell*. 117:253-64.
- Rhodes, D., and A. Klug. 1980. Helical periodicity of DNA determined by enzyme digestion. *Nature*. 286:573-8.
- Robbiani, D.F., A. Bothmer, E. Callen, B. Reina-San-Martin, Y. Dorsett, S. Difilippantonio, D.J. Bolland, H.T. Chen, A.E. Corcoran, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig. 2008. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*. 135:1028-38.
- Robinson, P.J., and D. Rhodes. 2006. Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol*. 16:336-43.
- Robles, L.J. 1978. Accumulation and identification of lipofuscin-like pigment in the neurons of *Bulla gouldiana* (Gastropoda: Opisthobranchia). *Mech Ageing Dev*. 7:53-64.
- Rouquette, J., C. Genoud, G.H. Vazquez-Nin, B. Kraus, T. Cremer, and S. Fakan. 2009. Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: a novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture. *Chromosome Res*. 17:801-10.
- Routh, A., S. Sandin, and D. Rhodes. 2008. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:8872-7.
- Saccone, S., and G. Bernardi. 2001. Human chromosomal banding by in situ hybridization of isochores. *Methods Cell Sci*. 23:7-15.
- Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner BM., Zink D. 1999. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol*. 20:146(6):1211-26.
- Sasaki, Y., M. Seto, K. Komatsu, and S. Omura. 1991. Staurosporine, a protein kinase inhibitor, attenuates intracellular Ca(2+)-dependent contractions of strips of rabbit aorta. *Eur J Pharmacol*. 202:367-72.
- Schardin, M., T. Cremer, H.D. Hager, and M. Lang. 1985. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum Genet*. 71:281-7.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to superresolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190, 165-175.
- Schermelleh, L., P.M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M.C. Cardoso, D.A. Agard, M.G. Gustafsson, H. Leonhardt, and J.W. Sedat. 2008. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*. 320:1332-6.
- Schermelleh, L., I. Solovej, D. Zink, and T. Cremer. 2001. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells. *Chromosome Res*. 9:77-80.
- Scherthan, H. 2006. Factors directing telomere dynamics in synaptic meiosis. *Biochem Soc Trans*. 34:550-3.

- Scheuermann, M.O., A.E. Murmann, K. Richter, S.M. Gorisch, H. Herrmann, and P. Lichter. 2005. Characterization of nuclear compartments identified by ectopic markers in mammalian cells with distinctly different karyotype. *Chromosoma*. 114:39-53.
- Scheuermann, M.O., J. Tajbakhsh, A. Kurz, K. Saracoglu, R. Eils, and P. Lichter. 2004. Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Exp Cell Res*. 301:266-79.
- Seiler, A., M. Schneider, H. Forster, S. Roth, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Radmark, W. Wurst, G.W. Bornkamm, U. Schweizer, and M. Conrad. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*. 8:237-48.
- Sellis, D., A. Provata, and Y. Almirantis. 2007. Alu and LINE1 distributions in the human chromosomes: evidence of global genomic organization expressed in the form of power laws. *Mol Biol Evol*. 24:2385-99.
- Serrano, M., and M.A. Blasco. 2001. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*. 13:748-53.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88:593-602.
- Shimi, T., K. Pflieger, S. Kojima, C.G. Pack, I. Solovei, A.E. Goldman, S.A. Adam, D.K. Shumaker, M. Kinjo, T. Cremer, and R.D. Goldman. 2008. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev*. 22:3409-21.
- Shopland, L.S., C.R. Lynch, K.A. Peterson, K. Thornton, N. Kepper, J. Hase, S. Stein, S. Vincent, K.R. Molloy, G. Kreth, C. Cremer, C.J. Bult, and T.P. O'Brien. 2006. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol*. 174:27-38.
- Sohal, R.S., and A. Dubey. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med*. 16:621-6.
- Solovei, I., A. Cavallo, L. Schermelleh, F. Jaunin, C. Scasselati, D. Cmarko, C. Cremer, S. Fakan, and T. Cremer. 2002. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res*. 276:10-23.
- Solovei, I., and B. Joffe. 2009. Inverted nuclear architecture and its development during differentiation of mouse rod photoreceptor cells: a new model to study nuclear architecture. *Genetika*. 46:1159-63.
- Souslova, T., and D.A. Averill-Bates. 2004. Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 60:1538-51.
- Speicher, M. R. SG Ballard, and C.D Ward. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor fish. *Nature genetics*, 12 (4): 368-75.
- Spilianakis, C.G., M.D. Lalioti, T. Town, G.R. Lee, and R.A. Flavell. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*. 435:637-45.
- Stadler, S., V. Schnapp, R. Mayer, S. Stein, C. Cremer, C. Bonifer, T. Cremer, and S. Dietzel. 2004. The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. *BMC Cell Biol*. 5:44.
- Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.
- Strick, R., P.L. Strissel, K. Gavrillov, and R. Levi-Setti. 2001. Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol*. 155:899-910.
- Stuken, T., E. Hartmann, and D. Gorlich. 2003. Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J*. 22:5928-40.
- Sun, B.K., A.M. Deaton, and J.T. Lee. 2006. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell*. 21:617-28.
- Suzuki, T., E. Michishita, H. Ogino, M. Fujii, and D. Ayusawa. 2002. Synergistic induction of the senescence-associated genes by 5-bromodeoxyuridine and AT-binding ligands in HeLa cells. *Exp Cell Res*. 276:174-84.

- Taddei, A. 2007. Active genes at the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol.* 19:305-10.
- Tahiliani, M., K.P. Koh, Y. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind, and A. Rao. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 324:930-5.
- Tanabe, H., S. Muller, M. Neusser, J. von Hase, E. Calcagno, M. Cremer, I. Solovei, C. Cremer, and T. Cremer. 2002. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4424-9.
- Teller, K. 2008. Die Architektur des X-Chromosoms  
- eine „Top down“-Analyse in humanen Fibroblasten  
*Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- Teller, K., D. Illner, S. Thamm, C.S. Casas-Delucchi, R. Versteeg, M. Indemans, T. Cremer, and M. Cremer. 2011. A top-down analysis of Xa- and Xi-territories reveals differences of higher order structure at  $\geq 20$  Mb genomic length scales. *Nucleus.* 2.
- Teller, K., I. Solovei, K. Buiting, B. Horsthemke, and T. Cremer. 2007. Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:14970-5.
- Teng, Y., K. Iuchi, E. Iwasa, S. Fujishiro, Y. Hamashima, K. Dodo, and M. Sodeoka. 2011. Unnatural enantiomer of chaetocin shows strong apoptosis-inducing activity through caspase-8/caspase-3 activation. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:5085-8.
- Terman, A., and U.T. Brunk. 2006. Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal.* 8:197-204.
- Tibodeau, J.D., L.M. Benson, C.R. Isham, W.G. Owen, and K.C. Bible. 2009. The anticancer agent chaetocin is a competitive substrate and inhibitor of thioredoxin reductase. *Antioxid Redox Signal.* 11:1097-106.
- Tolhuis, B., R.J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, and W. de Laat. 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell.* 10:1453-65.
- Tomlins, S.A., D.R. Rhodes, S. Perner, S.M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J.E. Montie, R.B. Shah, K.J. Pienta, M.A. Rubin, and A.M. Chinnaiyan. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 310:644-8.
- Ungewitter, E., and H. Scoble. 2009. Antagonistic pleiotropy and p53. *Mech Ageing Dev.* 130:10-7.
- Urban, C.F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, W. Nacken, V. Brinkmann, P.R. Jungblut, and A. Zychlinsky. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.
- Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12:1161-208.
- Verschure, P.J. 2004. Positioning the genome within the nucleus. *Biol Cell.* 96:569-77.
- Versteeg, R., B.D. van Schaik, M.F. van Batenburg, M. Roos, R. Monajemi, H. Caron, H.J. Bussemaker, and A.H. van Kampen. 2003. The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res.* 13:1998-2004.
- Visser, A.E., and J.A. Aten. 1999. Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 19):3353-60.
- Visser, A.E., F. Jaunin, S. Fakan, and J.A. Aten. 2000. High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 14):2585-93.
- Voinnet, O., and D.C. Baulcombe. 1997. Systemic signalling in gene silencing. *Nature.* 389:553.
- Volpi, E.V., E. Chevret, T. Jones, R. Vatcheva, J. Williamson, S. Beck, R.D. Campbell, M. Goldsworthy, S.H. Powis, J. Ragoussis, J. Trowsdale, and D. Sheer. 2000. Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 9):1565-76.

- Vreugde, S., C. Ferrai, A. Miluzio, E. Hauben, P.C. Marchisio, M.P. Crippa, M. Bussi, and S. Biffo. 2006. Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell*. 23:749-55.
- Wakelin, L.P., W.D. McFadyen, A. Walpole, and I.A. Roos. 1984. Interaction of phenylthiolato-(2,2',2"-terpyridine)platinum(II) cation with DNA. *Biochem J*. 222:203-15.
- Wallace, J.A., and G. Felsenfeld. 2007. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev*. 17:400-7.
- Walter J., Schermelleh L., Cremer M., Tashiro S. and T. Cremer. 2003. Chromosome order in HeLa cells changes during mitosis and early G1, but is stably maintained during subsequent interphase stages. *J Cell Biol*. 3:160(5):685-97.
- Weierich, C., A. Brero, S. Stein, J. von Hase, C. Cremer, T. Cremer, and I. Solovei. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res*. 11:485-502.
- Widom, J., and A. Klug. 1985. Structure of the 300A chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*. 43:207-13.
- Willcox, B.J., T.A. Donlon, Q. He, R. Chen, J.S. Grove, K. Yano, K.H. Masaki, D.C. Willcox, B. Rodriguez, and J.D. Curb. 2008. FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:13987-92.
- Williams, R.R., V. Azuara, P. Perry, S. Sauer, M. Dvorkina, H. Jorgensen, J. Roix, P. McQueen, T. Misteli, M. Merckenschlager, and A.G. Fisher. 2006. Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci*. 119:132-40.
- Williams, S.P., B.D. Athey, L.J. Muglia, R.S. Schappe, A.H. Gough, and J.P. Langmore. 1986. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J*. 49:233-48.
- Woodcock, C.L., and J. Frank. 1984. Nucleosome mass distribution using image averaging. *J Ultrastruct Res*. 89:295-302.
- Worcel, A., S. Strogatz, and D. Riley. 1981. Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:1461-5.
- Wright WE, Piatsyzek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay 1989. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18:173-179
- Xu, N., C.L. Tsai, and J.T. Lee. 2006. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*. 311:1149-52.
- Zhang, R., W. Chen, and P.D. Adams. 2007. Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol*. 27:2343-58.
- Zhou, G.L., L. Xin, W. Song, L.J. Di, G. Liu, X.S. Wu, D.P. Liu, and C.C. Liang. 2006. Active chromatin hub of the mouse alpha-globin locus forms in a transcription factory of clustered housekeeping genes. *Mol Cell Biol*. 26:5096-105.
- Zunhammer, A. Untersuchungen zur Frage einer Repositionierung von Chromosomen, subchromosomalen Elementen und spezifischen Loci durch die Mitose und nach transkriptioneller Aktivierung, Dissertation 2011.
- Zinner, R., H. Albiez, J. Walter, A.H. Peters, T. Cremer, and M. Cremer. 2006. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol*. 125:3-19.
- Zirbel, R.M., U.R. Mathieu, A. Kurz, T. Cremer, and P. Lichter. 1993. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res*. 1:93-106.
- Zwerger, M., H. Herrmann, P. Gaines, A.L. Olins, and D.E. Olins. 2008. Granulocytic nuclear differentiation of lamin B receptor-deficient mouse EPRO cells. *Exp Hematol*. 36:977-87.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Dr. Thomas Cremer** ganz herzlich dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte, sowie für seine fachliche und persönliche Unterstützung. Er wurde nicht müde, neue Ideen einzubringen und mich für zahlreiche Projekte zu motivieren.

Vielen Dank an PD. Dr. Steffen Dietzel für die Übernahme des Zweitgutachtens und auch allen anderen Gutachtern für ihre Zeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an **Dr. Marion Cremer**, die mir während meiner gesamten Zeit mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich für ihre Ideen, ihre aktive Mitarbeit im Chaetocin-Projekt und für die gemeinsame Betreuung von Forschungspraktikanten und Diplomanten bedanken.

Bei **Dr. Marcus Conrad** und **PhD Alexander Seiler** bedanke ich mich für ihre Unterstützung im Chaetocin-Projekt, ihre Beiträge zum Thema oxidativen Stress und das DCF-Staining.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an **Dr. Irina Solovei** und **Dr. Boris Joffe**, bei ihnen durfte ich einen Teil meiner Dipolarbeit anfertigen und wurde von ihnen in die vorhandenen Methoden der Arbeitsgruppe Thomas Cremer perfekt eingearbeitet. Dadurch wurde mir der Einstieg in meine Doktorarbeit erleichtert. Außerdem möchte ich mich bei Irina für das kunstvoll gestaltete Front cover von Chromosome Research und ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Cremer, die durch ihrer Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit immer zum guten Arbeitsklima beigetragen haben:

Ein ganz großes Dankeschön geht an **Dr. Alexandra Kölbl**, die mit mir drei Jahre lang das Büro teilte, mich in vielen schweren Stunden begleitet hat und mich so manches Mal zum Lachen brachte.

Ein besonderes Dankeschön gilt **Dr. Hilmar Stickfaden**, **Dr. Jens Nagel**, **Dr. Andreas Zunhammer**, **Dipl. Biol. Tobias Thormeyer** und **Herrn Molter** (IT), die mir bei Computerproblemen aller Art stets mit bewundernswerter Geduld hilfreich zur Seite standen. Ein großes Dankeschön geht an **Dipl. Biol. Barbara Hübner**, und vielen Dank auch an den Rest des Kerns und den in letzter Sekunde neu dazu gekommenen **Dr. Yolanda Markaki**, **Dr. Kathrin Brecht** und **Dr. Dagmar Pommereit**, so wie an die Mitarbeiter **Caroline Blesse** und **Ming Zhao**.

Ein großes Dankeschön geht an **Frau Heidi Jahn-Henniger**, die mich auf Grund ihrer langjährigen Berufserfahrung als MTA fachlich unterstützen konnte und viele Tipps und Tricks auf Lager hatte, wenn die Versuche mal nicht klappten.

Bei den Forschungs-Praktikantinnen **Steffi Thamm** und **Nadine Schrode** möchte ich mich für ihre Unterstützung im *LINE*-Projekt bedanken, für ihren unermüdlichen Fleiß *LINE*-Primer in verschiedenen Kombinationen und unter verschiedenen Bedingungen zu testen, und bei **Evelin Radulovic** bedanke ich mich für die perfekten 2D- und 3D-FISH-Experimente des DMD-Gens.

## Publikationen

A top-down analysis of Xa- and Xi-territories reveals differences of higher order structure at  $\geq 20$  Mb genomic length scales

Kathrin Teller, **Doris Illner**, Stefanie Thamm, Corella S. Casas-Delucchi, Rogier Versteeg, Mireille Indemans, Thomas Cremer, and Marion Cremer.

Nucleus 2:5, 465-477; September/October 2011; † 2011 Landes Bioscience

Statistical Shape Theory and Registration Methods for Analyzing the 3D Architecture of Chromatin in Interphase Cell Nuclei

Siwei Yang, **Doris Illner**, Kathrin Teller, Irina Solovei, Roel van Driel, Boris Joffe, Thomas Cremer, Roland Eils and Karl Rohr, Advances in Nuclear Architecture 2011, 131-147

Remodeling of nuclear architecture by the thiodioxopiperazine metabolite chaetocin

**Doris Illner**, Roman Zinner, Violet Handtke, Jacques Rouquette, Hilmar Strickfaden, Christian Lanctot, Marcus Conrad, Alexander Seiler, Axel Imhof, Thomas Cremer and Marion Cremer

Experimental Cell Research 2010

Structural analysis of interphase X-chromatin based on statistical shape theory

Siwei Yang, **Doris Illner**, et. al.

Biochimica et Biophysica Acta 1783 (2008) 2089-2099

3D-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Zellkernarchitektur

Dr. M. Cremer, S. Müller, I. Solovei, T. Cremer

Bereitstellung von Daten und Bildern.

Medizinische Genetik, Band 20, Heft 4, Dezember 2008, Seite 383

Radiale chromatin-organisation and X-territories compaction in human unstimulated, multilobulated granulocytes.

**Illner Doris**, Kölbl Alexandra, Solovei Irina, Thomas Cremer.

in preparation

## Poster

Cold Spring Harbor Symposium:

A new approach to study 3D interphase arrangement of small consecutive chromatin regions

**D.Illner**<sup>1</sup>, S.Yang<sup>2</sup>, K.Teller<sup>1</sup>, M.Cremer<sup>1</sup>, I.Solovei<sup>1</sup>, R.Eils<sup>2</sup>, K.Rohr<sup>2</sup>, T.Cremer<sup>1</sup>, B.Joffe<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Human Genetics, University of Munich (LMU), Germany

<sup>2</sup> Biomedical Computer Vision Group, Dept. Bioinformatics and Functional Genomics, University of Heidelberg, Germany

## FRONT COVER PICTURE

Visualization of four X chromosome segments on human mitotic chromosomes and nuclei of granulocytes.

CHROMOSOME RESEARCH, Volume 19, Number 2, 2011