

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht–Karls–Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Stefan Stein
aus Lampertheim
Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2006

Quantifizierung
der dreidimensionalen Mikroarchitektur
von Genomelementen
nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung
in fixierten und vitalen Zellen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer
Prof. Dr. Michael Hausmann

Quantifizierung der dreidimensionalen Mikroarchitektur von Genomelementen nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung in fixierten und vitalen Zellen

Die Erforschung der Chromatinstruktur in Interphasezellkernen basiert im Wesentlichen auf der in situ Hybridisierung von fluoreszenzmarkierten Sonden (=FISH), lichtoptischen Mikroskopieverfahren und digitaler Bildanalyse. Für die Quantifizierung der Bildinformation wurden neue effiziente Algorithmen entwickelt und anschließend auf verschiedene biologische Systeme angewendet. Zur quantitativen Analyse der Topologie und Morphologie von spezifisch fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen wurde ein Softwarepaket entwickelt, welches folgende Parameter mißt: absolute und relative Positionen, normierte und absolute Distanzen, Schwerpunktswinkel von Chromatinregionen und die Minkowski-funktionale von Chromosomenterritorien. Die Anpassung eines Ellipsoidmodells an Zellkerne wurde mittels Lagrange Optimierung realisiert. Zusätzlich wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher das Kugel-, Ellipsoidvolumen und die Kompaktierung von markierten Genen anhand der Halbwertsbreiten einer an die Intensitätsverteilung angepaßten zweidimensionalen Gaußverteilung bestimmt. Das Softwarepaket wurde an den Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen getestet. Die Anwendung auf Zellkerne des Cervix-Gewebes erlaubte es erstmals ein vollständiges topologisches Modell des Chromosomenterritoriums 18 und des BCL2 Gens mit der Differenzierung und Expression zu verknüpfen. Das Kugel-, Ellipsoidvolumen und die Kompaktierung des SNRPN Gens wurden abgeschätzt. Es konnte aufgezeigt werden, dass herkömmliche Meßmethoden unzureichend sind, daß aber auch FISH-Artefakte das Ergebnis beeinflussen können. Daher wurde eine neue Methode zur vitalen kombinatorischen Oligonukleotid-FISH (=vCF) eingeführt. Während bei allen Standard-FISH-Methoden destruktive Veränderungen der Chromatinstruktur auftreten können, ermöglicht die vCF eine schonende in situ Hybridisierung in lebenden T-Lymphozyten.

Quantification of the three-dimensional micro-architecture of fluorescently labeled genome elements in fixed and vital cells

Investigations of chromatin structure in interphase nuclei are mainly based on in situ hybridisation of fluorescently labeled probes (=FISH), lightoptical microscopy and digital image analysis. For image quantification novel algorithms were developed and applied to several biological systems. For quantitative analysis of the topology and morphology of specific fluorescently labeled chromatin regions a software-package was developed, that measures the following parameters: absolute and relative positions, normalised and absolute distances, barycenter angles of chromatin regions and the minkowski functionals of chromosome territories. The adaptation of an ellipsoid model to all nuclei was realised by lagrange optimisation. Additionally an algorithm was developed to determine the spherical, ellipsoidal volume and the compaction of labeled genes using a two-dimensional gaussian fit adapted the intensity distribution. The software-package was tested on chromosomes 18 and 19 in fibroblast nuclei. The application to nuclei in cervix-tissues allows for the first time to connect a complete topological model of chromosome 18 and BCL2 gene with differentiation and expression. The spherical, ellipsoidal volume and compaction of the SNRPN gene were estimated. It could be shown that conventional methods are insufficient, and that FISH artefacts may influence the result. Therefore, a novel labelling technique of vital cells using combinatorial oligo nucleotides (=vCF) was introduced. Whereas all the standard-FISH-methods possibly cause destructive changes of chromatin structure, vCF permits a gentle in situ hybridisation in living cells.

Durch alle Wesen reicht der eine Raum:
Weltinnenraum. Die Vögel fliegen still
durch uns hindurch. O, der ich wachsen will,
ich seh hinaus, und in mir wächst der Baum.

Ich Sorge mich, und in mir steht das Haus.
Ich hüte mich, und in mir ist die Hut.
Geliebter, der ich wurde: an mir ruht
der schönen Schöpfung Bild und weint sich aus

R.M.Rilke, Die Gedichte 1910 bis 1922

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht	1
1.1.1	Grundlegende Struktur des Chromatins	1
1.1.2	Der Zellzyklus	3
1.1.3	Chromatinorganisation in der Interphase	4
1.1.4	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (=FISH)	7
1.1.5	Peptid-Nukleinsäuren	8
1.2	Biologische Zielsetzung	10
1.3	Physikalische Zielsetzung	13
2	Grundlagen der Optik und Mikroskopie	21
2.1	Fluoreszenz	21
2.2	Das konfokale Laserrastermikroskop (=CLSM)	22
2.3	Bildentstehung am CLSM	23
2.3.1	Physikalische Grundlagen	23
2.3.2	Die dreidimensionale Punktbildfunktion des CLSM	24
3	Ausgleichsrechnung	29
3.1	Methode der kleinsten Fehlerquadrate	29
3.1.1	Einführung	29
3.1.2	Anpassung einer linearen Funktion	30
3.2	Methode der Lagrangen Multiplikatoren	31
3.2.1	Einführung	31
3.2.2	Anwendung auf Ellipsoide	31
3.3	Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus	34
3.3.1	Anpassung nichtlinearer Funktionen	34
3.3.2	Die Levenberg Marquardt Methode	35
3.3.3	Anwendung auf die 2D Gaußfunktion	35
4	Parameter zur Charakterisierung der Genomarchitektur	39
4.1	Die Relative radiale Positionierung	39
4.1.1	Die schwerpunkt-basierte Positionierung	40
4.1.2	Die randbasierte Positionierung	42
4.1.3	Biologische Interpretation der Ergebnisse	45
4.2	Distanzen	46
4.2.1	Absolute Distanzen	46

4.2.2	Winkel und normierte Distanzen	47
4.3	Minkowski Funktionale (=MF)	48
4.3.1	Einführung	48
4.3.2	Veranschaulichung der MF	48
4.3.3	Biologische Interpretation der MF	50
4.4	Abschätzung der Fluorophorverteilung	51
5	Entwickelte Algorithmen zur quantitativen Bildanalyse	55
5.1	Vorverarbeitung der digitalen Bilder	56
5.1.1	Filterung	58
5.1.2	Hintergrundreduzierung	60
5.1.3	Isodataverfahren	62
5.1.4	Verfahren nach Otsu	65
5.1.5	Detektion und Segmentierung von Objekten mittels Tophatfilterung	68
5.2	Anpassung von kugelförmigen und ellipsoiden Körpern an Zellkerne	71
5.2.1	Implementierung an segmentierten Bildern	71
5.3	Die Kartierung des Zellkerns	72
5.3.1	Schwerpunktsbezogene radiale Kartierung	72
5.3.2	Zellkernkartierung mittels Chamfering Distanztransformation (=DT)	74
5.3.3	Zellkernkartierung mittels euklidischer vektorieller Distanztransformation (=DT)	77
5.3.4	Auswertung der Zellkernkartierung	79
5.4	Messung der Fluorophorverteilung von Objekten	82
5.4.1	Berechnung der Halbwertsbreite	82
5.5	Distanzmessungen	83
5.6	Minkowskifunktionale	84
5.6.1	Marching Cube Methode	84
5.6.2	Berechnung der MF	85
6	Ergebnisse der vital COMBO-FISH (=vCF)	91
6.1	Mikroinjektion	91
6.2	Qualitative Ergebnisse	98
6.3	Quantitativer Vergleich der vCF und Standard-FISH Methode anhand der Topologie des Zentromer 9	100
7	Anwendungen	105
7.1	Anwendung der entwickelten Algorithmen zur quantitativen Bildanalyse	105
7.1.1	Vergleich des Isodata- und Otsu-Algorithmus	106
7.1.2	Vergleich der Distanztransformations-Algorithmen	112
7.1.3	Ellipsoidanpassung	119
7.1.4	Messung der MF der Chromosomenterritorien 18 und 19	122
7.2	Untersuchung der Topologie des BCL2 Gens und des Chromosom 18 in Cervix-Gewebe	124
7.2.1	Lage des BCL2 Gens relativ zum Chromosomenterritorium 18	126
7.2.2	Relative radiale Position des BCL2 Gens und des Chromosomenterritoriums 18	131

7.2.3	Absolute und normierte Distanzen und Schwerpunktswinkel zwischen den BCL2 Genen und den Chromosomenterritorien 18	150
7.2.4	Topologisches Modell	155
7.3	Quantitative Bildanalyse des SNRPN-Gens	159
7.3.1	Messung des Volumens und der Kompaktierung des SNRPN Gens(1. Experiment)	161
7.3.2	Messung der relativen radialen Position des SNRPN Gens (1. Experiment) 167	
7.3.3	Messung des Volumens und der Kompaktierung des SNRPN Gens (2. Experiment)	170
7.3.4	Zusammenfassung der quantitativen Bildanalyse des SNRPN Gens . . .	176
8	Diskussion und Ausblick	179
8.1	Vital COMBO-FISH	179
8.2	Schwellwertalgorithmen und Tophatfilter	183
8.3	Relative radiale Positionierung	186
8.3.1	Die randbasierte und schwerpunktbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19	187
8.3.2	Die randbasierte und schwerpunktbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene	190
8.3.3	Zusammenfassung und Ausblick	191
8.4	Ellipsoidanpassung	192
8.5	Anwendung der Minkowskifunktionale	193
8.6	Topologie des Chromosom 18 und BCL2 Gens in Cervix-Gewebe	195
8.7	Messungen am SNRPN Gen	199
A	Eigene Publikationen, Buchbeiträge und Abstracts	209
A.1	Publikationen	209
A.2	Buchbeiträge	210
A.3	Abstracts	210
B	Material und Methoden	215
B.1	Chemikalien	215
B.2	Lösungen	216
B.3	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	216
B.4	Protokolle	217
B.4.1	Methanol/Eisessig Fixierung	217
B.4.2	Interphase/Metaphase-FISH Zentromer 9	218
	Literaturverzeichnis	229
	Abbildungsverzeichnis	235

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Übersicht

1.1.1 Grundlegende Struktur des Chromatins

Die Grundbausteine der Desoxyribonucleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid = DNA) sind Nucleotide, welche aus einem Zuckerrest, der Desoxyribose, einer Base und einer Phosphorsäure bestehen. Es existieren fünf Basen, zwei Purinbasen, Guanin (G) und Adenin (A), und drei Pyrimidinbasen, Thymin (T), Cytosin (C) und Uracil (U), wovon nur die ersten vier in der DNA vorkommen (siehe Abbildung 1.1).

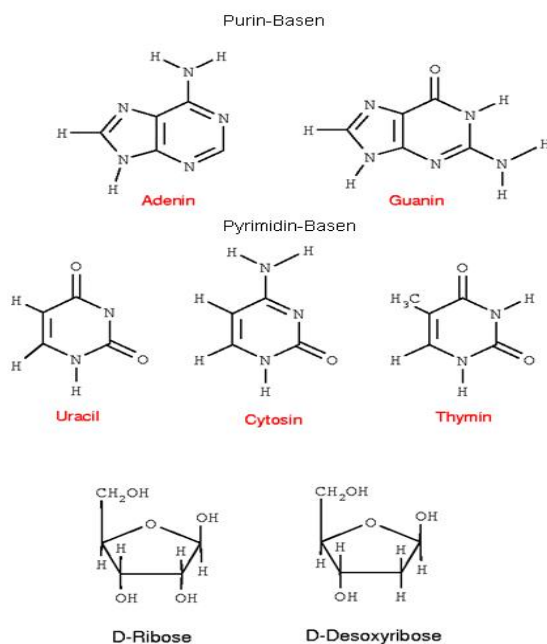
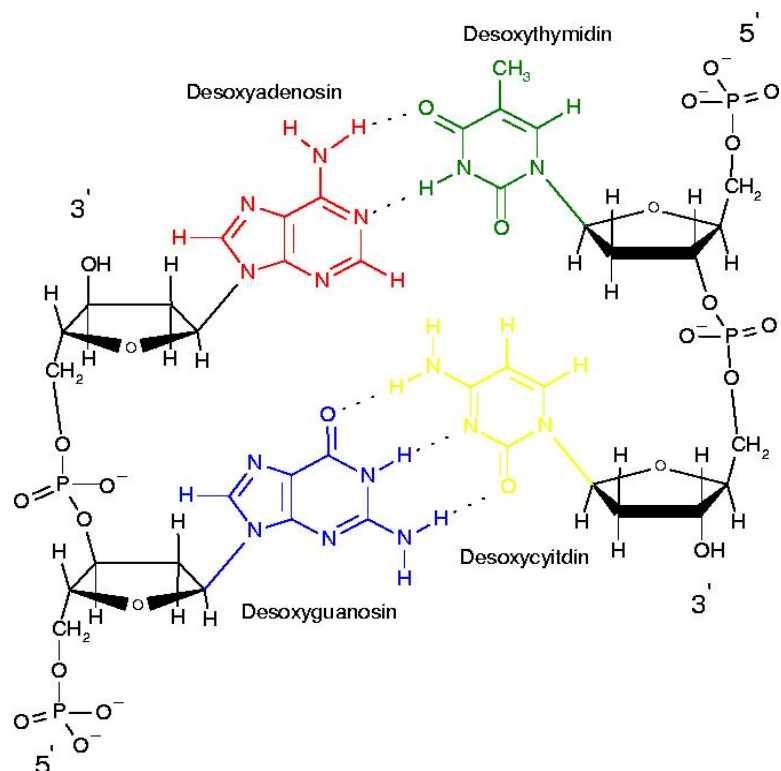


Abbildung 1.1: Die Abbildung zeigt die Strukturformeln der Purin- bzw. Pyrimidinbasen (oben bzw. mitte) und die Zuckerreste, die D-Ribose und D-Desoxyribose. Die DNA besteht aus den Pyrimidinbasen Thymin (T) und Cytosin (C) und den Purinbasen Guanin (G) und Adenin (A). Die Pyrimidinbase Uracil (U) ist nur in Ribonucleinsäuren zu finden. (Quelle [94])

Die einzelnen Nucleotide werden über Bildung einer Phosphordiesterbindung zwischen der OH-Gruppe der Desoxyribose am C-3' des einen Nucleotids und der Phosphorsäure am C-5', des nächsten Nucleotids, zu einem DNA-Strang polymerisiert, wodurch die Richtung des DNA-Strangs definiert wird. Über Wasserstoffbrückenbindungen, sogenannte Watson-Crick Bindungen, der komplementären Basen A-T und G-C bilden die Einzelstränge einen DNA-Doppelstrang mit antiparallelem Richtungssinn, also 3'-5' und 5'-3' [115]. Der Doppelstrang liegt in einer rechtsgewundenen Helixformation vor, welche durch intramolekulare Wechselwirkung der Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (siehe Abbildung 1.2). In der am häufigsten

Abbildung 1.2: Die Abbildung zeigt die Bildung des DNA-Doppelstrangs mittels Watson-Crick-Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen den Basen. Thymin und Adenin (rot und grün) bilden zwei und Guanin und Cytosin (gelb und blau) drei Wasserstoffbrücken. (Quelle [94])



vorliegenden Form der B-DNA-Helix werden 10 Basenpaare für eine vollständige Windung auf eine Länge von 3,4 nm benötigt. Die nächst höhere Organisationsstufe ist die Windung der DNA-Helix um die Histone. Histone bestehen aus vier Untereinheiten, mit je zwei H2A, H2B, H3 und H4 Proteinen, welche das in einer Oktamerkonformation vorliegende Histon bilden. Es werden 146 Basenpaare 1,75 mal um das Histon gewunden. Der resultierende DNA-Protein Komplex wird *Nukleosom* genannt. Die einzelnen Nukleosome sind durch einen 54 Basenpaare langen Linker verbunden. Die Faltung dieser Nukleosomenkette bildet die nächst größere Verpackungsstufe der DNA, das *Chromatin*, welches bei einer niedrigen Ionenkonzentration in einer 10 nm Perlenkettenform (engl. beads on a string) und unter physiologischen Bedingungen in einer 30 nm Chromatinfaser vorliegt [85] (siehe Abbildung 1.3). Über die Verpackung der DNA in lebenden Zellen, also ob in Form einer 30 nm Faser oder anderen Konformationen, existieren unterschiedliche Vorstellungen, welche Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Arbeit sind. Auf die Chromatinfaltungen in Abhängigkeit vom Zellzyklus wird im Folgenden eingegangen. (Literaturquelle: Alberts et al. [2] und Knippers et al. [65]).

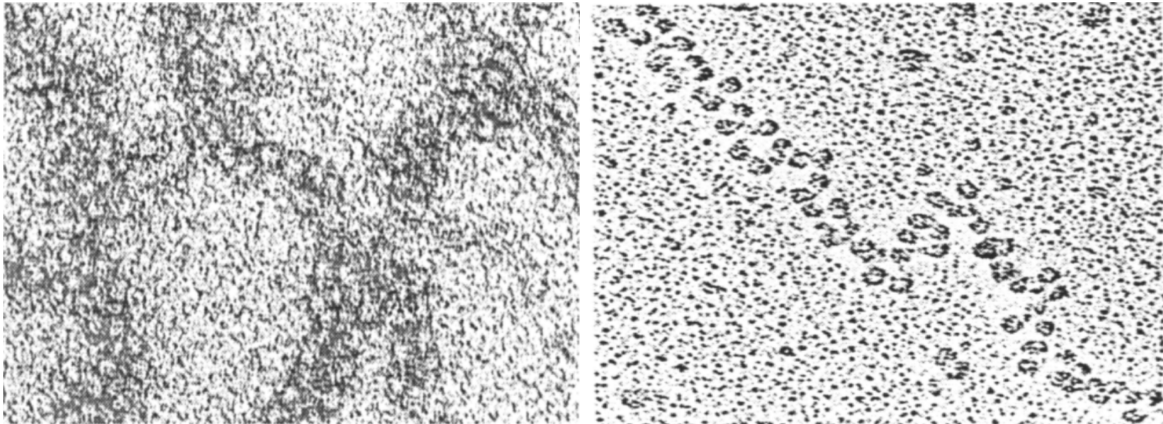


Abbildung 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chromatin unter physiologischen Bedingungen (links) und bei niedriger Ionenkonzentration (rechts). Anhand des Kondensationsgrades des Chromatin unter physiologischen Bedingungen wurde die 30 nm Faser gemessen. Rechts ist deutlich die sogenannten Perlenkettenform (engl. beads on a string) zu sehen. (Quelle [113])

1.1.2 Der Zellzyklus

Die gesamte im Zellkern vorhandene DNA ist beim Mensch auf 22 Autosomen und 2 Geschlechtschromosomen verteilt, welche als diploider (doppelter) Chromosomensatz vorliegen. In Abhängigkeit von der Zellzyklusphase besteht das Chromosom aus einem oder zwei Chromatiden, die am Zentromer miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.4). Die Unterscheidung in sogenannte Phasen ergibt sich aus dem Zyklus, welchen jede Zelle durchläuft. Der Zellzyklus ermöglicht die Definition von proliferierenden, alternden und ruhenden Zellen und besteht aus zwei sich abwechselnden Phasen, der Mitose (=Teilungsphase) und der Interphase (=Wachstumsphase). Die Mitose wird in vier weitere Phasen unterteilt, die Prophase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase. In diesen vier Phasen findet die Kondensation des Chromatins zu sogenannten Metaphase-Chromosomen (siehe Abbildung 1.4), die, durch den Spindelapparat eingeleitete, Teilung jedes Metaphase-Chromosoms in zwei Chromatiden und die Teilung des Zellkerns statt.

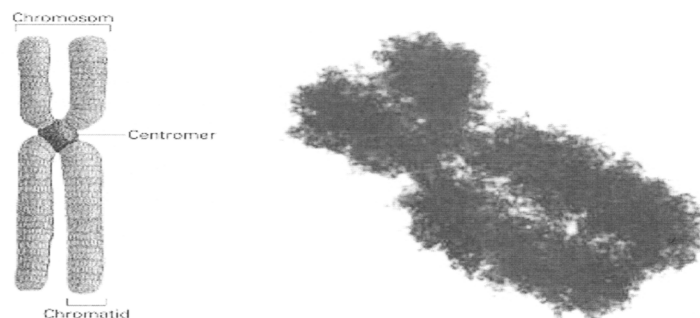


Abbildung 1.4: Die Abbildung links zeigt die schematische Darstellung eines Metaphase-Chromosoms. Die Abbildung rechts zeigt die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphase-Chromosoms. (Quellen [38] [2])

Die Interphase wird ebenfalls in vier weitere Phasen unterteilt, die G1-/G0-, S- und G2-Phase. Nach der Mitose befindet sich die Zelle in der G1-Phase, in welcher die noch fehlenden Zellbestandteile ersetzt werden und eine intensive Produktion von Proteinen bzw. Ribonukleinsäuren (engl. Ribonucleic acid=RNA) stattfindet. Zellen, die eine alternde bzw. ruhende Phase einnehmen, d.h. sich nicht mehr teilen, befinden sich in der G0-Phase, welche Teil der G1-Phase ist. In der G1-/G0-Phase finden nur transkriptionelle Aktivitäten statt und die Chromosomen liegen nur als einzelne Chromatiden in dekondensierter Form vor. Die Replikationsphase, die S-Phase, dient der Verdopplung des gesamten Chromatins und ist die Vorbereitung der Zelle auf eine erneute Mitose. Am Ende der S-Phase besteht ein Chromosom aus zwei dekondensierten Chromatiden. In der G2-Phase wird die Vorbereitung der Zelle auf die Mitose abgeschlossen und anhand von Kontrollmechanismen entscheidet sich, ob die Zelle in die Mitose eintritt. In Abbildung 1.5 ist ein Schema des geschilderten Zyklus zu sehen.

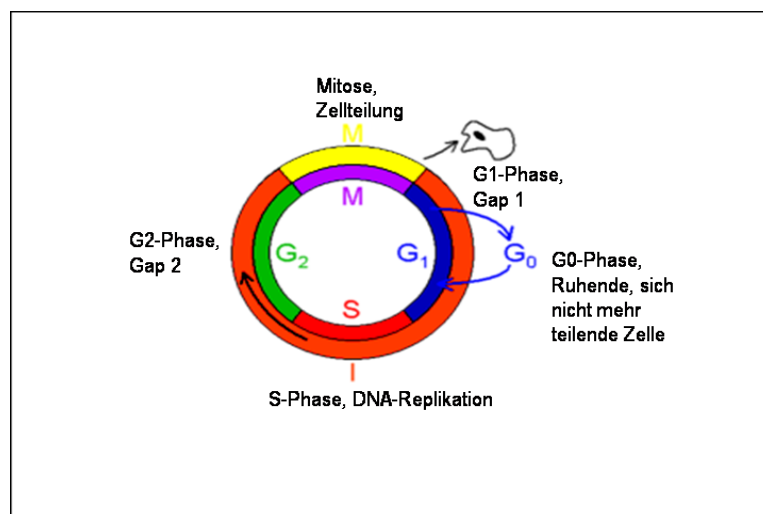


Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Zellzyklus. Eine sich teilende Zelle durchläuft den Zyklus, welcher die Teilung (Mitose), Transkription (G1-Phase), Replikation (S-Phase) und Replikationskontrolle (G2-Phase) beinhaltet, in einer Zeit von 10-30 Stunden. (Quelle [48])

1.1.3 Chromatinorganisation in der Interphase

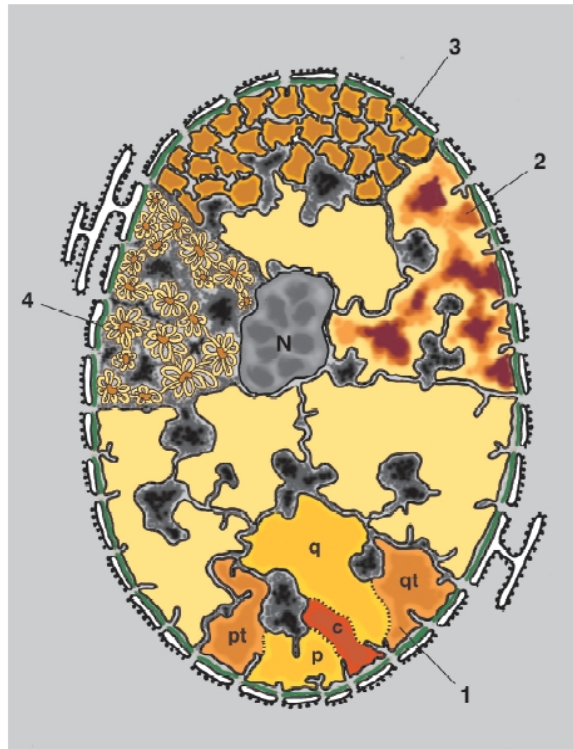
Die quantitativen Untersuchungen des Chromatins finden in dieser Arbeit an Zellen statt, welche sich alle in der Interphase befinden, weshalb in diesem Kapitel eine Einführung in die bekannten Interphasemodelle erfolgt. Die erste bekannte Theorie für den Interphase-Zellkern wurde 1885 von Carl Rabl veröffentlicht. Rabl postulierte einen Kernfaden, aus welchem jedes Chromosom besteht, der eine Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt und ein dreidimensionales Chromatinnetzwerk im Zellkern bildet [91]. Eine Erweiterung dieses Modells folgte 1909 von Theodor Boveri, der eine distinkte territoriale Organisation dieses Fadens annahm [9]. Diese Vorstellung ist der heute bekannten ähnlich, wurde jedoch in der 60er Jahren des 20. Jahrhunderts aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Chromatins von David Comings wieder verworfen [18]. Comings vertrat ein Modell, bei welchem die Telomere und Zentromere an der Zellkernhülle mit polarer Ausrichtung aufgehängt sind, während sich das dazwischenliegende Chromatin als Faden mit beliebiger Struktur, ohne territoriale Ordnung, im Zellkern verteilt.

Das territoriale Chromosomenmodell wurde in den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts von Cremer et al. und Zorn et al. [24] [123] wieder aufgegriffen. Als Indiz für eine vorhandene Kompartimentalisierung wurde die nur lokal nachweisbare Schädigung des Chromatins angeführt, nachdem dieses in lebenden Zellen lokal mit UV-Laserlicht bestrahlt worden waren. Wäre keine territoriale Ordnung vorhanden, so hätten die Schäden nach gewisser Zeit global im Zellkern verteilt erscheinen müssen. Es wurde jedoch nur eine lokale Schädigung nachgewiesen. Mit der Entwicklung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (=FISH), welche die spezifische Markierung von Chromatinregionen mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden ermöglicht, wurde die Existenz von Chromosomenterritorien bestätigt [28] [70] [89] [27].

Die Untersuchung der chromosomalen Substruktur führte auf unterschiedliche Strukturmodelle der Chromosomenterritorien. Die genomischen Abstände ≤ 2 MBp wurden erstmals von van den Engh et al. 1992 [36] mittels FISH untersucht, wobei sich eine Quadratwurzelabhängigkeit der gemessenen zweidimensional projizierten mittleren Abstände von der genomischen Distanz ergab, welches durch ein einfaches *Random-Walk* Verhalten beschrieben werden kann. Yokota et al. [119] vermaß 1995 die genomischen Abstände in einem Bereich ≥ 2 MBp bis 190 MBp für zwei verschiedene Präparationsmethoden der Zellen. Die projizierten Abstände zeigten bei einer isotonischen Präparationsmethode, in Abhängigkeit von den genomischen Abstände, ein langsames Anwachsen, als in hypotonisch behandelten Zellen. Die Abstände in hypotonisch behandelten Zellen sind mit dem 1995 von Sachs et al. [100] vorgestellten *Random-Walk/Giant-Loop Modell* vereinbar, welches eine Organisation des Chromatin in 3MBp großen Schleifen mit einem Basispunkt Abstand von ca. 600 nm und einem *Random-Walk-Rückgrat* propagiert. Das 1998 von Münkler et al. [76] vorgestellte *Multi Loop Subcompartment Modell* stimmt hingegen mit dem Abstandsverhalten einer isotonischen Präparation der Zellen besser überein. Ein Chromosomenterritorium besteht hierbei aus hypothetischen 120 kBp Schleifen, welche aus 30 nm Chromatinfasersegmenten aufgebaut sind und anhand von Chromatin-Verbindungsstücken, sogenannten Linkern, zusammengehalten werden.

Von Cremer et al. [27] wurde im Jahr 1993 das Inter-Chromatin-Domänen-Modell (ICD-Modell) vorgestellt, welches die Organisation des Chromatins im ganzen Zellkern beschreibt. Die Chromosomenterritorien sind in Domänen eingeteilt und werden von einem dreidimensionalen Netzwerk, dem ICD-Raum, durchzogen. Innerhalb dieses ICD-Raums findet die Replikation, Transkription und der Proteintransport statt. Das erweiterte ICD-Modell wurde 2000 von Cremer et al. [26] vorgestellt und enthält weitere Verfeinerung bzgl. der intrachromosomalen Organisationsstruktur. In diesem Modell nehmen auch die einzelnen Chromosomenarme und Chromosomenbanden voneinander abgegrenzte Bereiche ein, die Chromosomen bestehen aus 1MBp-Domänen, die Replikation findet innerhalb sogenannter Replikationsfoci statt und aktive Gene befinden sich an der Peripherie der Chromosomen, während inaktive sich auch im Inneren befinden können (siehe Abbildung 1.6). Ein Überblick ist in Cremer et al. 2001 [23] zu finden. In den letzten Jahren ist die topologische und morphologische Untersuchung von Chromosomenterritorien und subchromosomalen Chromatinregionen immer mehr in den Fokus gerückt. Von Boyle et al. [10] bzw. Kozubek et al. [68] wurde 2001 bzw. 2002 eine radiale Organisation der Chromosomen in Fibroblasten und Lymphozyten in Abhängigkeit von der Gendichte propagiert. Im gleichen Jahr wurden diese Ergebnisse für Lymphozyten von Cremer et al. [22] bestätigt. Bolzer et al. [4] fanden allerdings 2005 in Fibroblasten eine radiale Organisation in Abhängigkeit von der Chromosomengröße, was im Widerspruch zu den Ergebnissen von Boyle et al. (2001) steht.

Abbildung 1.6: Die schematische Darstellung verdeutlicht das erweiterte ICD-Modell [26], nach welchem die p- und q-Arme und Zentromere der Chromosomenterritorien selbst auf voneinander getrennte Kompartimente aufgeteilt sind (1). Die Untereinheiten dieser Kompartimente (2) bestehen aus 1 MBp (ca. 400-800 nm) großen Domänen (3), welche mittels Linkern verbunden sind und eine territoriale Struktur aufweisen. Die 1 MBp Domänen bestehen wiederum aus den hypothetischen ca. 120 kBp großen Domänen, welche z.B. den Schleifen des MLS-Modells entsprechen [76]. (Quelle: Dr.I.Solovei, LMU München)



Die Position von Genen in Bezug die Oberfläche der Chromosomenterritorien wurde in mehreren Arbeiten untersucht, wobei sich zeigte, dass sich Gene, unabhängig von ihrer Aktivität, sowohl innerhalb der Chromosomenterritorien, als auch peripher, an der Oberfläche der Chromosomenterritorien befinden können [71] [72] [31] [69]. Die Position von aktiven und inaktiven Genen, sowie von GC reichen und armen Chromatinregionen, in Bezug auf die Oberfläche von Chromosomenterritorien und die radiale Position innerhalb des Zellkernes wurden 2004 von Scheuermann et al. [102] umfassend untersucht. Die untersuchten transkriptionell aktiven und inaktiven Genen waren hierbei sowohl innerhalb, als auch peripher in Bezug auf die Oberfläche der Chromosomenterritorien positioniert, während GC reiche Regionen nur peripher und GC arme Regionen nur innerhalb lagen. Transkribierte Chromatinregionen (aktive Gene und GC reiche Regionen) waren zentral und nicht transkribierte Chromatinregionen (inaktive Gene und GC arme Regionen) peripher im Zellkern lokalisiert. Zusätzlich wurde 2005 von Murmann et al. [80] die Position der Chromatinregionen von Genen innerhalb des Zellkerns in Abhängigkeit von einer genarmen und genreichen Chromatinumgebung untersucht. Es zeigte sich, dass diejenigen Gene, welche sich in einer genarmen Region befinden peripher, und, die in einer genreichen Umgebung zentral im Zellkern positioniert sind. Die Untersuchung der Chromatin-Topologie und -Morphologie im Kontext eines ganzen Gewebeverbandes ist, im Zusammenhang mit Differenzierung und Karzinomentwicklung, unentbehrlich und wurde 2004 von Parada et al. [87] und 2005 von Wiecht et al. [116] untersucht.

Die ersten Messungen bzgl. der Kompaktierungen und der Größen auf der Ebene einzelner Genen und Chromatinregionen wurden 2005 von Hildenbrand et al. [59] und 2006 von Mathee et al. [73] präsentiert. Die hierbei angewendeten Mikroskopietechniken werden zukünftig erstmals Einblicke in die Kondensations- und Dekondensationsmechanismen ermöglichen.

Eine Übersicht über den Stand der Forschung ist in Cremer et al. und Pederson et al. [25] [88] zu finden. In Abbildung 1.7 sind die Kenntnisse bzgl. der Kompaktierung des Chromatins von der DNA-Helix hin zum Metaphase-Chromosom zu sehen.

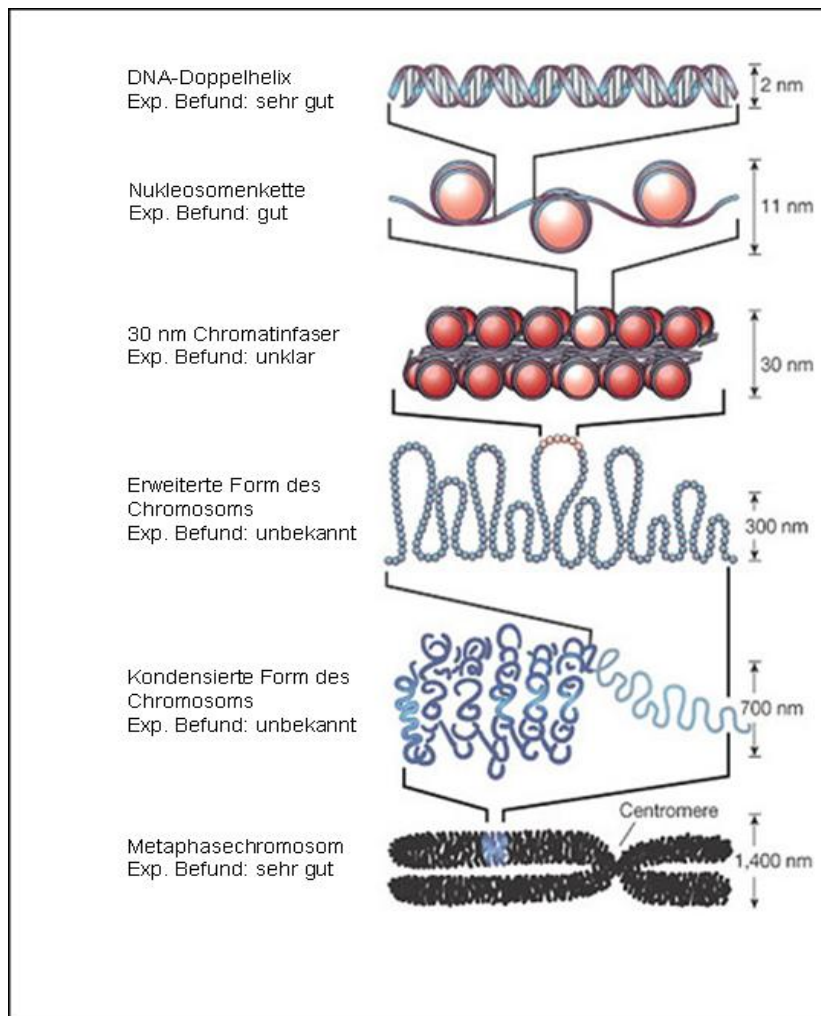


Abbildung 1.7: Die Abbildung verdeutlicht die verschiedenen bekannten und möglichen Faltungsstrukturen des Chromatins. Die Bereiche von 30 nm bis 700 nm können bis heute nicht eindeutig experimentell belegt werden und sind Gegenstand aktueller Forschung. (Quelle [40])

1.1.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (=FISH)

Die in situ (= vor Ort) Hybridisierung von einzelsträngigen DNA-Stücke, an welche radioaktive Elemente gekoppelt waren, wurde erstmals 1969 von Pardue und Gall realisiert [45]. Im Jahre 1985 wurde von Schardin et al. eine distinkten Organisation des X-Chromosoms mittels in situ Hybridisierung von radioaktiv markierter Sonden-DNA nachgewiesen [101]. 1986 gelang Pinkel et al. [90] die in situ Hybridisierung von DNA, an welche Biotin gekoppelt war, und der anschließende Nachweis der hybridisierten DNA-Sonden mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zwei Jahre später wurden von Cremer et al. und Lichter et al. [28] [70] ganze Chromosomen mittels FISH markiert. Das Prinzip der FISH ist bis heute gleich geblieben, die Ziel- und Sonden-DNA, welche fluoreszenzmarkiert ist, werden thermisch denaturiert, anschließend vermisch und die Sonden-DNA bindet während der Renaturierungsphase an die Zielsequenz (siehe Abbildung 1.8). Die Denaturierung der DNA-Stränge, d.h. das Lösen der Watson-Crick-Bindungen (Wasserstoffbrückenbindung) der doppelsträngigen DNA, erfolgt in

einem Formamid-Puffer-Gemisch bei Temperaturen von ca. 75°C. Nach der Denaturierung liegen Sonden- und Ziel-DNA einzelsträngig vor und können, wenn diese zusammengeführt werden, spezifisch rekombinieren, d.h. während der Renaturierung bilden sich die Watson-Crick-Bindungen neu aus. Der Vorgang des spezifischen Rekombinierens wird Hybridisierung genannt. Eine hohe Konzentration an Sonden ist maßgeblich, um die Spezifität des Bindens der Sonden-DNA an die Ziel-DNA zu gewährleisten. Die normalen Hybridisierungszeiten betragen ca. 24 Stunden, wobei eine Variante der hier vorgestellten FISH, die schnelle FISH (engl. fast FISH), bedeutend kürzere Hybridisierungszeiten erlaubt [52]. Das Entfernen von unspezifisch ausgebildeten Sekundärstrukturen nach der Renaturierung erfolgt in Pufferlösungen, mit an die Sonden-DNA angepasster Ionenkonzentration, bei niedrigeren Temperaturen als bei der Denaturierung.

Die Kopplung des Fluoreszenzmoleküls an die Sonden-DNA kann direkt oder indirekt erfolgen. Üblicherweise wird das Fluoreszenzmolekül direkt an die DNA gekoppelt. Ist die Chromatinregion klein, dann werden, um die Fluoreszenz zu verstärken, Antigene an die Sonden-DNA gekoppelt, deren Nachweis mittel fluoreszenzmarkierter Antikörpern erfolgt. Die Vielfalt der spezifischen DNA-Sonden hat in den letzten Jahren zugenommen, es existieren Sonden für Chromosomen (Megabasenpaare) bis hin zu Genloci spezifischen Sonden (einige hundert Kilobasenpaare).

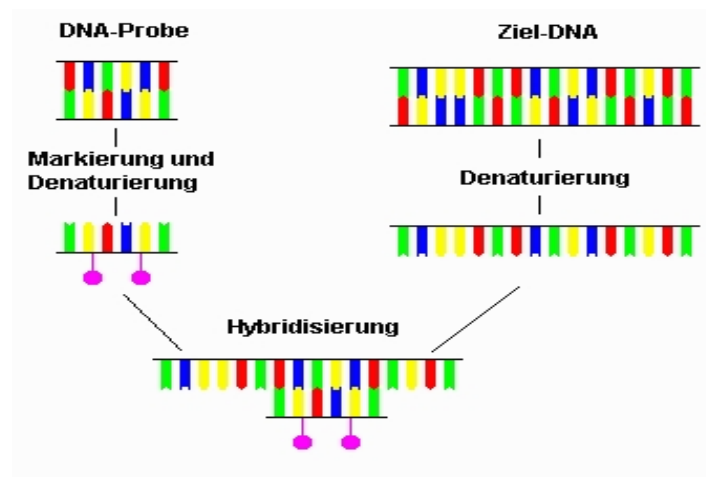


Abbildung 1.8: Die Sonden-DNA, an welche ein fluoreszierendes Reportermolekül gekoppelt ist, und die Ziel-DNA werden vor der Hybridisierung denaturiert, d.h. die Watson-Crick-Bindung zwischen den Basen der Doppelstränge werden thermisch gelöst. Nach der Denaturierung werden die Sonden- und Ziel-DNA gemischt und die vorliegenden Einzelstränge hybridisieren. (Quelle [3])

1.1.5 Peptid-Nukleinsäuren

Peptid-Nukleinsäuren (engl. peptide nucleic acids=PNA) sind im Jahre 1991 von Nielsen et al. [82] synthetisierte DNA-Imitate, die anstatt eines Desoxyribose - Phosphorsäure - Rückgrats ein Peptidrückgrat besitzen. Das Peptidrückgrat ist ein ungeladenes Pseudopeptid N-(2-Aminoethyl)-Glycin, an welches die Base kovalent gebunden ist (siehe Abbildung 1.9). Die Vorteile der PNA gegenüber gewöhnlicher DNA sind eine höhere Affinität und Spezifität gegenüber einer komplementären DNA, eine höhere Schmelztemperatur und die Resistenz gegenüber Enzymen und Nukleasen [81] [92] [46]. Die höhere Affinität, Spezifität und Schmelztemperatur

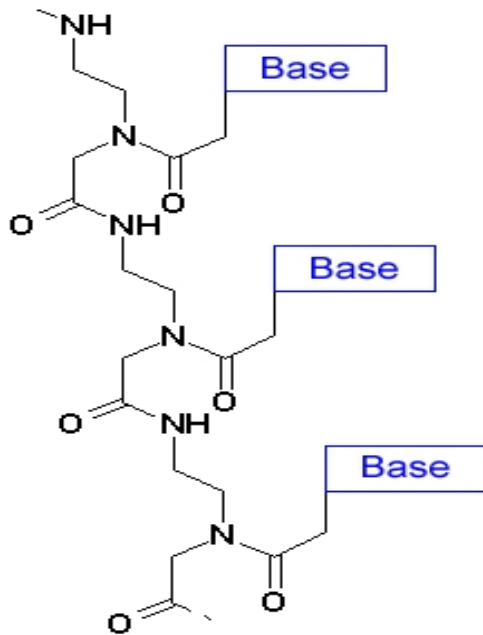


Abbildung 1.9: Darstellung der chemischen Struktur eines PNA-Strangs. Das Rückgrat ist durch ein N-(2-Aminoethyl)-Glycin ersetzt. (Quelle [47])

ergeben sich aus dem ungeladenen Peptidrückgrat, da die elektrostatische Wechselwirkung, welche zwischen den beiden DNA-Strängen des DNA-Doppelstrangs wirken, nicht vorhanden sind und so die Watson-Crick-Bindungen stabilisiert werden. Die Resistenz der Peptidbindung gegenüber dem enzymatischen Abbau resultiert aus der hohen Spezifität von Enzymen und Nukleasen gegenüber ihren Bindungsstellen [43]. Die Vorteile von PNA-Sonden gegenüber DNA-Sonden macht diese in Bezug auf FISH zu einem idealen DNA-Ersatz, deren Bandbreite bzgl. der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten noch nicht absehbar ist.

1.2 Biologische Zielsetzung

Die im Kapitel 1.1.4 vorgestellte Methode der FISH ist eine Standardtechnik zur spezifischen Markierung von Chromatinregionen. Die Denaturierung der sich im Zellkern befindenden Ziel-DNA und die Behandlung mit chaotropen Reagenzien sind die Vorgehensweisen bei einer FISH, um das Binden der Sonden-DNA zu ermöglichen. Die Spezifität von FISH bzgl. der Makrostruktur von Chromosomenterritorien und subchromosomalen Regionen und die an diesen vorgenommenen quantifizierenden topologischen Messungen sind unbestritten [23], die Reversibilität des Denaturierungsprozesses und der Erhalt der Protein-DNA Struktur in Bezug auf die Chromatinnanostruktur muß allerdings in Frage gestellt werden. Ein weiterer Nachteil der FISH-Methode ist, dass, aufgrund der Vorgehensweise, keine Untersuchungen von Chromatin in lebenden Zellen realisiert werden kann. Die Untersuchung und das Verständnis der Chromatinstruktur im Nanometerbereich in fixierten **und** lebenden Zellen ist jedoch ein essentieller Baustein, um ein vollständiges Modell der Organisation des Chromatins in dieser Größenordnung zu erhalten. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren die Entwicklung von alternativen und schonenderen Methoden zur spezifischen Markierung in fixierten und lebenden Zellen, welche die Chromatinnanostruktur erhalten, vorangetrieben.

Ein wesentlicher Ansatz in lebenden Zellen (in-vivo) ist das Einbringen von sogenannten Vektoren (z.B. Plasmide), welche eine lac-Repressor-Sequenz enthalten, die in das Genom integriert und amplifiziert wird, und anschließend anhand eines fluoreszenzmarkierten Proteins (z.B. engl. green fluoreszenz protein=GFP), das spezifisch an die integrierte Sequenz bindet, in lebenden Zellen nachgewiesen wird [95] [111]. Der Nachteil dieser Methode ist, dass keine im Genom vorhanden spezifische Chromatinregion, z.B. ein Genlocus, direkt markiert werden kann und der mögliche Umbau des Genoms, aufgrund der eingebauten Sequenz, das Meßergebnis verfälschen könnte. Ein zweiter Ansatz, welcher die Nachteile der vorherigen Methode umgeht und eine direkte Markierung des Chromatins ermöglicht, ist das Einbringen von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, welche in das Chromatin der lebenden Zellen während der Replikation integriert werden. Nach einigen Zellzyklen (5-10) sind die Chromatiden einzelner Chromosomen, aufgrund der Zellteilung, spezifisch markiert und können in lebenden Zellen beobachtet werden [122]. Die Markierung der Chromosomen kann, wenn der Einbau der Nukleotide in definierten Zeitfenstern des Zellzyklus erfolgt (engl. pulse-labelling), verfeinert werden. Die Methode weist allerdings einen Nachteil auf, die markierten Chromosomen können in der lebenden Zelle nicht identifiziert werden, d.h. es kann nicht entschieden werden, welche Chromosomen markiert wurden, da der Einbau der Nukleotide in alle innerhalb des Zeitfensters replizierenden Chromosomen erfolgt. Eine spezifische in situ Hybridisierung der telomerischen hochrepetitiven TTAGGG-Sequenz mittels einer PNA-Sonde, ohne Denaturierung und in lebenden Zellen gelang erstmals Molenaar et al. 2003 [78]. Die PNA-Sonde diffundierte durch Löcher in der Zellmembran, welche durch das Schütteln eines Glaskügelchen-Zellgemisches verursacht wurden, in das Zytoplasma und in den Zellkern [74]. Diese Methode zeigt erstmals, dass eine Markierung spezifischer Chromatinregionen in lebenden Zellen möglich ist.

Ein Ansatz an vitalen fixierten Zellen, bei welchem auf die Denaturierung der Ziel-DNA mit chaotropen Reagenzien verzichtet wird, ist die sogenannte Niedrigtemperatur – FISH (engl. low temperature FISH=LFISH). Durm et al. [32] zeigten 1997, dass repetitive Zentromersequenzen ohne Denaturierung der Ziel-DNA bei 37°C spezifisch markiert werden können. Hausmann et al. [56] gelang 1999 erstmals, mittels 32 selektierten Pyrimidin-Oligonukleotid-Sequenzen, die spezifische Markierung des ABL-Gens, ohne Denaturierung bei 37°C an fixierten Zellen. Die Pyrimidin-Oligonukleotidsonden binden hierbei mittels Hoogsteen-Bindungen,

welche Watson-Crick-Äquivalente mit einer etwas geringeren Bindungsenergie sind, als dritter DNA-Strang (tripelhelikal) in die große Furche der DNA-Helix [41], sodass die Ziel-DNA nicht denaturiert werden muß. 2003 wurde die Kombinatorische Oligonukleotid FISH Methode (engl. combinatorial oligonucleotide FISH=COMBO-FISH) von Hausmann et al. [57] etabliert. Hierbei werden die 20-30 Homopurin bzw. Homopyrimidin Oligonukleotidsequenzen (15-30 Basenpaare lang), welche zwischen 1-2% des Genoms ausmachen, vollautomatisiert computerselektiert und als Oligonukleotidset zusammengestellt. Dieses Set wird anschließend ohne Denaturierung bei 37°C in situ hybridisiert. Ein Vorteil dieser Methode ist die Spezifität und Bandbreite, die Oligonukleotidsonden liegen nur innerhalb der zu markierenden Chromatinregion und es kann für jeden Genlocus des Genoms ein Set zusammengestellt werden. Die Sonden-DNA herkömmlicher FISH-Sonden markiert meist, zusätzlich zum Genlocus, große Anteile unspezifische Chromatinregionen und es ist nur eine beschränkte Anzahl an spezifischen Sonden kommerziell erhältlich (siehe Abbildung 1.10). Von Winkler et al. [117] konnte im gleiche Jahr mittels scannender Nahfeldmikroskopie an Metaphase-Chromosomen gezeigt werden, wie stark der Einfluß der Denaturierung auf die Struktur des Chromatins ist (siehe Abbildung 1.11). Eine Etablierung der COMBO-FISH, als Methode zur quantitativen topologischen Analyse, wurde 2005 von Schwarz-Finsterle et al. [105] anhand der ABL/BCR-Genregion aufgezeigt.

Die Motivation für die in dieser Arbeit entwickelte vital COMBO-FISH (=vCF) Methode, war der Verzicht auf eine Fixierung **und** Denaturierung, um die Ziel-DNA zu markieren, und die in situ Hybridisierung der spezifischen Region des Genoms sollte in lebenden Zellen erfolgen.

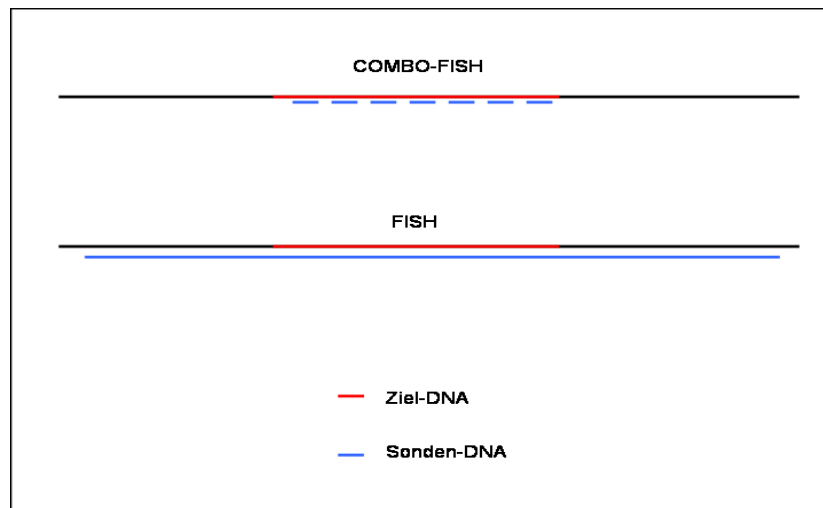


Abbildung 1.10: Schematische Gegenüberstellung von COMBO-FISH und herkömmlicher FISH. Die COMBO-FISH Methode ermöglicht es, anhand eines computerselektierten Oligonukleotidsets, welches nur Sonden innerhalb des Genlocus beinhaltet, beliebige Genloci des Genoms spezifisch zu markieren. Eine kommerziell erhältliche FISH-Sonde markiert hingegen meist, zusätzlich zum Genlocus, große Anteile unspezifische Chromatinregionen.

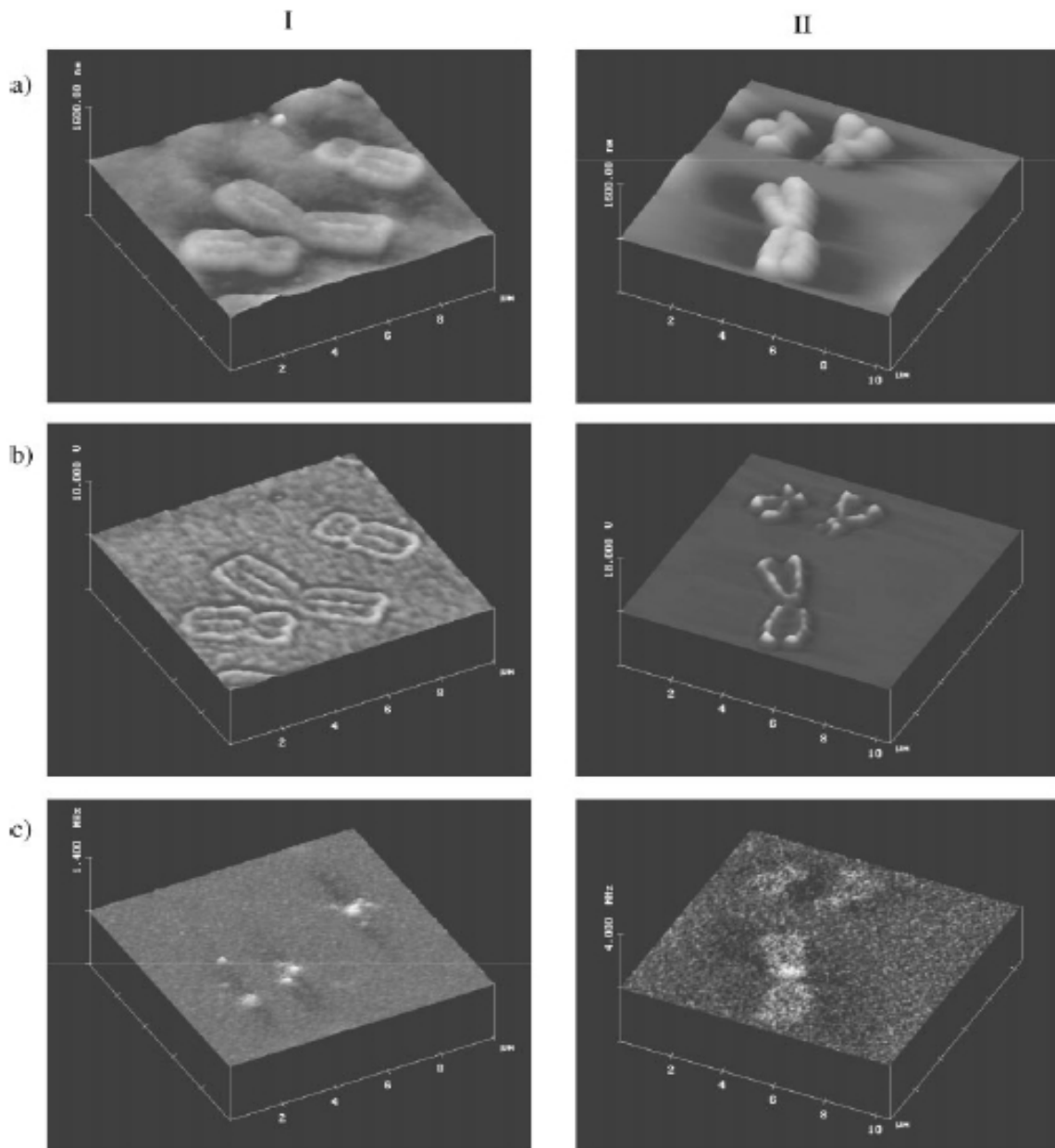


Abbildung 1.11: Die SNOM-Aufnahmen, welche unter den gleichen instrumentellen Bedingungen aufgenommen wurden, zeigen die mittels FISH (I, mit Denaturierung) und LTFISH (II, ohne Denaturierung) markierte q12-Region von Metaphase-Chromosomen. Die Abbildungen a) zeigen die topographischen Aufnahmen, die Abbildungen b) die Transmissionsbilder mit einer Wellenlänge von 543 nm und Abbildung c) das Fluoreszenzbild mit einer Wellenlänge >590 nm. Die Aufnahmen entstanden gleichzeitig. Deutlich zu sehen ist die, aufgrund der Denaturierung, veränderte Chromatinstruktur. (Quelle [57])

Die in dieser Arbeit verwendete Sonde ist ein PNA-Oligonukleotid, aus 18 Nukleotiden bestehend, welches spezifisch für das Zentromer 9 ist (siehe Abbildung 1.12). Die Sequenz der Probe wurde von Chen et al. selektiert [17]¹. PNA-Sonden sind, wie bereits von Molenaar et al. [78]



Abbildung 1.12: Die verwendete PNA-Sonde ist 18 Nukleotide lang, am 5'-Ende mit einem TMR Fluorophor und am 3'-Ende mit einem Lysin markiert. PNA-Sonden sind aufgrund der Peptidbindungen, anstatt der Phosphordiesterbindungen, besonders stabil gegenüber einem enzymatischen Abbau.

gezeigt wurde, aufgrund ihrer Resistenz gegenüber enzymatischen Abbau in lebenden Zellen, für die Markierung von spezifischen Genomregionen besonders geeignet. Diese Voraussetzungen erlauben es, im Rahmen dieser Arbeit, die erstmalige Anwendung von COMBO-FISH an lebenden Zellen mittels einer Zentromer 9 spezifischen PNA-Sonde aufzuzeigen und die Methode der vCF etablieren.

1.3 Physikalische Zielsetzung

Die Markierung von Chromatin und Zellkernen erfolgt, wie bereits in den vorherigen Kapiteln dargelegt, mittels fluoreszenzmarkierter Sonden. Die Aufnahmen der biologischen fluoreszenzmarkierten Präparate werden an konfokalen Laserrastermikroskopen (engl. confocal laser scanning microscope = CLSM) bzw. Epifluoreszenzmikroskopen gemacht und die Detektion des Fluoreszenzlichtes erfolgt mittels CCD-Kameras (CCD= engl. charge coupled device) bzw. Photomultipliern (=PM). Die innerhalb eines definierten Volumens detektierten Lichtintensität wird so auf ein diskretes Gitter, dessen Zellen im Englischen picture element (=Pixel) genannt werden, abgebildet und als digitales Bild gespeichert. Dreidimensionale digitale Bilder entstehen, indem mehrere zweidimensionale Bilder (laterale Fokusebene), mit einem definiertem Abstand in, zur lateralen Ebene senkrechte Richtung (axiale Richtung), aufgenommen und aneinandergereiht werden. Der resultierende Bildstapel stellt eine dreidimensionale Repräsentation des detektierten fluoreszenzmarkierten Zellkerns und Chromatins dar, in welchem die vollständige topologische und morphologische Information gespeichert ist. Die Aufgabe der digitalen Bildbearbeitung, Bildverarbeitung und quantitativen Bildanalyse ist es, die entsprechenden physikalische bzw. bildanalytischen Methoden und Algorithmen auf diese Bildstapel anzuwenden, um auf reproduzierbare Weise die biologischen Fragestellungen zu beantworten.

Die Reduzierung des Hintergrunds und das Anwenden von Schwellwerten auf digitale Bildstapel ist eine Standardmethode der Bildverarbeitung, um interessierende Objekte und Hintergrund zu trennen. Die aus FISH resultierenden mikroskopischen Aufnahmen zeigen jedoch eine Vermischung von Objekt und Hintergrund, sodass biologische Artefakte, biologisches Rauschen und eine markierte Chromatinregion oft nicht eindeutig zu trennen sind. Eine im Allgemeinen verwendete Methode ist das vom Experimentator interaktive Setzen eines Hintergrund- und Schwellwertes. Die Methoden variieren hierbei zwischen einem Schwellwertbereich, in welchem anschließend die Messungen vorgenommen werden (z.B. Cavalieri-Estimator), und einem definierten Hintergrund- und Schwellwert [34] [71]) [13]. Aus wissenschaftlicher Sicht ist jedoch

¹Die Sonde wurde im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise in der Gruppe von Professor R.Krämer synthetisiert, Anorganische Chemie Universität Heidelberg

ein Eingreifen des Experimentators in den Meßprozess, anhand nicht definierter und nicht reproduzierbarer Kriterien, inakzeptabel, da dies die Ergebnisse beeinflussen kann. Ein Verzicht auf Hintergrund- und Schwellwerte ist allerdings auch nicht möglich, da keine mathematisches Modell existiert, welches z.B. mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepaßt werden könnte.

In der hier vorliegenden Arbeit werden, aufgrund der Problematik, ein globaler und lokaler Hintergrundalgorithmus, sowie die globalen und lokalen Isodata- und Otsu-Algorithmen miteinander verglichen. Die Algorithmen werden auf die Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen angewendet und die resultierenden Volumenanteile am Zellkern mit den theoretischen Werten verglichen.

Die Detektion und Segmentierung von Genloci erfolgt mittels eines erstmals von Bornfleth et al. [8] implementierten Tophatfilters, welcher um einen vom Experimentator zu setzenden Parameter erweitert wurde und mit einer Objekterkennung und -nummerierung versehen wurde. Der vom Experimentator zu setzende Parameter wurde eingeführt, da das biologische Rauschen von der Güte des Präparats abhängt, um die Effizienz des Tophatfilters zu erhöhen. Die Objekterkennung und Nummerierung ermöglicht es die Objekte nach der Analyse eindeutig zu identifizieren. Die Effizienz des entwickelten Tophatfilters wird an fluoreszierenden Latexkügelchen (engl. Beads), am BCL2 Gen in Cervix-Gewebe und am SNRPN Gen in T-Lymphozyten untersucht und diskutiert.

Eine der Fragestellungen in Bezug auf das ICD Modell ist die topologische Organisation von Chromosomenterritorien und subchromosomalen Regionen (z.B. Zentromere, Gene). Die relative radiale Positionierung und DNA-Verteilung sind hierbei wesentliche topologische Parameter. Von Croft et al. [29] wurde 1999 die relative radiale Position und DNA-Verteilung der Chromosomen 18 und 19 in verschiedenen Zelltypen untersucht und eine radial zentrale Position des Chromosomenterritoriums 19 bzw. eine radial periphere Position des Chromosomenterritoriums 18 festgestellt. Die Chromosomen 18 und 19 sind im biologischen Sinne optimale Modellsysteme, da beide eine ähnliche Anzahl an Megabasenpaaren haben aber eine unterschiedliche Anzahl an Genen. Chromosom 18 besteht aus 76 MBp mit 438 Genen, während Chromosom 19 aus 64 MBp mit 1624 Gene besteht. Die Messung der zweidimensionalen radialen DNA-Verteilung erfolgte mit einem Algorithmus, welcher die Zellkernfläche in Schalen gleichgroßer Fläche unterteilt. Der Algorithmus wurde im Weiteren 2000 von Bridger et al. [14] auf die gleichen Chromosomen in Fibroblasten angewendet, welche sich in unterschiedlichen Zellphasen befanden, und 2001 von Boyle et al. [10] im Rahmen einer umfassenden Untersuchung, bei welcher die radial Position und der radiale DNA-Gehalt aller Chromosomen in Lymphozyten und Fibroblasten untersucht wurde. Das Resultat von Boyle et al. [10] war, in Bezug auf die Fibroblasten, eine radiale Position und DNA-Verteilung, welche von der Gendichte abhängt, die genreichen Chromosomen sind radial zentral, die genarmen Chromosomen radial peripher angeordnet.

Von Sun et al. 2000 [107], Cremer et al. 2001 [22], Kozubek et al. 2002 [68] und Bolzer et al. 2005 [4] wurden Algorithmen verwendet, welche die relative radiale Position und den relativen radialen DNA-Gehalt berechnen, indem der Zellkern anhand der Streckenverhältnis zwischen Zellkernschwerpunkt – Objektschwerpunkt zu Zellkernschwerpunkt – Objektschwerpunkt – Zellkernhülle in entsprechende Schalen eingeteilt wird. Bolzer et al. [4] vermaßen 2005 die Positionen und die DNA-Verteilung aller Chromosomen in Fibroblastenzellkernen mit diesem Algorithmus und kamen zu dem Resultat, dass die Chromosomen nicht in Abhängigkeit von der Gendichte, sondern in Abhängigkeit von der Größe radiale angeordnet sind, d.h. die kleinen

Chromosomenterritorien (18 und 19) liegen radial zentral und die großen Chromosomenterritorien radial peripher. Bestätigt wurden von Bolzer et al. [4], wenn auch nicht statistisch signifikant, die Ergebnisse von Bridger et al. [14], dass eine Abhängigkeit vom Zellzyklus bzgl. der radialen Position und radialen DNA-Verteilung vorliegt. Die Arbeiten von Boyle et al. [10] und Bolzer et al. [4] sind ein Paradoxon, da beide die gleichen Zelltypen, Fibroblasten, verwendeten aber unterschiedliche relative radiale Positionen und DNA-Verteilungen gemessen wurden.

Ähnliche Probleme ergaben sich an flachen und von einer Kugelform abweichenden Zellkernen des Pankreaskarzinomgewebes, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden [116]. Die Arbeiten von Boyle et al. [10], Bolzer et al. [4] und die in dieser Arbeit untersuchten flachen und unförmigen Karzinomzellkernen waren Motivation für eine Untersuchung der Thematik der relativen radialen **Positionierung**.

Die Anforderungen, welche eine Methode zur relativen radialen Positionierung erfüllen muß, sind, da Modelle für unterschiedlich geformte Zellkerne entwickelt werden sollen, die Formunabhängigkeit und Reproduzierbarkeit des Bezugspunktes. Diese beiden Anforderungen müssen nun mit der biologischen Fragestellung verknüpft werden, welche lautet:

Liegt das biologische Objekt im Zellkern zentral oder peripher?

In kugelförmigen Objekten kann eine zentrale Position mit einem großen Abstand von der Zellkernhülle und einer Position nahe am Schwerpunkt beschrieben werden, beide Aussagen sind äquivalent. In abgeflachten und ellipsoidförmigen Zellkernen sind die beiden Aussagen nicht mehr äquivalent. Wird die Zellkernhülle als Bezugspunkt verwendet, dann entspricht ein großer Abstand von der Zellkernhülle einer zentralen Position und ein kleiner Abstand einer peripheren Position. Ein großer Abstand von der Zellkernhülle kann, muß jedoch nicht, gleichbedeutend mit einem kleinen Abstand vom Schwerpunkt sein. Wird der Schwerpunkt als Bezugspunkt verwendet, dann entspricht ein großer Abstand vom Schwerpunkt einer peripheren und ein kleiner Abstand einer zentralen Position. Ein großer Abstand muß in diesem Fall jedoch nicht gleichbedeutend mit einem kleinen Abstand zur Zellkernhülle sein (siehe Abbildung 1.13).

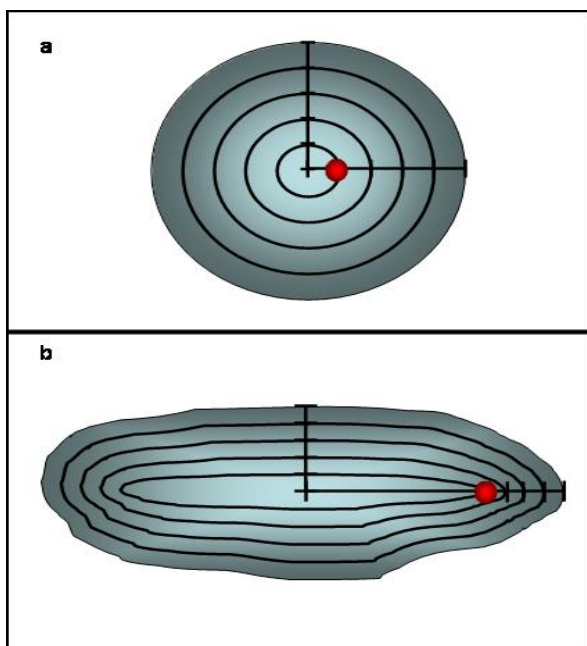


Abbildung 1.13: Schematische Gegenüberstellung der Definition der radialen Position in unterschiedlichen Zellkernformen. In Abbildung a sind die Aussagen, der Abstand des Objektes (rot) vom Schwerpunkt ist klein und der Abstand vom Rand ist groß, äquivalent und die Definition des Begriffes zentral eindeutig. In Abbildung b hat das Objekt vom Rand aus gesehen eine zentrale Position, wie die Isolinien verdeutlichen, weshalb die Position immer noch zentral ist. Der Abstand des Objektes vom Schwerpunkt ist allerdings groß, weshalb die Position des Objektes aus dieser Sicht peripher ist.

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass aus biologischer Sicht die Begriffe zentral und peripher auf die Zellkernhülle bezogen in anderen Aussagen resultieren, als wenn der Schwerpunkt als Bezugspunkt verwendet wird. Aufgrund dieser Unterschiede wird in dieser Arbeit die randbasierte relative radiale Positionierung eingeführt, welche die Zellkernhülle als Bezugspunkt verwendet. In diesem Kontext werden die Methoden der schwerpunkt-basierten und randbasierten relativen radialen Positionierung in dieser Arbeit untersucht und verglichen, wobei die, aus der Anwendung auf biologische Daten, resultierenden Modelle und Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Die randbasierten, relativen radialen Position erhält man, indem zunächst die **minimale** Distanz des Intensitätsschwerpunktes des Objektes von der Zellkernhülle berechnet wird. Anschließend wird diese auf die maximale Minimaldistanz von der Zellkernhülle normiert, der resultierende Wert invertiert und mit 100 multipliziert. Es ergibt sich eine prozentuale Verteilung mit einer radial zentralen Position bei 0% und radial peripheren Position bei 100%, welche einem dem schwerpunkt-basierten Ansatz analogen Wertebereich entspricht. Der Unterschied zwischen dem schwerpunkt-basierten und randbasierten Ansatz ist der Bezugspunkt und die Art der Abbildung. Der schwerpunkt-basierte Ansatz bildet die relativen radialen Streckenverhältnisse ab, der randbasierte die normierten invertierten minimalen Distanzen vom Zellkernrand. In Abbildung 1.14 wird ein Überblick über die genannten unterschiedlichen Ansätze gegeben.

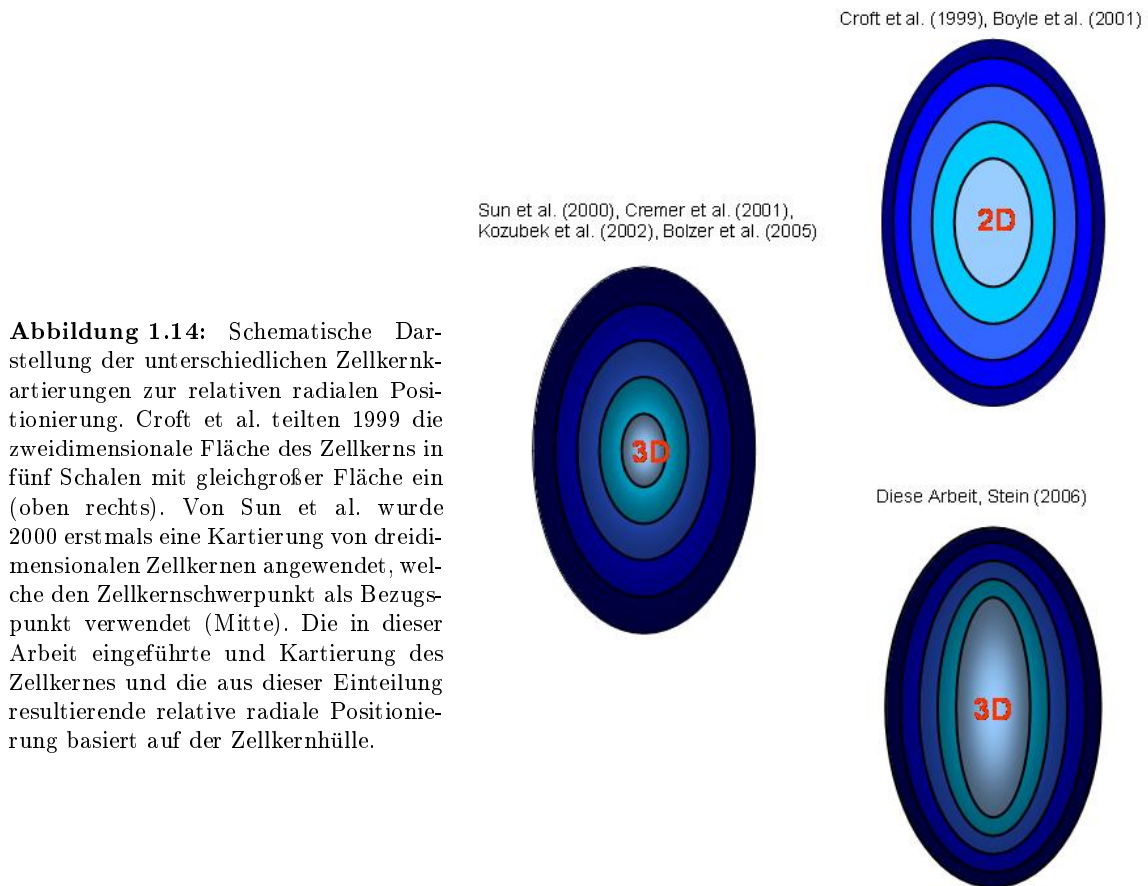


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zellkernkartierungen zur relativen radialen Positionierung. Croft et al. teilten 1999 die zweidimensionale Fläche des Zellkerns in fünf Schalen mit gleichgroßer Fläche ein (oben rechts). Von Sun et al. wurde 2000 erstmals eine Kartierung von dreidimensionalen Zellkernen angewendet, welche den Zellkernschwerpunkt als Bezugspunkt verwendet (Mitte). Die in dieser Arbeit eingeführte und Kartierung des Zellkernes und die aus dieser Einteilung resultierende relative radiale Positionierung basiert auf der Zellkernhülle.

Auf einen Vergleich einer zweidimensionalen DNA-Verteilung mit einer dreidimensionalen Positionierung wurde in dieser Arbeit verzichtet, da Zellkerne dreidimensionale Objekte sind und die Motivation darin bestand, eine dreidimensionale relative radiale Positionierung zu entwickeln und zu untersuchen. Der Vergleich der Algorithmen erfolgt anhand der radialen Positionierung der Chromosomen 18 und 19 in Fibroblasten und der radialen Positionierung des Chromosoms 18 und BCL2 Gens in Cervix-Gewebe. Es werden auch die Differenzen der Einzelmeßwerte der gleichen Chromosomenterritorien in den gleichen Zellkernen miteinander untersucht, um das Ausmaß der Positionierungsunterschiede zu analysieren.

Die neu entwickelte Methode der randbasierten relativen radialen Positionierung basiert auf der Berechnung der minimalen Distanzen zur Zellkernhülle mittels Distanztransformation (=DT), welche allerdings anhand unterschiedlicher Metriken durchgeführt werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Metriken sind die Montanari Metrik und die euklidische Metrik. Die Montanari Metrik wird auf drei Dimensionen erweitert und in einen Chamfering DT Algorithmus implementiert [79] und die euklidische Metrik in einen hier erweiterten Algorithmus von Yamada et al. [118]. Die beiden Algorithmen werden mittels der aus beiden Algorithmen resultierenden absoluten Distanzen von der Zellkernhülle der Chromosomen 18 und 19 miteinander verglichen.

Die Position von Genloci relativ zur Oberfläche von Chromosomenterritorien ist, in Bezug auf die Aktivität der Gene, Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen. Es konnte in einigen Experimenten die periphere chromosomale Position von aktiven Genen nachgewiesen werden [102] [31] [23], während andere Experimente indizieren, dass aktiven Gene auch innerhalb der Chromosomenterritorien zu finden sind [72].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, um die Messung der absoluten dreidimensionalen Distanzen von Genloci von der Chromosomenoberfläche zu ermöglichen, die euklidische DT zusätzlich in weitere Algorithmen implementiert. Anhand dieser Algorithmen wurde anschließend die absoluten dreidimensionalen Distanzen des BCL2 Gens von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 in Cervix-Gewebe gemessen.

Eine vollständige Erfassung der Topologie von Chromatinregionen kann nur erreicht werden, wenn nicht nur die relative radiale Position, sondern auch die absoluten Distanzen, die auf die radialen Streckenverhältnisse normierten Distanzen und die Winkel untersucht werden. Die auf die radialen Streckenverhältnisse normierten Distanzen werden eingeführt, da der Vergleich absoluter Distanzen von Chromatinregionen in unterschiedlichen Zellkerntypen mit unterschiedlicher Form nicht möglich ist. Bisher wurden die absoluten Distanzen auf den mittleren Zellkernradius normiert, was jedoch bei flachen ellipsoiden Zellkernen zu einer Verzerrung der Werte führt. Die Abbildung der radialen Streckenverhältnisse auf eine Einheitskugel und die Berechnung der Distanzen innerhalb dieser Einheitskugel führen auf normierte Distanzen mit einem Wertebereich zwischen 0 und 2 Einheitskugelradien und ermöglichen so einen Vergleich der Distanzen zwischen unterschiedlichen Zelltypen.

Alle entwickelten topologischen Parameter werden auf die Untersuchung der Topologie des Chromosoms 18 und des BCL2 Gens in Cervix-Gewebe angewendet. Das BCL2 Gen ist ein Anti-Apoptose-Gen, welches in die Bildung des Cervix-Karzinom involviert ist. Die verwendeten Zellen des formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Cervix-Gewebes stammen aus der normalen Basal-, Intermediär- und Apikalgewebesicht und der Cervix-Karzinom-Gewebesicht, sodass einerseits die Topologie des Chromosoms 18 und des BCL2 Gens in Bezug auf den Differenzierungsweg und andererseits in Bezug auf die Karzinomentwicklung untersucht wird. Der Differenzierungsweg wird anhand der topologischen Entwicklung des Chromosoms 18 und BCL2 Gens in proliferierenden basalen Zellen hin zu alternden und ru-

henden (G0-Phase) Zellen des intermediären und apikalen Gewebes untersucht. Die Ergebnisse der Topologie in normalem Gewebe werden der Topologie im Cervix-Karzinomgewebe gegenübergestellt und in diesem Kontext diskutiert. Zusätzlich werden die topologischen Ergebnisse im Zusammenhang mit der Expression des BCL2 Proteins betrachtet, sodass erstmals ein vollständiges topologisches Modell in Bezug auf die Differenzierung, Karzinomentwicklung und Expression untersucht wird.

Die Kondensation und Kompaktierung von Chromatin ist, so der Stand des Wissens, korreliert mit dessen transkriptioneller Aktivität. Ein Beispiel hierfür ist der unterschiedliche Kondensationsgrad des X-Chromosoms in weiblichen Zellen, eines der X-Chromosomenterritorien ist kondensiert und inaktiviert, das zweite dekondensiert und aktiviert [35]. Auch alle weiteren bisherigen Ansätze dieser Art, z.B. von Croft et al. [29], Edelmann et al. [34], verwenden die kubischen Voxel als Basisobjekte und berechnen aus diesen die morphologischen Parameter. Für die morphologische Analyse von Chromosomenterritorien wird in dieser Arbeit, in Bezug auf die Genomarchitektur, ein vollständig neuer Ansatz eingeführt. Es werden die Minkowski Funktionale (=MF) eingeführt, welche sich aus konvexen Basisobjekten ableiten, und werden mittels eines integralgeometrischen Ansatzes auf digitale Bildstapel adaptiert [84]. Die implementierten Algorithmen werden auf die Chromosomen 18 und 19 angewendet, da diese, aufgrund ihrer Eigenschaften, ein optimales biologisches Modellsystem bilden, und untersucht, ob die vermuteten morphologischen Unterschiede, z.B. Croft et al. [29], nachgewiesen werden können.

Auch auf der Ebene des einzelnen Gens können bisher keine Aussagen über dessen Kondensationsgrad und Volumen gemacht werden. Die Probleme, welche sich bei einer Volumen- bzw. Kompaktierungsmessung von Chromatin in der Größenordnung eines Gens ergeben, stellen die biologischen Markierungsmethoden und die begrenzte Auflösung der verwendeten Mikroskope dar. Die Markierung von Chromatinregionen, welche mit sichtbarem Licht untersucht werden, erfolgt im Allgemeinen mit einer FISH. Die Untersuchung der Struktur von FISH markierten Regionen erfolgt nur indirekt, indem die emittierten und detektierten Fluoreszenzphotonen die Struktur der Fluorophorverteilung der verwendeten DNA-Sonde wiedergeben, welche, so die Annahme, mit der Struktur des Chromatins korreliert ist. Die aus den Messung resultierenden Meßwerte beziehen sich also immer auf die Fluorophorverteilung. Aussagen über die Struktur des Chromatins sind somit auch nur bei einer Korrelation zwischen der Fluorophorverteilung und dem markierten Chromatin möglich. Auf physikalischer Seite ist die begrenzte Auflösung der Mikroskope ein wesentliches Problem. Das zur Detektion der mittels FISH markierten Chromatinbereiche verwendete CLSM hat z.B. eine Auflösung von lateral ca. 200-250 nm und axial ca. 600-700 nm. Zusätzlich variiert die Auflösung innerhalb von Zellen, aufgrund der Brechungsindexunterschiede, lokal [42] [33]. Die Struktur einer Chromatinregion in der Größenordnung eines Gens, befindet sich jedoch im Bereich der Auflösung, weshalb Aussagen über deren Struktur anhand der resultierenden Intensitätsverteilung mit konventionellen Bildverarbeitungsmethoden nicht möglich sind.

Die gemessene Intensitätsverteilung, welche einer Konvolution der Punktbildfunktion (engl. point spread function=PSF) mit der detektierten Intensitätsverteilung der Fluorophorverteilung der verwendeten DNA-Sonde entspricht, kann jedoch anhand eines Modells beschrieben werden. Als Modellfunktion dient eine zweidimensionale Gaußfunktion, welche, aufgrund der Eigenschaft der Exponentialfunktion, die Additivität der Exponenten, die mathematische Beschreibung der Problematik wesentlich vereinfacht. Die Berechnung der PSF-Halbwertsbreiten und der Halbwertsbreiten der Fluorophorverteilung erfolgt anhand der Standardabweichungen der Gaußfunktion. Aus den Halbwertsbreiten der Fluorophorverteilung können Ellipsoid- bzw.

Kugelvolumina berechnet werden, welche eine Volumenabschätzung der Fluorophorverteilung und somit der markierten Chromatinregion darstellen. Mittels der Volumina und der Länge der verwendeten DNA-Sonde wird anschließend eine Kompaktierung $\frac{MBp}{Volumen}$ der DNA berechnet.

Die entwickelte Methode wurde auf einfarbige Beads und auf zwei einfarbige fluoreszenzmarkierte Chromatinregionen in der Prader-Willi-Syndrom-Region (=PWSR) angewendet, wobei das SNRPN Gen im Markierungsbereich beider verwendeten DNA-Sonden liegt. Das entwickelte Modell wird anhand der Beads getestet und es werden die Halbwertsbreiten der PSF gemessen. Die Anwendung auf biologische Objekte erfolgt anschließend anhand von Chromatinregionen in der PWSR. Über die Gene innerhalb der PWSR ist bekannt, dass nur die Gene des paternalen Chromosoms aktiv sind, also exprimiert werden, während die des maternalen Chromosoms inaktiv sind. Der Mechanismus der für diese Art von Aktivierung bzw. Inaktivierung verantwortlich ist, wird elternspezifische Prägung genannt, und basiert auf dem Prinzip der DNA-Methylierung² [2]. Es liegt somit ein biologisches Modell vor, in welchem ein Chromatinbereich transkriptionell aktiv und der andere inaktiv ist. Die Ergebnisse des zweidimensionalen Gaußmodells werden anschließend mit den Meßergebnissen von J.Rauch [93] verglichen, der 1999 eine spezifische Chromatinregion innerhalb der PWSR mit spektraler Präzisionsdistanzmessung untersuchte.

²Weiterführende Literaturhinweise sind bei [93] zu finden

Kapitel 2

Grundlagen der Optik und Mikroskopie

2.1 Fluoreszenz

Die Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen erfolgt, nach der in situ Hybridisierung, mittels Anregung des Fluoreszenzmoleküle und anschließender Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes. Als Anregung wird die Absorption eines Photons von einem Elektron des Fluoreszenzmoleküls bezeichnet, welches einen elektronischen Übergang aus dem Grundzustand (Singulettzustand S_0) in einen höheren elektronischen Zustand (Singulett S_1) mit gleichzeitig angeregtem Schwingungszustand vollzieht. Der Übergang erfolgt nach dem Franck-Condon-Prinzip, d.h. der Übergang aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand ist aus Potentialsicht für den Zustand am wahrscheinlichsten, dessen Maximum der Wellenfunktion "senkrecht" darüber liegt. Hierbei werden Übergänge in andere Schwingungszustände nicht ausgeschlossen, diese sind nur weniger wahrscheinlich. Innerhalb des angeregten Schwingungsniveaus kommt es, aufgrund der meist schwachen Ankopplung an das Strahlungsfeld und der zusätzlich zwischen Absorption und Emission vorhandenen Wechselwirkung mit anderen Molekülen, zur Relaxation auf einen neuen Gleichgewichtsabstand, also auf ein niedrigeres Schwingungs- und Rotationsniveau. Strahlungslose Übergänge werden zwischen den Rotationsniveaus innerhalb eines Schwingungszustandes bzw. zwischen unterschiedlichen Schwingungszuständen (interne Konversion, engl. internal conversion=IC) und zwischen Singulett S_1 und Triplett T_1 Zustand (engl. inter system crossing=ISC) beobachtet. Eine entscheidende Regel, welche bei der Beobachtung von strahlenden Übergängen zur Anwendung kommt, ist die Kasha-Regel, welche besagt, dass kondensierte Moleküle im allgemeinen nur aus einem angeregten schwingungsfreien Zustand heraus emittieren. Die Emission von Fluoreszenzlicht entspricht einem strahlenden Übergang eines Elektrons aus einem angeregten tiefsten Schwingungsniveau nach dem Franck-Condon-Prinzip in den "senkrecht" darunter liegenden Rotations- bzw. Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes. Die zu beobachtende Phosphoreszenz, welche eine längere Abklingzeit als die Fluoreszenz hat, entspricht hingegen einem Übergang aus dem angeregten Triplett-Zustand in den elektronischen Grundzustand. Ein für die Fluoreszenzmikroskopie entscheidender Unterschied zwischen Absorption und Emission besteht darin, dass die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts größer ist, als die des absorbierten Lichts.

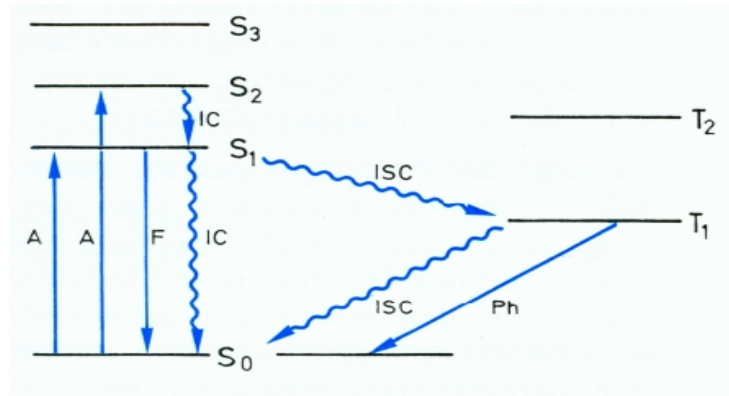


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt ein Jablonski-Termschema, welches die Vorgänge während der Absorption und Emission von Molekülen veranschaulicht. Die Absorption ist mit A, die Fluoreszenz mit F, die interne Konversion mit IC, die Übergänge zwischen Singulett und Triplett mit ISC und die Phosphoreszenz mit Ph gekennzeichnet.

Dieser Effekt wird Stokesverschiebung genannt und resultiert aus der Relaxation und der Kasha-Regel, welche für einen energetisch geringeren Übergang verantwortlich sind [54]. In Abbildung 2.1 ist ein Jablonski-Termschema zu sehen, welches die geschilderten Abläufe verdeutlicht.

2.2 Das konfokale Laserrastermikroskop (=CLSM)

Das konfokale Prinzip wurde von Minsky 1957 vorgestellt und das von ihm konzipierte “Confocal-Stage-Scanning-Optical-System“ 1961 patentiert [75]. Die ersten konfokalen Aufnahmen gelangen 1979 Brakenhoff et al. [11] mit Objektiven hoher numerischer Apertur. Die ersten Überlegungen einer Anwendung von Lasern auf fluoreszierende Objekte wurden 1978 [20] von Cremer et al. und 1982 von Cox et al. [19] veröffentlicht. Das erste CLSM und die erste Anwendung auf biologische Präparate wurde 1985 von Brakenhoff et al. [12] und Carlsson et al. [15] vorgestellt. Heute ist das CLSM ein unentbehrliches Standardwerkzeug in Bezug auf biologische Anwendungen geworden und kommerziell erhältlich.

Der Unterschied zwischen konfokaler und konventioneller Mikroskopie besteht darin, dass in der konfokalen Mikroskopie das zu untersuchende Objekt punktwise abgerastert wird. Die Realisierung dieser Rasterung, welche entlang der lateralen Ebene vollzogen wird, erfolgt entweder durch Bewegung des Objektes oder durch Abtastung mit dem Lichtstrahl. Das so entstehende zweidimensionale Bild kann, indem das zu untersuchende Objekte schrittweise entlang der optischen Achse erneut lateral abgerastert wird, zu einem dreidimensionalen Bild ergänzt werden. Der Name konfokal resultiert aus dem gemeinsamen Fokuspunkt des Anregungs- und Detektionslichts und kann anhand einer schematischen Darstellung eines CLSM (siehe Abbildung 2.2) verdeutlicht werden. Das Anregungslicht, meist ein gaußförmiger kollimierter Laserstrahl, wird, nachdem es einen dichroitischen Strahlteiler durchlaufen hat, mittels eines Objektivs auf einen Punkt fokussiert. Das verwendete Objektiv mit hoher numerischer Apertur $NA = n \sin(\alpha)$, welche durch den Brechungsindex n der Immersion und dem Öffnungswinkel α des Objektivs definiert wird, ermöglicht zusätzliche eine Tiefenschärfe im Bereich von mehreren hundert Nanometern [61]. Die sich im Anregungsstrahlengang befindenden Fluoreszenzmoleküle werden angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht, welches, aufgrund der

Stokesverschiebung, langwelliger ist. Das in Richtung des Objektivs emittierte Fluoreszenzlicht wird über den dichroitischen Strahlteiler und die Tubuslinse auf die Lochblende fokussiert und von einem Photomultiplier detektiert. Die Lochblende ermöglicht es, dass Licht aus dem Bereich außerhalb der Fokusebene nicht detektiert wird. Die in der Abbildung 2.2 zu sehende Scanningeinheit besteht meist aus zwei Spiegeln, welche eine Rasterung des Objektes in laterale Richtung ermöglichen.

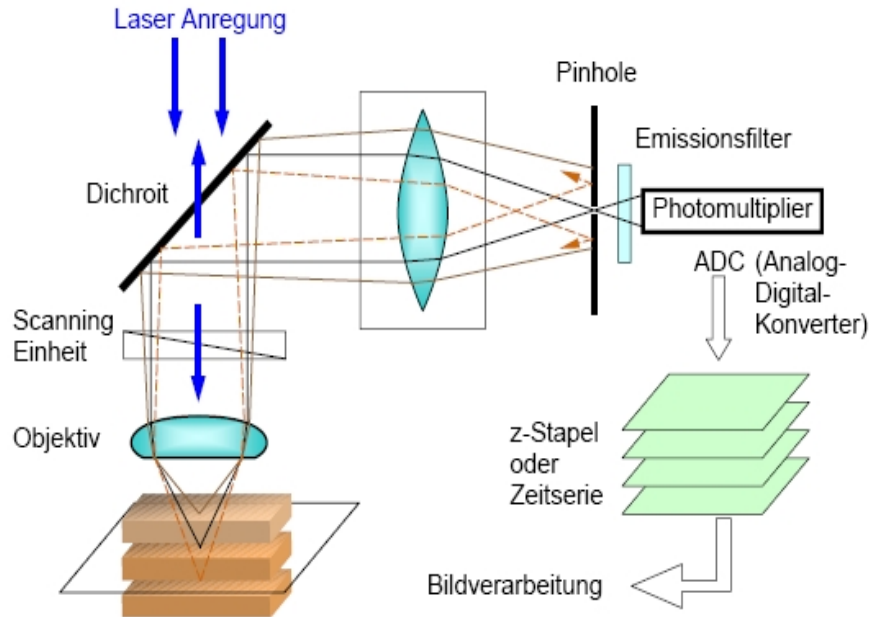


Abbildung 2.2: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Strahlengangs und Aufbaus eines CLSM. (Quelle Dr.Kapitza,Zeiss)

2.3 Bildentstehung am CLSM

2.3.1 Physikalische Grundlagen

Die mathematische Beschreibung des zeitlichen und räumlichen Verhaltens von dielektrischer Verschiebung $\vec{D} = \epsilon\epsilon_0\vec{E}$, magnetischer Feldstärke $\vec{H} = \frac{\vec{B}}{\mu\mu_0}$, Stromdichte \vec{j} und Ladungsdichte ρ erfolgt mit den Maxwellgleichungen, welche die Grundgleichungen der elektromagnetischen Theorie bilden.

$$\operatorname{div}\vec{B} = 0 \quad (2.1)$$

$$\operatorname{rot}\vec{E} + \frac{\partial\vec{B}}{\partial t} = 0 \quad (2.2)$$

$$\operatorname{div}\vec{D} = \rho \quad (2.3)$$

$$\operatorname{rot}\vec{H} - \frac{\partial\vec{D}}{\partial t} = \vec{j} \quad (2.4)$$

$$(2.5)$$

Die ersten beiden Gleichungen werden als homogene Maxwellgleichungen und die letzten beiden Gleichungen als die inhomogene Maxwellgleichungen bezeichnet, wobei die Darstellung der differentiellen Schreibweise entspricht. Im Vakuum gilt die Annahme, dass die Ladungs- und Stromdichten sowie die elektrische Leitfähigkeit Null sind, sodass die resultierenden Maxwellgleichungen homogenen partiellen gekoppelten Differentialgleichungen entsprechen. Durch Bilden der Rotation der Gleichungen 2.3 bzw. 2.5, einsetzen der Gleichungen 2.2 bzw. 2.4 und der Vertauschung der Differentiationen werden die Gleichungen, unter Verwendung der Quellfreiheit der Felder im Vakuum, entkoppelt. Dies zeigt auf, dass alle Komponenten der Felder (allg. U) die Wellengleichung im Vakuum erfüllen.

$$0 = (\Delta - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2})U(\vec{r}, t) \quad (2.6)$$

Lösungen der Wellengleichung sind ebene Wellen und Kugelwellen [49].

2.3.2 Die dreidimensionale Punktbildfunktion des CLSM

Die Abbildung von punktförmigen Objekten mit dem Mikroskop wird mittels der PSF beschrieben. Die folgende Herleitung der PSF des CLSM basiert auf der Annahme, dass sich das Licht in der Nähe und entlang der optischen Achse ausbreitet (paraxiale Approximation). Diese aus dieser Herleitung resultierende PSF entspricht nicht der PSF, welche aus der Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur resultiert, stellt jedoch nach H. Bornfleth eine ausreichende Näherung der PSF dar [6].

Die Herleitung der PSF beginnt mit der Betrachtung der elektromagnetischen Felder des Abbildungsprozesses, wobei diese allgemein als U bezeichnet werden.

Die auf die, als dünne Linse beschriebene, Objektivlinse treffenden ebenen Wellen (zentrales Gaußprofil) werden durch $U_1(x_1, y_1) = U_0$ beschrieben. Die Verteilung des elektromagnetischen Feldes unmittelbar hinter der Linse ergibt sich zu

$$U_2(x_2, y_2) = U_0 \cdot t(x, y) \quad (2.7)$$

wobei $t(x, y)$ der Transmissionsfunktion entspricht. Die Transmissionsfunktion, welche sich aus der Phasenverschiebung des elektromagnetischen Feldes aufgrund der Geometrie der Linse und dem Brechungsindex des Linsenmaterials ergibt, ist für sphärische Linsen mit

$$t(x, y) = P(x, y)e^{\frac{ik}{2f}(x^2+y^2)} \quad (2.8)$$

gegeben, wobei $P(x, y)$ der Pupillenfunktion entspricht. Die Verteilung des elektromagnetischen Feldes in der Fokusebene der Linse kann mittels der vektoriellen Wellengleichung (Gleichung 2.6) hergeleitet werden. Werden die Polarisations-eigenschaften des Lichts vernachlässigt, so ergibt sich eine skalare Form der Wellengleichung (Helmholtz Gleichung), welche die Ausbreitung der räumlichen Komponenten des elektromagnetischen Feldes U beschreibt. Die kirchhoffsche Beugungsgleichung ist, unter Verwendung der kirchhoffschen Randbedingungen, eine Lösung der skalaren Wellengleichung und führt, unter der Annahme, dass die Beobachtung weit entfernt von der Beugungsebene, aber in der Nähe der optischen Achse stattfindet (Fresnel Näherung) [51], auf eine Verteilung des elektromagnetischen Feldes im Fokus f mit

$$U_3(x_3, y_3) = \frac{iU_0}{\lambda f} e^{(ikf)} e^{\frac{ik}{2f}(x_3^2+y_3^2)} \int \int_{-\infty}^{\infty} P(x, y) e^{\frac{ik}{2f}(x_3x+y_3y)} dx dy \quad (2.9)$$

Das Integral in Gleichung 2.9 entspricht der zweidimensionalen Fouriertransformierten der Pupillenfunktion $P(x, y)$. Die Annahme einer kreisförmigen Linse mit dem Radius a

$$P(r) = \begin{cases} 1 & \text{für } \sqrt{x^2 + y^2} = r \leq a \\ 0 & \text{andernfalls} \end{cases}$$

und Transformation der kartesischen Koordinaten des Integrals in Gleichung 2.9 in sphärische Koordinaten ermöglicht es eine Hankel Transformation auszuführen, welche, unter Verwendung von drei vereinfachenden Parameter,

1. Verwendung der numerischen Apertur $NA = \sin\alpha \approx \frac{a}{f}$
2. Einführung der radialen optischen Koordinate $\nu = \frac{2\pi}{\lambda} r_3 \sin\alpha$
3. Einführung der Fresnel Zahl $N = \frac{a^2}{\lambda f}$

auf folgende Gleichung für die Verteilung des elektromagnetischen Feldes führt:

$$U_3(\nu) = U_0 2\pi i N e^{(-ikf)} e^{\frac{i\nu^2}{4N\pi}} \int_0^1 P(\rho) J_0(\nu\rho) \rho d\rho \quad (2.10)$$

Auführen der Integration resultiert in

$$U_3(\nu) = U_0 i\pi N e^{(-ikf)} e^{\frac{i\nu^2}{4N\pi}} \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right) \quad (2.11)$$

Die aus dieser Verteilung des elektromagnetische Feldes resultierende Intensität ergibt sich aus der Multiplikation der Verteilung des elektromagnetische Feldes mit der komplex konjugierten Verteilung zu

$$I(\nu) = (\pi N)^2 \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right)^2 \quad \text{mit } U_0, c = 1 \quad (2.12)$$

und wird Airy Beugungsmuster genannt. Im zentralen Maximum, welches durch das erste Minimum $\nu_{min} = 1.22\pi$ begrenzt ist, konzentriert sich ca. 80% der Intensität. Die axiale Intensitätsverteilung ergibt sich nach Gu [51] aus der Untersuchung der defokussierten Ebene zu

$$I(u) = (\pi N)^2 \left(\frac{\sin(u/4)}{(u/4)} \right) \quad (2.13)$$

wobei $u = \frac{2\pi a^2}{\lambda f^2} \delta z$ der axialen optischen Koordinate entspricht.

Nun wird die PSF eingeführt, welche der Fouriertransformierten der Pupillenfunktion entspricht.

$$h(x, y) = \int \int_{-\infty}^{\infty} P(x_2, y_2) e^{\frac{ik}{d_1}(x_2x + y_2y)} dx_2 dy_2 \quad (2.14)$$

Um ein punktförmigen Objektes $o(x_1, y_1) = \delta(x_1)\delta(y_1)$ mit infinitesimaler Ausdehnung in axialer Richtung, durch eine dünne Linse, kohärent abzubilden, wird das Objekt mit der PSF gefaltet, woraus die Feldverteilung in der Fokusebene resultiert. Die Intensitätsverteilung in der Fokusebene ergibt sich analog zu Gleichung 2.12. Die Verteilung des elektromagnetischen Feldes eines dreidimensionalen Objektes, ergibt sich aus der Konvolution der dreidimensionalen PSF in optischen Koordinaten nach Gu [51]

$$h(\nu, u) = \int_0^1 P(\rho) e^{-i\frac{u}{2}\rho^2} J_0(\rho\nu) 2\pi \rho d\rho \quad (2.15)$$

mit der Objektverteilung und entspricht einer Superposition der Beiträge der einzelnen Ebenen. Wird eine kreisförmige Pupillenfunktion angenommen, so läßt sich für $u = 0$ Gleichung 2.15 in die bereits hergeleitete Gleichung 2.11 überführen.

Die Berechnung der bei einem Abbildungsprozess eines fluoreszenzmarkierten Objektes mit dem CLSM verwendeten PSF wird in zwei Schritte unterteilt, da die Beleuchtung zwar, aufgrund des verwendeten Lasers kohärent ist, der Detektionsvorgang des Fluoreszenzlichtes aber inkohärent ist. Die Inkohärenz ergibt sich aus der unabhängig voneinander stattfindenden Emission von Fluoreszenzlicht der einzelnen Moleküle und resultiert in einer Superposition der Intensitäten. Auch die Größe der Lochblende hat Einfluß auf die PSF, weshalb für das CLSM eine effektive Intensitäts-PSF h_i verwendet wird, die als das Produkt von Beleuchtungs-PSF $h_a(\nu_a, u_a)$ und der mit der verwendeten, aus der Lochblende resultierende, Pupillenfunktion $D(\nu)$ konvolvierten Detektions-PSF $h_e(\nu_e, u_e)$ ausgedrückt werden kann:

$$h_i(\nu, u) = |h_a(\nu_a, u_a)|^2 (|h_e(\nu_e, u_e)|^2 \otimes_2 D(\nu)) \quad (2.16)$$

wobei gilt

$$D(\nu_f) = \begin{cases} 1 & \text{für } \nu \leq \nu_d \\ 0 & \text{andernfalls} \end{cases}$$

$$\begin{aligned} \nu_d &= \text{laterale Koordinate der Lochblende} \\ \otimes_2 &= \text{zweidimensionaler Konvolutionsoperator} \\ \nu_a, \nu_e &= \text{laterale Koordinate des Anregungs- und Emissionslichtes} \\ u_a, u_e &= \text{axiale Koordinate des Anregungs- und Emissionslichtes} \end{aligned} \quad (2.17)$$

Die detektierte Intensitätsverteilung eines dreidimensionalen fluoreszenzmarkierten Objektes, welches an einem Ort \vec{r}_s abgetastet wurde ergibt sich aus Konvolution des effektiven Intensitäts-PSF mit der Objektverteilung $o(\vec{r}_s)$ zu

$$I(\vec{r}_s) = h_i(\vec{r}_s) \otimes_3 o(\vec{r}_s) \quad (2.18)$$

wobei \otimes_3 dem dreidimensionalen Konvolutionsoperator entspricht.

Die Auflösung eines Mikroskops wurde früher anhand des Rayleigh Kriteriums angegeben, welches als Auflösung die Distanz zwischen zwei Signalen definiert, wenn deren Beugungsmaximum (Signal 1) und Beugungsminimum (Signal 2) nicht durch ein Minimum getrennt werden. Heute wird üblicherweise die Halbwertsbreite der PSF verwendet, was dem Halbwertsbreiten-Kriterium (engl. full width half maximum=FWHM) entspricht. Als ausreichende Näherung der effektiven Intensitäts-PSF, innerhalb des FWHM-Kriteriums können die Intensitätsverteilung, die Objektverteilung und die effektive Intensitäts-PSF als Gaußfunktion beschrieben werden (siehe Abbildung 2.3). Der Vorteil der Gaußfunktion besteht darin, dass diese, mathematisch betrachtet, einfacher zu handhaben ist, als die Besselfunktion.

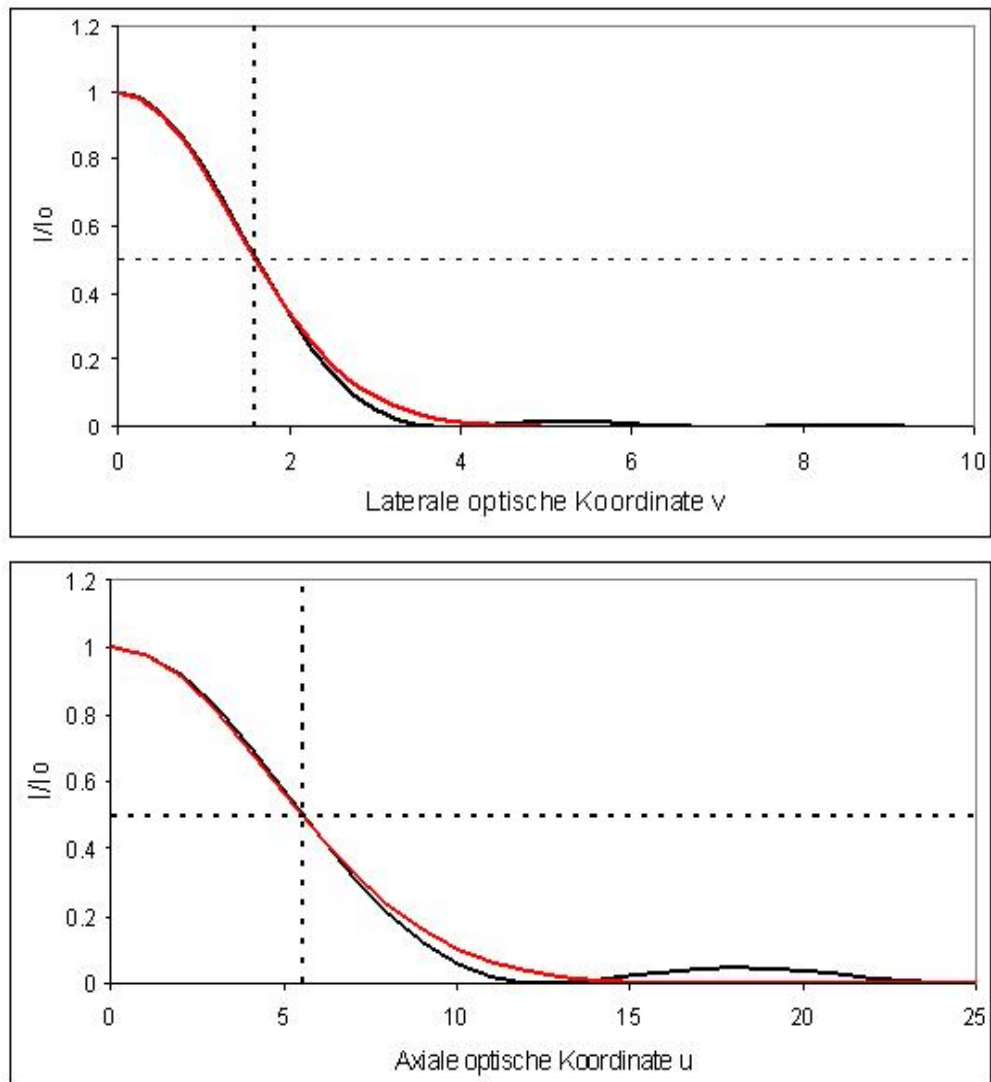


Abbildung 2.3: Die schwarzen Kurven entsprechen der lateralen (Abbildung a) und axialen (Abbildung b) Intensitäts-PSF des CLSM. Die Gaußfunktion (rote Kurve) stellt eine ausreichende Näherung der Intensitäts-PSF, innerhalb des FWHM-Kriteriums (gestrichelte Linien) dar.

Kapitel 3

Ausgleichsrechnung

3.1 Methode der kleinsten Fehlerquadrate

3.1.1 Einführung

Die Methode der kleinsten Fehlerquadrate (engl. least square =LS) ist eine von C.F. Gauß entwickelte Standardmethoden zur Anpassung einer mathematischen Modellfunktion an eine gegebene Stichprobe. Das Prinzip der Methode beruht auf der Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen S zwischen Modellfunktion und Stichprobe. Die Minimierung von S resultiert in einem Gleichungssystem dessen Lösung ein optimaler Parametersatz \hat{a} ist, der die Modellfunktion optimal an die Stichprobe anpaßt. Gegeben sei also eine (annähernd) normalverteilte Stichprobe mit folgender parametrisierter Beschreibung:

- y_i : Der i -te Meßwert in Abhängigkeit von der unabhängigen Variable x_i mit $i = 1 \dots n$
- σ_i : Fehler des Meßwertes y_i
- $f_i(x_i | \vec{a})$: Erwartungswert des Meßwertes y_i , bzw. der Wert der Modellfunktion $f_i(x_i | \vec{a})$ in Abhängigkeit von x_i
- a_j : der j -te Parameter der Modellfunktion $f_i(x_i | \vec{a})$ mit $j = 1 \dots m$. Diese werden optimiert, sodass die Funktion $f_i(x_i | \hat{a})$ mit den Schätzwerte \hat{a} die Stichprobe optimal beschreibt.

Bestimmt werden die Schätzwerte \hat{a} des Parametervektors $\vec{a} \equiv (a_1, \dots, a_m)$ der Modellfunktion $f_i(x_i | \vec{a})$ über die Summe der quadratischen Abweichungen S (=LS-Funktion), die mit

$$S = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - f_i(x_i | \vec{a}))^2}{\sigma_i^2} \quad (3.1)$$

gegeben ist und einer χ^2 -Verteilung folgen. Die Minimierung von S ist gleichbedeutend mit dem Verschwinden $\frac{\partial S}{\partial a_k} = \frac{\partial \chi^2}{\partial a_k} = 0$ der partiellen Ableitung nach dem Parameter a_k . Die partiellen Ableitungen sind gegeben mit

$$\frac{\partial S}{\partial a_k} = -2 \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} (y_i - f_i(x_i | \vec{a})) \frac{\partial f_i(x_i | \vec{a})}{\partial a_k} \quad (3.2)$$

und bilden ein System aus k gekoppelten Gleichungen. Die Lösung des Gleichungssystems liefert die gesuchten optimalen Schätzwerte der Parameter \hat{a} , welche die Summe der quadratischen Abweichung minimieren S_{min} .

Fehler der Parameter

Der Fehler des Parameters a_j folgt aus dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz

$$\sigma_{a_j}^2 = \sum_{i=1}^n \sigma_i^2 \left(\frac{\partial a_j}{\partial y_i} \right)^2 \quad (3.3)$$

Güte der Anpassung

Die Funktion S folgt einer χ^2 -Verteilung, die $n-m$ (=Datenpunkte minus Parameter) Freiheitsgrade und den Erwartungswert $E(S_{min}) = n - m$ hat. Nach dem zentralen Grenzwertsatz für große Freiheitsgrade folgt für die χ^2 -Verteilung, dass diese in eine Normalverteilung übergeht. Die Güte der Anpassung wird dann über das Vertrauensniveau α angegeben, welches dem Integral über die χ^2 -Verteilung oberhalb von S_{min} entspricht.

3.1.2 Anpassung einer linearen Funktion

Werden die in Kapitel 3.1.1 angestellten Überlegung konkretisiert, d.h. wird als Modellfunktion eine allgemeine lineare Funktion

$$f(x | \vec{a}) = a_1 h_1(x) + a_2 h_2(x) + \dots + a_m h_m(x) \quad (3.4)$$

mit angenommen, so kann Gleichung 3.2 zu

$$\sum_{i=1}^n g_i y_i h_k(x_i) = \sum_{j=1}^m [a_j \sum_{i=1}^n g_i h_j(x_i) h_k(x_i)] \quad (3.5)$$

umgeschrieben werden, wobei $g_i = \frac{1}{\sigma_i^2}$ die Gewichte darstellen. Wird das Gleichungssystem als Matrixgleichung beschrieben, so ergibt sich folgende Form

$$\vec{b} = A \cdot \vec{a} \quad (3.6)$$

Die Komponenten des m -dimensionalen Vektors \vec{b} und der $m \times m$ Matrix A ergeben sich aus Gleichung 3.5

$$\begin{aligned} b_k &= \sum_{i=1}^n g_i y_i h_k(x_i) \\ A_{jk} &= \sum_{i=1}^n g_i h_j(x_i) h_k(x_i) \end{aligned} \quad (3.7)$$

Die Lösung der Matrixgleichung, die LS-Schätzwerte der Parameter \vec{a} , erfolgt durch Inversion von Gleichung 3.6

$$\vec{a} = A^{-1} \cdot \vec{b} \quad (3.8)$$

wobei $A^{-1} = C$ der Kovarianzmatrix entspricht.

Fehler des Parameters

Wird Gleichung 3.8 Komponentenweise aufgeschrieben, dann die Ableitung $\frac{\partial a_j}{\partial y_i}$ ausgeführt und

in Gleichung 3.3 eingesetzt und diese umgeformt, so ergibt sich für den Fehler des Parameters a_j .

$$\sigma_{a_j}^2 = \sum_{l=1}^m \delta_{jl} C_{jl} = C_{jj} \quad (3.9)$$

Die Fehler der Parameter entsprechen also den Diagonaleinträgen der Kovarianzmatrix.

3.2 Methode der Lagrangen Multiplikatoren

3.2.1 Einführung

Die im vorigen Kapitel 3.1.1 vorgestellte Methode der kleinsten Fehlerquadrate kann eine triviale Lösung für den gesuchten Parametersatz ergeben, z.B. wenn die zu minimierende Funktion eine implizite Gleichung ist. Dies wird ersichtlich, wenn man Gleichung 3.6 betrachtet. Gilt $\vec{b} = 0$, so ist eine Lösung die triviale Lösung, d.h. der gesuchte optimale Parametersatz wäre $\vec{a} = 0$. Die triviale Lösung kann vermieden werden, indem eine Nebenbedingung aufgestellt wird, die einen Parametersatz $\vec{a} = 0$ als Lösung ausschließt. Resultat ist ein Optimierungsproblem mit Nebenbedingung, welches mittels der Methode der Lagrangen Multiplikatoren gelöst werden kann. Das Lagrange Optimierungsproblem kann also wie folgt beschrieben werden:

- Es ist eine zu minimierende Funktion S (siehe Gleichung 3.1) gegeben, die sich aus dem LS-Ansatz ergibt.
- Es existiert eine Nebenbedingung die einen Parametersatz $\vec{a} \neq 0$ fordert, sodass die triviale Lösung ausgeschlossen wird

Das Lösungsschema des Lagrangen Optimierungsproblems sieht folgendermaßen aus:

1. Die Nebenbedingung ist in die Form $\rho(a) = 0$ zu bringen.
2. Das Gleichungssystem $F(\vec{a}) = S - \lambda\rho(a)$ aufstellen.
3. Ableiten des Gleichungssystems $\frac{\partial F(\vec{a})}{\partial \vec{a}} = 0$, d.h. Extremwerte bestimmen.

Die Extremwertbestimmung führt auf k gekoppelte inhomogene Gleichungen, welche ein Eigenwertproblem darstellen. Die optimalen Schätzwerte der Parameter \hat{a} entsprechen dem Eigenvektor des kleinsten Eigenwertes, wie aus der generellen Lösung von Eigenwertgleichungen ersichtlich ist.

3.2.2 Anwendung auf Ellipsoide

Die experimentell gemessenen Zellkernen werden mit simulierten Zellkernen verglichen, weshalb an diese Ellipsoide angepaßt werden. Die Anpassung eines Ellipsoides im R^3 an eine Menge von Randpunkten eines Zellkernes entspricht, wie in diesem Kapitel dargelegt wird, einem Lagrangen Optimierungsproblem. Ein Ellipsoid ist charakterisiert durch den Mittelpunkt $\vec{m}^t = (m_1, m_2, m_3)$, die Halbachsen $\vec{h}^t = (h_1, h_2, h_3)$ und die Orientierung $\vec{\alpha}^t = (\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3)$. Die Orientierung wird anhand der Eulerwinkel beschrieben, welche die Rotationswinkel um die Koordinatenachsen angeben. Die Darstellung eines Ellipsoids kann mit diesen neun Standardparameter aus einer Einheitssphäre deren Mittelpunkt im Ursprung liegt hergeleitet werden. Die Punkte \vec{x} auf der Oberfläche einer Einheitssphäre in Kugelkoordinaten sei gegeben durch

$$\vec{x} = H\vec{\eta} \quad (3.10)$$

mit

$$H = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \vec{\eta} = \begin{pmatrix} \cos\phi\cos\theta \\ \sin\phi\cos\theta \\ \sin\theta \end{pmatrix} \quad (3.11)$$

und der Bedingung $\|\vec{\eta}\| = 1$. Die Sphäre ist über die Halbachsen, die in Richtung der Koordinatenachsen mit der Länge Eins als Matrix H gegeben sind, und den Winkelanteil, der dem Vektor $\vec{\eta}$ entspricht, vollständig beschrieben. Werden die Halbachsen gestreckt bzw. gestaucht, geht die Matrix H mit den neuen Halbachsen $h^t = (h_1, h_2, h_3)$ in Gleichung 3.10 über in

$$H = \begin{pmatrix} h_1 & 0 & 0 \\ 0 & h_2 & 0 \\ 0 & 0 & h_3 \end{pmatrix} \quad (3.12)$$

und die Sphäre wird in einen Ellipsoid transformiert. Erfolgt eine Rotation R um die Koordinatenachsen und wird der Mittelpunkt vom Ursprung auf die Position $\vec{m}^t = (m_1, m_2, m_3)$ translatiert, geht Gleichung 3.10 in die Form

$$\vec{x} = RH\vec{\eta} + \vec{m} \quad (3.13)$$

über (Eine Darstellung der Rotationsmatrix R ist in [112] zu finden). Auflösen nach $\vec{\eta}$ und quadrieren der Gleichung ergibt

$$\|\vec{\eta}\| = [R^{-1}H^{-1}(\vec{x} - \vec{m})]^2 = 1 \quad (3.14)$$

Ausmultiplizieren und umformen führen auf

$$\begin{aligned} [R^{-1}H^{-1}(\vec{x} - \vec{m})]^2 &= [R^{-1}H^{-1}\vec{x} - R^{-1}H^{-1}\vec{m}]^2 - 1 \\ &= (R^{-1}H^{-1}\vec{x})^2 - 2(R^{-1}H^{-1}\vec{x})(R^{-1}H^{-1}\vec{m}) \\ &\quad + (R^{-1}H^{-1}\vec{m})^2 - 1 \\ &= \vec{x}^t R H^{-2} R^t \vec{x} - 2 R H^{-2} R^t \vec{m} \vec{x} \\ &\quad + \vec{m}^t R H^{-2} R^t \vec{m} - 1 = 0 \end{aligned} \quad (3.15)$$

Die Verwendung der Abkürzungen

$$A = R H^{-2} R^t \quad \vec{b}^t = -2 R H^{-2} R^t \vec{m} \quad c = \vec{m}^t R H^{-2} R^t \vec{m} - 1 \quad (3.16)$$

ergeben eine allgemeine parametrisierte Gleichung eines beliebig orientierten Ellipsoids die folgende Form hat [112] [16]:

$$\vec{x}^t A \vec{x} + \vec{b}^t \vec{x} + c = 0 \quad (3.17)$$

Wird die Matrix A, der Vektor \vec{b} und das Skalar c zu

$$A = \begin{pmatrix} A & D/2 & E/2 \\ D/2 & B & F/2 \\ E/2 & F/2 & C \end{pmatrix} \quad \vec{b} = \begin{pmatrix} G \\ H \\ K \end{pmatrix} \quad c = L \quad (3.18)$$

Ausführen der Matrix- und Vektormultiplikation ergibt eine implizite quadratische Gleichung $f(\vec{x} | \vec{a})$, die als Modellfunktion verwendet wird:

$$\begin{aligned} f(\vec{x} | \vec{a}) &= Ax_1^2 + Bx_2^2 + Cx_3^2 + Dx_1x_2 + Ex_1x_3 + Fx_2x_3 \\ &\quad + Gx_1 + Hx_2 + Kx_3 + L = 0 \end{aligned} \quad (3.19)$$

Mit

$$\vec{a} = (A, B, C, D, E, F, G, H, K, L)^t \quad (3.20)$$

und

$$\vec{z}^t = (x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3, x_1, x_2, x_3, 1)^t \quad (3.21)$$

ergibt sich

$$f(\vec{z} | \vec{a}) = \vec{z}^t \vec{a} = 0 \quad (3.22)$$

Alle Punkte $\vec{x} = (x_1, x_2, x_3)$ die Gleichung 3.19 erfüllen befinden sich auf der Ellipsoidoberfläche. Alle Punkte die nicht auf der Ellipsoidoberfläche liegen haben die algebraische Distanz $|f(\vec{z} | \vec{a})| \neq 0$ von dieser. Für eine Menge n an Datenpunkten ist die Summe der Fehlerquadrate S

$$S = \sum_{i=1}^n (f(\vec{z}_i | \vec{a}))^2 = \sum_{i=1}^n (\vec{z}_i^t \vec{a})^2 \quad (3.23)$$

was der quadrierten algebraischen Distanz entspricht. Summation über i und umformen vereinfacht S zu

$$S = \vec{a}^t \mathbf{Z}^t \mathbf{Z} \vec{a} \quad (3.24)$$

Das Produkt $\mathbf{W} = \mathbf{Z}^t \mathbf{Z}$ wird in der Literatur auch *Scatter matrix* genannt. Da die Minimierung von S und die Lösung des resultierenden Gleichungssystem keine triviale Lösung ergeben soll, wird als Nebenbedingung $\|\vec{a}\| = \vec{a}^t \vec{a} = 1$ gesetzt. Das Lagrange Optimierungsproblem mit der umgeformten Nebenbedingung $\rho(\vec{a}) = \vec{a}^t \vec{a} - 1 = 0$ lautet also

$$\min F(\vec{a}) = S - \lambda \rho(\vec{a}) \quad (3.25)$$

Ausführen der Minimierung führt auf

$$\frac{\partial F(\vec{a})}{\partial \vec{a}} = 2\mathbf{W}\vec{a} - 2\lambda\vec{a} = 0 \quad (3.26)$$

wodurch sich die Eigenwertgleichung

$$\mathbf{W}\vec{a} = \lambda\vec{a} \quad (3.27)$$

ergibt. Der Eigenvektor des kleinsten Eigenwertes, welcher aus der Lösung der Eigenwertgleichung folgt, entspricht den optimalen Schätzwerten des Parametervektors \hat{a} . Abschließend kann aus den Schätzwerte \hat{a} der Ellipsoid dargestellt oder die Halbachsen des Ellipsoids berechnet werden. Für die Berechnung der Halbachsen werden die ersten sechs Schätzwerte des Parametervektors \vec{a} benötigt, sodass die Matrix A aus Gleichung 3.19 gebildet werden kann, die die vollständige Information über die Halbachsen enthält. Eine Singulärwertzerlegung der Matrix A

$$A = \mathbf{U}\mathbf{T}\mathbf{V}^t = \mathbf{U}\mathbf{T}\mathbf{U}^t \quad \text{mit} \quad \mathbf{V}^t = \mathbf{U}^t \quad (3.28)$$

und der Vergleich mit der Abkürzung $A = \mathbf{R}\mathbf{H}^{-2}\mathbf{R}^t$ (siehe 3.15) liefert für die Matrix \mathbf{H} :

$$\mathbf{H} = \mathbf{T}^{-\frac{1}{2}} \quad (3.29)$$

Da die Matrix \mathbf{T} nur Diagonaleinträge hat, was aus der Singulärwertzerlegung folgt, können die Halbachsen direkt aus der Matrix entnommen werden $\vec{h}^t = (h_1, h_2, h_3) = (S_{11}^{-\frac{1}{2}}, S_{22}^{-\frac{1}{2}}, S_{33}^{-\frac{1}{2}})$. Die Rotationswinkel $\vec{\alpha}^t$ und der Mittelpunkt \vec{m}^t können mit den Parametern aus \vec{b} und c in Gleichung 3.18 berechnet werden.

3.3 Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus

3.3.1 Anpassung nichtlinearer Funktionen

Aus Kapitel 2 geht hervor, dass mit einem Mikroskop detektierte biologische Objekte, z.B. ein Gen, als Faltung der Fluorophorverteilung des Objektes mit der PSF dargestellt werden. Gilt die Annahme, dass die Fluorophorverteilung mit der Funktion des biologischen Objektes korreliert, so kann die Fluorophorverteilung aus der gemessenen Intensitätsverteilung bestimmt werden. Als Modellfunktion für die Intensitätsverteilung, die PSF und Fluorophorverteilung wird in jeweils zwei Raumrichtungen eine zweidimensionale Gaußfunktion an die Meßdaten angepaßt wird. Da die Gaußfunktion eine nichtlineare Funktion ist und die bisher eingeführten Methoden nicht ausreichen, um diese an die Meßdaten anzupassen, werden neue Methoden der nichtlinearen Regression eingeführt.

Das Prinzip der nichtlinearen Anpassung ist äquivalent zur linearen Anpassung und die LS-Funktion wird nach Gleichung 3.1 aufgestellt. Die Minimierung der LS-Funktion erfolgt jedoch im allgemeinen iterativ und mit numerischen Methoden, da eine analytische Lösung der Gleichungen zu komplex ist. Der Verlauf des iterativen Prozesses kann hierbei wie folgt beschrieben werden:

1. Gegeben sei ein Set von Startparametern \vec{a}^0 . Die Abschätzung dieser Startparameter ist ein wichtiger Punkt, da lokale Minima und divergierende Lösungen unterdrückt werden sollen.
2. Im i -ten Iterationsschritt sei der minimierende Parametersatz $\vec{a}^i = (a_1^i, \dots, a_m^i)$ gegeben.
3. Suche das Inkrement $\delta\vec{a}^i$ für den $i+1$ -ten Schritt $\vec{a}^{i+1} = \vec{a}^i + \delta\vec{a}^i$, sodass $S(\vec{a}^{i+1}) < S(\vec{a}^i)$ gilt.
4. Der Iterationsprozess wird gestoppt, wenn die Konvergenzbedingung $S(\vec{a}^{i+1}) - S(\vec{a}^i) < \epsilon$ erfüllt ist. Der resultierende Parametersatz wird als optimal angesehen.

Die bekanntesten Verfahren, die diesen iterativen Prozess realisieren, sind das Gradientenverfahren und die Linearisierung der Modellfunktion.

Das Gradientenverfahren

Die in der Mathematik etablierteste Methode der Extremwertberechnung ist das Gradientenverfahren. Das Prinzip dieses Verfahrens ist, dass die Parameter solange anhand des negativen Gradienten in Richtung des Minimums variiert werden, bis die Konvergenzbedingung $S(\vec{a}^{i+1}) - S(\vec{a}^i) < \epsilon$ erfüllt ist. Das Inkrement $\delta\vec{a}^i = -\Delta \cdot \vec{\nabla}_{\vec{a}^i} S$ der Parameter ergibt sich aus der Schrittweite Δ und dem negativen Gradienten $\vec{\nabla}_{\vec{a}^i} S$.

Linearisierung der Modellfunktion

Sind die Startparameter \vec{a}_0 hinreichend nahe an der optimalen Schätzung \hat{a} , so kann die Modellfunktion durch eine Taylorentwicklung linearisiert werden. Mit $\vec{a} = \vec{a}_0 + \delta\vec{a}$ ergibt sich für die Entwicklung der Modellfunktion bis zur ersten Ordnung

$$f(\vec{x} | \vec{a}) = f(\vec{x} | \vec{a}_0) + \sum_{j=1}^m \delta a_j \left(\frac{\partial f(\vec{x} | \vec{a})}{\partial a_j} \right)_{a_0} \quad (3.30)$$

Die resultierende zu minimierende Funktion S ist somit eine Funktion der Parametervariation

$$S(\delta\vec{a}) = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i} [y_i - f(\vec{x}_i | \vec{a})]^2 \quad (3.31)$$

Die weiteren Schritte sind formal identisch zu den Lösungsschritten einer linearen Funktion (siehe Kapitel 3.1.2). Aus der Minimierung ergibt sich ein Gleichungssystem (siehe Gleichung 3.8), dessen resultierender Lösungsvektor nicht \vec{a} , sondern der Variation des Parametervektor $\delta\vec{a}$ entspricht. Die optimalere Schätzung des Parametervektors $\vec{a} = \vec{a}_0 + \delta\vec{a}$ wird dann im nächsten Iterationsschritt als neuer Parametervektor verwendet und der Algorithmus solange iteriert, bis die Konvergenzbedingung erfüllt ist.

3.3.2 Die Levenberg Marquardt Methode

Die in Kapitel 3.3.1 eingeführten Methoden der nichtlinearen Anpassung werden im Levenberg-Marquardt-Algorithmus zu einer Methode verbunden. Die Überlegung hierbei ist folgende. Wenn der Abstand zwischen der aus den Startparametern resultierenden Funktion und dem Minimum groß ist, so ist das Gradientenverfahren optimal, ist der Abstand klein, die Linearisierungsmethode. Die Verbindung beider Methoden wird realisiert, indem das Gleichungssystem $\vec{b} = A \cdot \delta\vec{a}$ nach Gleichung 3.2 gebildet wird und die Diagonaleinträge A_{ii} mit einem Parameter λ gekoppelt werden, sodass gilt $A'_{ii} = A_{ii}(1 + \lambda)$. Der Parameter λ bewirkt, dass für kleine λ Werte der Linearisierungsmethode dominiert und für große die Diagonalelemente, und somit die Gradientenmethode. Der Ablauf der Levenberg-Marquardt-Algorithmus ist dann wie folgt:

1. Stelle die zu minimierende LS-Funktion $S(\vec{x} | \vec{a})$ mit \vec{a}_0 auf und setzt λ auf einen sehr kleinen Wert, z.B. 10^{-4} .
2. Berechne die Variation des Paramametersatzes $\delta\vec{a}$ und die variierte LS-Funktion $S(\vec{x} | \vec{a} + \delta\vec{a})$.
3. Gilt $S(\vec{x} | \vec{a}) < S(\vec{x} | \vec{a} + \delta\vec{a})$, dann multipliziere λ mit einem Faktor 10
4. Gilt $S(\vec{x} | \vec{a}) > S(\vec{x} | \vec{a} + \delta\vec{a})$, dann dividiere λ durch Faktor 10

Die Schritte 2-4 werden solange wiederholt, bis die Konvergenzbedingung $|S(\vec{x} | \vec{a}) - S(\vec{x} | \vec{a} + \delta\vec{a})| < \epsilon$ erfüllt ist.

3.3.3 Anwendung auf die 2D Gaußfunktion

Der im Kapitel 3.3.1 vorgestellte Levenberg-Marquardt-Algorithmus wird nun angewendet, um an die zweidimensional Intensitätsverteilung eines Gens eine zweidimensionale Gaußfunktion

$$f_{gauss}(x_1, x_2) = A \exp\left(-\frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2}{2\sigma_{x_1}^2} - \frac{(x_2 - \bar{x}_2)^2}{2\sigma_{x_2}^2}\right) + b \quad (3.32)$$

anzupaßen, wobei A der Höhe des Maximums, \bar{x}_i den Erwartungswerten, σ_i den Standardabweichungen und b einem Hintergrundparameter entspricht. Der zu optimierende Parametersatz ist gegeben durch $\vec{a}^t = (A, \bar{x}_1, \bar{x}_2, \sigma_{x_1}, \sigma_{x_2}, b)$. Die Anzahl der Datenpunkte sei n mit $i = 1 \dots n$. Die Taylorentwicklung bis zur ersten Ordnung um die Startparameter $\vec{a} = \vec{a}_0 + \delta\vec{a}$ sei

$$f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}) = f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0) + \sum_{j=1}^m \delta a_j \left(\frac{\partial f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a})}{\partial a_j} \right)_{a_0} \quad (3.33)$$

Die Ableitungen $(\frac{\partial f_{gauss}(\vec{x}_i | \vec{a})}{\partial a_j})_{a_0} = J_{ij}$ entsprechen den Einträgen der Jakobi Matrix für den i -ten Datenpunkt und die j -te Ableitung. Die Ableitungen sind allgemein gegeben durch

$$\begin{aligned}\frac{\partial f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0)}{\partial A} &= \exp\left(-\frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2}{2\sigma_{x_1}^2} - \frac{(x_2 - \bar{x}_2)^2}{2\sigma_{x_2}^2}\right) \\ \frac{\partial f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0)}{\partial \bar{x}_k} &= A \cdot (2x_k - 2\bar{x}_k) \cdot \frac{1}{2\sigma_k^2} \exp\left(-\frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2}{2\sigma_{x_1}^2} - \frac{(x_2 - \bar{x}_2)^2}{2\sigma_{x_2}^2}\right) \\ \frac{\partial f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0)}{\partial \sigma_k} &= A \cdot (x_k - \bar{x}_k)^2 \cdot \frac{1}{\sigma_k^3} \exp\left(-\frac{(x_1 - \bar{x}_1)^2}{2\sigma_{x_1}^2} - \frac{(x_2 - \bar{x}_2)^2}{2\sigma_{x_2}^2}\right) \\ \frac{\partial f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0)}{\partial b} &= 1\end{aligned}\tag{3.34}$$

Die zu minimierende Funktion S an die n Datenpunkte mit den Koordinaten $\vec{x} = (x_1, x_2)$, dem Funktionswert y_i und dem Fehler γ_i lautet somit

$$S(\delta \vec{a}) = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\gamma_i} [y_i - f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0) - \sum_{j=1}^m \delta a_j J_{ij}]^2\tag{3.35}$$

Wird $\frac{\partial S}{\partial a_j}$ bzgl. ihrer Parameter minimiert und umgeformt, so ergibt sich das Gleichungssystem

$$\vec{b} = A \delta \vec{a}\tag{3.36}$$

mit

$$b_k = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\gamma_i} [y_i - f_{gauss}(\vec{x} | \vec{a}_0)] J_{ik} \quad A_{jk} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\gamma_i} J_{ij} J_{ik}\tag{3.37}$$

was formal identisch zu Gleichung 3.5 und 3.7 ist. Die zu modifizierenden Einträge der Matrix A sind die Diagonaleinträge der Matrix A mit

$$A_{jj} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\gamma_i} J_{ij} J_{ij} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\gamma_i} J_{ij}^2\tag{3.38}$$

welche den quadrierten Ableitungen aus Gleichung 3.34 entsprechen. Der Steuerparameter λ wird nach

$$A'_{jj} = A_{jj}(1 + \lambda)\tag{3.39}$$

in die Matrix A eingefügt. Der Ablauf des Levenberg-Marquardt-Algorithmus ist analog zu dem in Kapitel 3.3.2 erklärten Ablauf.

Kapitel 4

Parameter zur Charakterisierung der Genomarchitektur

Die Untersuchung der Organisation und Architektur des Genoms in Interphase-Zellkernen findet auf einer Skala statt, die von einigen wenigen nm bis hin zu einigen μm reicht. Der native DNA-Doppelstrang hat einen Durchmesser von 2 nm und ist um die Histone gewunden. Von den Histonen ausgehend bilden sich subchromosomale Regionen, deren Größe bis hin zu einigen hunderte nm beträgt. Die größte Organisationseinheit bilden die Chromosomen, welche einige μm groß sind (siehe Kapitel 1). Die Aufgabe der quantitativen Bildanalyse ist die Definition von Parameter für die verschiedenen Größenordnungen, welche die Topologie und Morphologie der mittels FISH markierten DNA charakterisieren und eine Bezug zwischen den Resultaten und der biologischen Funktionalität herzustellen.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Parameter zur Messung der topologischen Eigenschaften von mittels FISH markierten Chromatinregionen, d.h. deren räumliche Position innerhalb des Zellkernes und relativ zu anderen Genomelementen, werden anhand der relativen radialen Position, der absoluten und normierten Distanzen und Winkel für alle Größenordnungen des Chromatins bestimmt und in den Kapiteln 4.1 und 4.2 erklärt. Die Charakterisierung der Morphologie von Chromosomen, d.h. Objekte oberhalb der Auflösungsgrenze, erfolgt anhand der Minkowski Funktionale in Kapitel 4.3. Eine Methoden zur Untersuchung der Morphologie von fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen im Bereich der Auflösungsgrenze werden im Kapitel 4.4 vorgestellt.

4.1 Die Relative radiale Positionierung

Eine der wesentlichen Fragestellungen der Genomarchitektur ist der Zusammenhang zwischen der relativen radialen Position von Chromosomen, Zentromeren und Genen im Zellkern und deren Aktivitäts- und Ordnungsgrad (siehe Kapitel 1.3). Die relative radiale Position kann anhand einer Kugel mit sphärischen Koordinaten $\vec{x} = (r, \epsilon, \phi)$ verdeutlicht werden (siehe Abbildung 4.1). Die relative radiale Position eines Objektes im Zellkern muß zwei mathematischen Anforderungen genügen, der Bezugspunkt muß reproduzierbar sein und die gewählte Abbildung muß formunabhängig sein.

Es existieren zwei Definitionen, welche diese Anforderungen zu erfüllen :

1. Das Verhältnis des Abstandes Objekt-Ursprung r zum Abstand Kugelrand-Objekt-Ursprung, hier der Radius R der Kugel.
2. Der Abstand des Objektes vom Rand d , relativ zum maximalen Minimalabstand vom Rand, der ebenfalls dem Radius R der Kugel entspricht.

Die unter dem ersten Punkt genannte, bereits vorhandene Positionierung, wird schwerpunkt-basierte, relative radiale Positionierung genannt und im Kapitel 4.1.1 beschrieben. Die zweite Variante, die hier neu eingeführte, wird randbasierte, relative radiale Positionierung genannt und im Kapitel 4.1.2 erklärt.

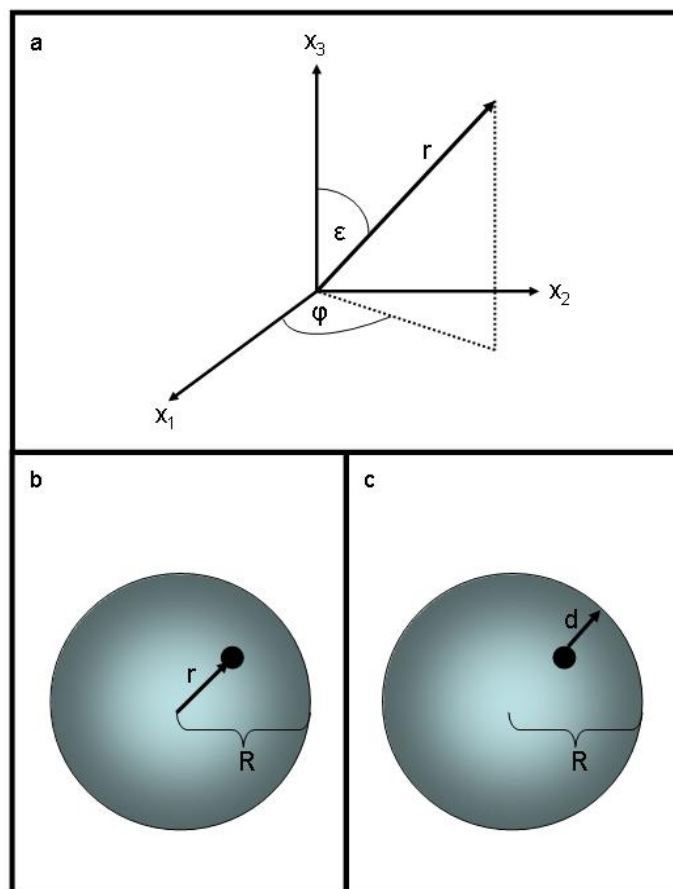


Abbildung 4.1: Abbildung a zeigt ein sphärisches Koordinatensystem, bestehend aus einer radialen Koordinate r und den Winkelkomponenten ϕ, ϵ . Die radiale Kartierung eines Körpers kann entweder mit dem Schwerpunkt als Bezugspunkt (Abbildung b) oder mit der Oberfläche (=Rand) als Bezugspunkt (Abbildung c) realisiert werden. Die schwerpunkt-basierte, relative radiale Position entspricht dem Verhältnis $\frac{r}{R}$, die randbasierte, relative radiale Position dem Verhältnis $\frac{d}{R}$.

4.1.1 Die schwerpunkt-basierte Positionierung

Da für die relative radiale Positionierung ein reproduzierbarer Bezugspunkt innerhalb des Zellkerns gewählt werden muß, wird als solcher der Schwerpunkt gewählt und die schwerpunkt-basierte Positionierung eines Objektes innerhalb des Zellkerns eingeführt.

Der Schwerpunkt S_{Kern} eines Zellkerns ist eine reproduzierbare Größe und definiert als:

$$S_{Kern} = \begin{pmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{1}{V} \int_V x_1 dV \\ \frac{1}{V} \int_V x_2 dV \\ \frac{1}{V} \int_V x_3 dV \end{pmatrix} \quad (4.1)$$

Vom Schwerpunkt S_{Kern} ausgehend, werden die radial auslaufenden Geraden, in Richtung der Punkte $P_i = (P_x, P_y, P_z)$ auf der Oberfläche des Zellkernes, in $m = 1 \dots j$ radial äquidistante Segmente Δn_m eingeteilt (Abbildung 4.2 a). Werden die Endpunkte der m -ten Segmente verbunden, so ergeben sich Isolinien bzw. Isooberflächen, d.h. allen Punkten einer solchen Linie oder Oberfläche ist gemein, dass sie das gleiche Vielfache m haben (Abbildung 4.2 b). Die diskrete relative radiale Position des Schwerpunkts (Gleichung 4.1) eines Objektes O mit den Koordinaten $O_i = (O_x, O_y, O_z)$ ergibt sich aus dem Verhältnis $\frac{m}{j}$, wobei m dem m -ten Segment entspricht, in welchem der Schwerpunkt des Objekts O liegt, und j der maximalen Segmentanzahl in diese radiale Richtung. Liegt ein kontinuierlicher Meßbereich vor, dann ergibt sich die relative radiale Position aus den Streckenverhältnissen

$$\frac{S_{Kern} - O_i}{S_{Kern} - P_i} \quad (4.2)$$

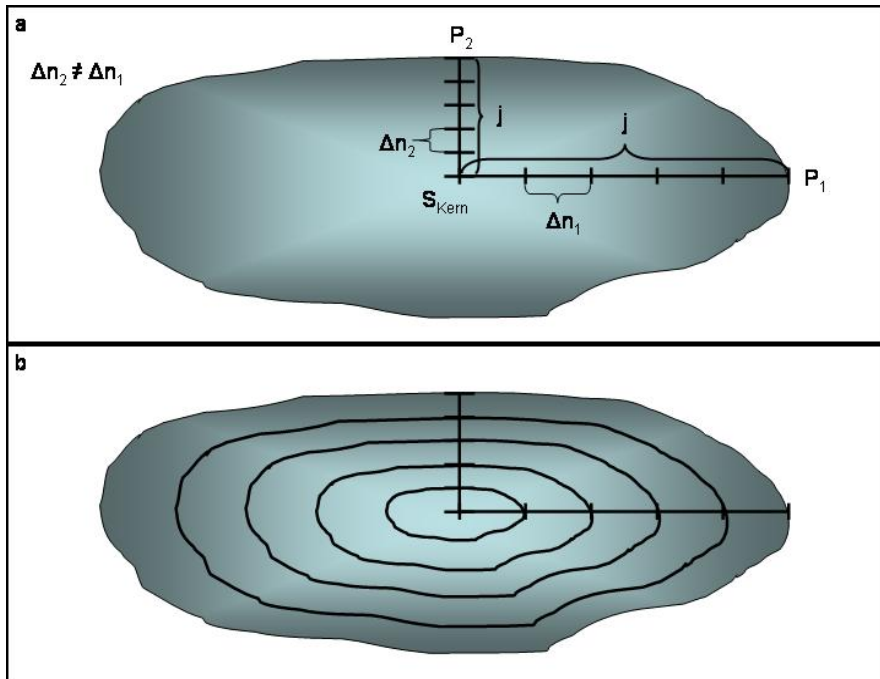


Abbildung 4.2: Die radial vom Schwerpunkt ausgehenden Geraden zu einem Punkt P_i auf der Oberfläche werden in j Segmente Δn_m mit $m = 1 \dots j$ unterteilt. Die Segmente haben für jede radiale Gerade unterschiedliche Längen $\Delta n_1 \neq \Delta n_2$ (Abbildung a). Werden die Punkte mit gleichem m verbunden, so ergeben sich Isolinien bzw. im dreidimensionalen Raum Isooberflächen (Abbildung b), deren Punkten alle den gleichen Segmentabstand m vom Schwerpunkt haben. Die radialen Streckenverhältnisse $\frac{m}{j}$ zweier Punkte, welche auf einer Isolinie liegen, sind gleich, der absolute Abstand vom Zellkernrand ist hingegen unterschiedlich.

Für den diskreten und kontinuierlichen Fall befinden sich alle relativen radialen Positionen in einem Intervall von $[0, 1]$, bzw. kann bei Skalierung mit einem Faktor 100 ein Intervall von $[0, 100]$ definiert werden, welches die prozentuale relative radiale Position angibt. Geometrisch gesehen entspricht die schwerpunktbasierte, relative radiale Positionierung einer Abbildung der vom Schwerpunkt des Zellkerns ausgehenden Streckenverhältnisse auf eine Einheitskugel¹ (Abbildung 4.3). Die schwerpunktbasierte, relative radiale Positionierung ermöglicht es somit, die Position von Objekten in verschieden geformten Zellkernen in Bezug auf ihre radialen Streckenverhältnisse zu vergleichen. Die in der Bildverarbeitung gewählte Anzahl an Segmenten, welche im Zellkern Schalen definieren, beträgt zwischen 5 und 25, wodurch die Genauigkeit der Positionierung festgelegt ist.

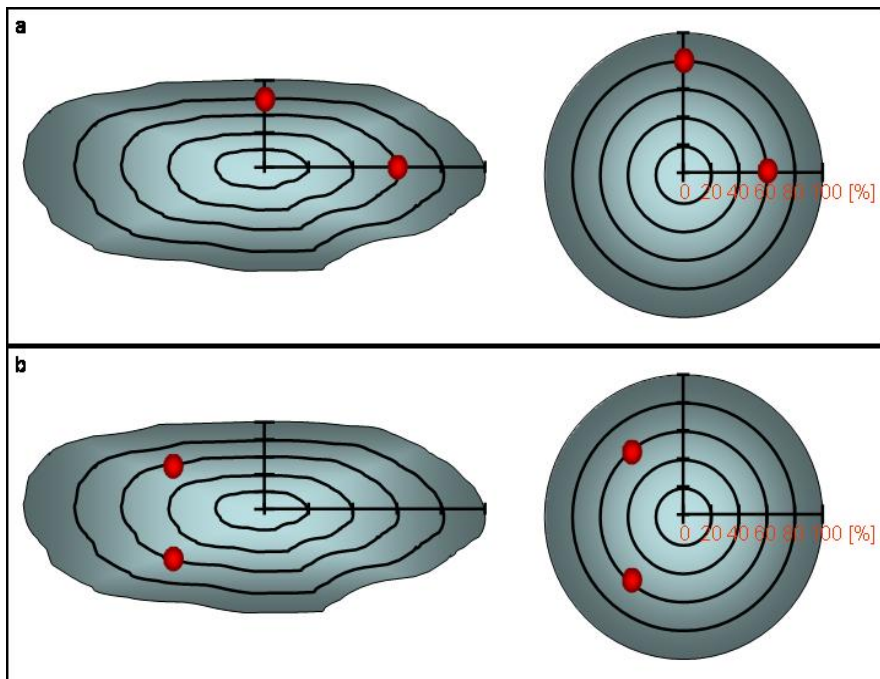


Abbildung 4.3: Die schwerpunktbasierte relative radiale Positionierung bildet die vom Schwerpunkt des Zellkerns ausgehenden radialen Streckenverhältnisse auf eine Einheitskugel ab. Die Abbildung **a** und **b** verdeutlichen dies anhand zweier Beispiele mit je zwei Objekten (rot).

4.1.2 Die randbasierte Positionierung

Eine weitere Möglichkeit der Positionierung ist die Wahl des Zellkernrands als Bezugspunkt. Die orthogonal von einem Punkt P_i auf der Oberfläche ausgehenden Geraden, welche den minimalen Distanzen der Punkte auf dieser Geraden entsprechen, werden in j Segmente Δn_m mit $m = 1 \dots j$ unterteilt. Die Länge der Segmente für alle von der Oberfläche orthogonal auslaufenden Geraden gleich $\Delta n_1 = \Delta n_2$, d.h. Segmente mit gleichem m haben den gleichen absoluten Abstand zum Rand. Werden die vom Rand äquidistanten Punkte miteinander verbunden so ergeben sich Isolinien bzw. Isooberflächen, die alle Punkte mit gleichem absolutem Abstand zum Rand beinhalten.

¹Das Objekte muß die Bedingung der Sternförmigkeit erfüllen

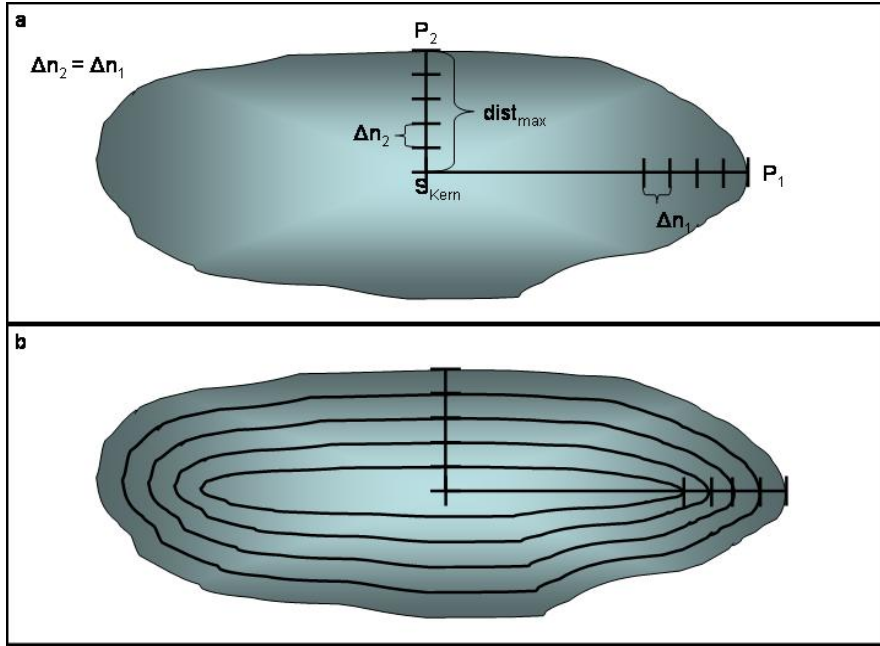


Abbildung 4.4: Die orthogonal von einem Punkt P_i auf der Oberfläche ausgehenden Strecken werden in j Segmente Δn_m mit $m = 1 \dots j$ unterteilt. Die Länge der Segmente ist in alle Richtungen gleich $\Delta n_1 = \Delta n_2$, d.h. Segmente mit gleichem m haben den gleichen absoluten Abstand zum Rand (Abbildung a). Werden die vom Rand äquidistanten Punkte miteinander verbunden so ergeben sich Isolinien bzw. Isooberflächen, die alle Punkte mit gleichem absolutem Abstand zum Rand beinhalten (Abbildung b). Der maximale Minimaldistanz $dist_{max}$ entspricht dem Normierungsfaktor.

Die diskrete randbasierte relative radiale² Position eines Punktes $O = (O_x, O_y, O_z)$, welcher sich in einem Segment m befindet, von einem Punkt $P = (P_x, P_y, P_z)$ auf der Zellkernoberfläche entspricht dem Verhältnis $\frac{m}{j}$. Liegt eine kontinuierlicher Meßbereich vor, dann ergibt sich die randbasierte, relative radiale Position, mit der euklidischen Distanz $dist_{euklid}(P | O)$ zwischen den beiden Punkten

$$dist_{euklid}(P | O) = \sqrt{(P_x - O_x)^2 + (P_y - O_y)^2 + (P_z - O_z)^2} \quad (4.3)$$

aus dem Verhältnis

$$\frac{dist_{euklid}(P | O)}{dist_{max}} \quad (4.4)$$

wobei $dist_{max}$ der maximalen Minimaldistanz (Normierungsfaktor) entspricht. Für den diskreten und kontinuierlichen Fall befinden sich alle relativen radialen Positionen in einem Intervall von $[0, 1]$, bzw. kann bei Skalierung mit einem Faktor 100 ein Intervall von $[0, 100]$ definiert werden, welches die prozentuale relative radiale Position angibt. Geometrisch gesehen entspricht die randbasierte relative radiale Positionierung einer Abbildung der minimalen Distanzen von der Zellkernhülle auf eine Einheitskugel (siehe Abbildung 4.4). Die normierten minimalen Distanzen zum Rand bilden die vom Zellkernrand ausgehenden radialen Streckenverhältnisse in eine Einheitskugel mit einem Wertebereich von $RRP = [0, 1]$ ab. Ein Vergleich zwischen randbasierter und schwerpunktbasierter Positionierung wird ermöglicht, indem die normierten Werte der randbasierten Positionierung invertiert werden. Ein Beispiel einer randbasierten

²Im Weiteren werden die orthogonal auslaufenden Geraden als radial auslaufende Strecken bezeichnet und diese Art der Positionierung wird als randbasierte Positionierung bezeichnet

Positionierung ist in Abbildung 4.5 zu sehen, die Positionen der Objekte (rot) entsprechen denen der Abbildung 4.3. Die randbasierte Positionierung kann zusätzlich auf die Positionierung von Genen relativ zum Chromosomenrand angewendet werden. Hierzu wird die minimale Distanzen eines Objektes von der Chromosomenoberfläche berechnet. Positionen innerhalb eines Chromosoms entsprechen negativen Distanzen, Punkte außerhalb positive Distanzen und Punkte auf der Oberfläche entsprechen der Distanz Null. Die Position des Gens wird als absolute Distanz des Schwerpunktes des Gens von der Chromosomenoberfläche angegeben (siehe Abbildung 4.6).

Abbildung 4.5: Die randbasierte, relative radiale Positionierung bildet die auf die minimale Maximaldistanz normierten orthogonalen Distanzen der beiden Objekte (rot) der Zellkernhülle auf eine Einheitskugel ab. Die Abbildung a und b, in welchen die Objekte (rot) die gleichen Positionen wie in Abbildung 4.3 einnehmen, verdeutlichen dies.

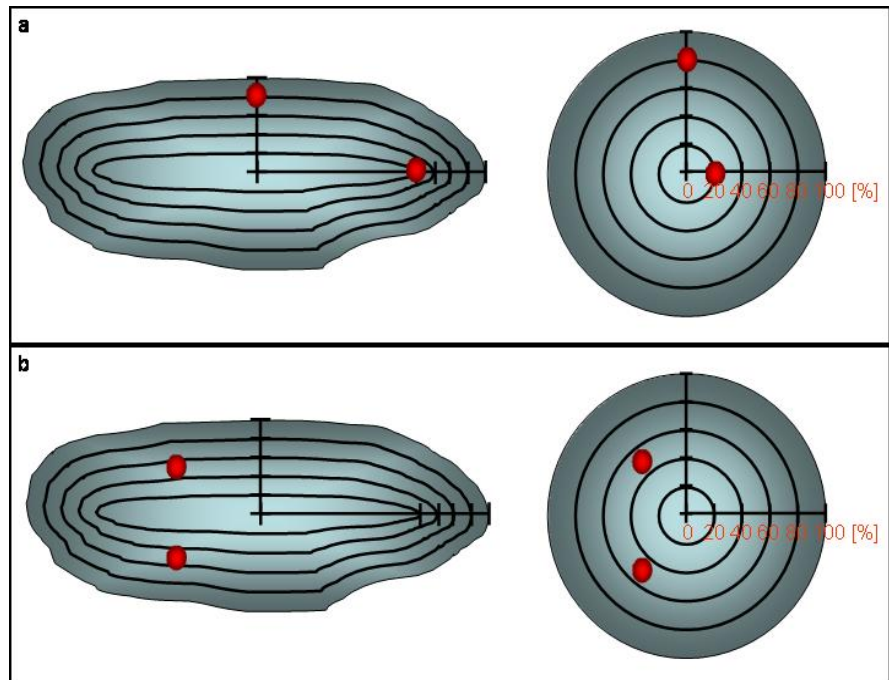
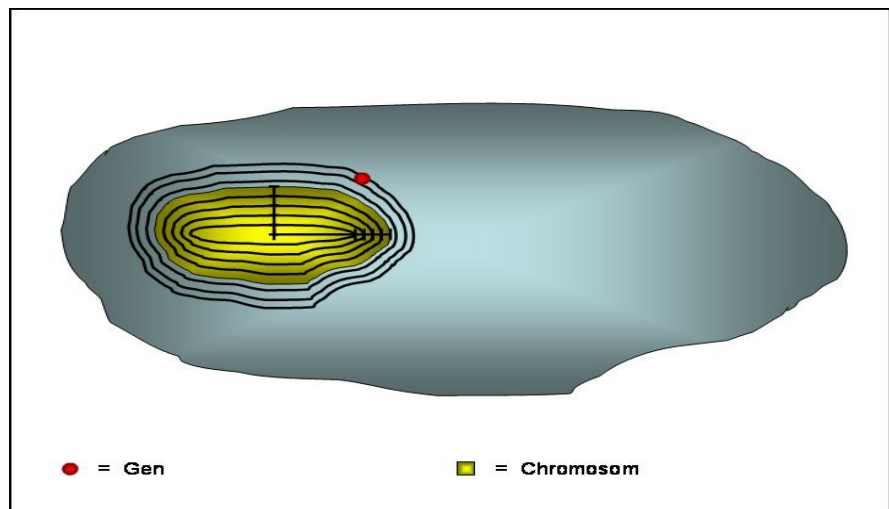


Abbildung 4.6: Die Messung der absoluten Distanz des Gens (rot) von der Chromosomenoberfläche (gelb) erfolgt analog der Messung der absoluten minimalen Distanzen eines Objektes von der Zellkernoberfläche. Eine Position des Gens innerhalb des Chromosoms entspricht eines negativen, eine Position außerhalb einer positiven Distanz.



4.1.3 Biologische Interpretation der Ergebnisse

Die Unterschiede bzgl. der Interpretation der aus den beiden Methoden resultierenden relativen radialen Positionen können anhand eines Beispiels verdeutlicht werden. Abbildung 4.7 zeigt ein Objekt (rot), welches in beiden Zellkernen die gleiche Lage hat. Die aus den beiden Methoden resultierende relative radiale Position ist jedoch unterschiedlich, die schwerpunkt-basierte Positionierung detektiert das Objekt bei 70% des Kernradiuses, während die randbasierte Positionierung das Objekt bei 20% detektiert. Der Unterschied resultiert aus der Verzerrung der schwerpunktbezogenen Position entlang der „großen“ Halbachse, welche, aufgrund der Abflachung des Zellkerns, den Abstand zum Schwerpunkt vergrößert. Der absolute Abstand zweier Schalen der randbasierten Positionierung ist, entlang einer Isofläche, in alle drei Raumrichtungen gleich, der der schwerpunkt-basierten Positionierung hingegen nur in die jeweilige radiale Richtung. Dieses Beispiel verdeutlicht den Einfluß der Form der Zellkerne auf die relative radiale Position. Liegen kugelförmigen Zellkerne vor, sind die aus den beiden radialen Positionierungsmethoden resultierenden Positionen äquivalent, liegen hingegen flache bzw. unförmige Zellkerne vor, so weist die schwerpunkt-basierte Positionierung eine Verzerrung bzgl. der in kugelförmigen Zellkernen gewählten Definition von zentral und peripher auf, die randbasierte Methode hingegen nicht.

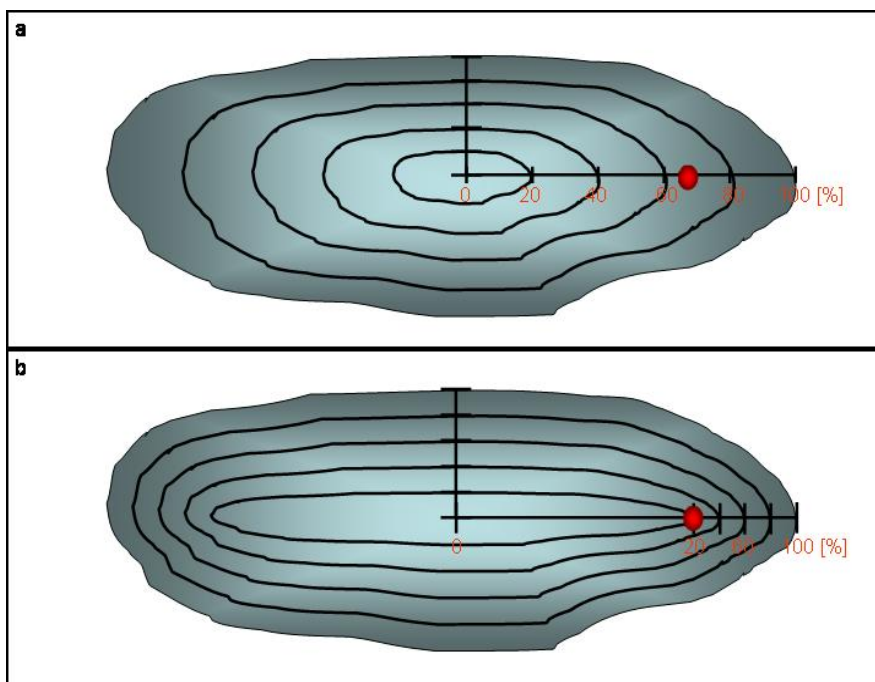


Abbildung 4.7: Die relative radiale Position des zu lokalisierenden Objekts (rot) entspricht bei schwerpunkt-basierter Positionierung 70% und bei randbasierter Positionierung 20%. Aufgrund dieser Diskrepanz muß die Wahl der Methode im Zusammenhang mit der biologischen Fragestellung betrachtet werden.

4.2 Distanzen

4.2.1 Absolute Distanzen

Aus biologischer Sicht ist es interessant, im Zusammenhang mit der biologischen Funktionsweise einer Chromatinregion zu wissen, ob die Distanz zwischen den beiden Regionen sich vergrößert oder verkleinert. Die Berechnung der absoluten euklidischen Distanzen (siehe Gleichung 4.3) zwischen zwei Chromatinregionen erfolgt anhand der Schwerpunkte der beiden Regionen. Die Entfernungen zum Schwerpunkt des Zellkernes bzw. zum Zellkernrand ergeben sich aus den in Kapitel 4.1 vorgestellten Methoden, indem die Normierung der gemessenen Distanzen entfällt. Bei der Verwendung von absoluten Distanzen ist zu beachten, dass eine Veränderung der Zellkernform eine Veränderung der Lage der Objekte und somit eine Veränderung der absoluten Distanzen hervorrufen kann. Aus diesem Grund sind Änderungen der absoluten Distanzen immer in Zusammenhang mit einer Veränderung der Zellkernform und den im folgenden Kapitel vorgestellten normierten Distanzen zu betrachten. Werden die Distanzen in Zellkernen mit gleicher Form untersucht, so kann aus einer Veränderung der absoluten Distanz ein direkter Zusammenhang mit der biologischen Funktion hergestellt werden, werden hingegen Zellkerne mit unterschiedlichen Formen untersucht, so ist dies nicht möglich. In Abbildung 4.8 ist der geschilderte Zusammenhang schematisch dargestellt.

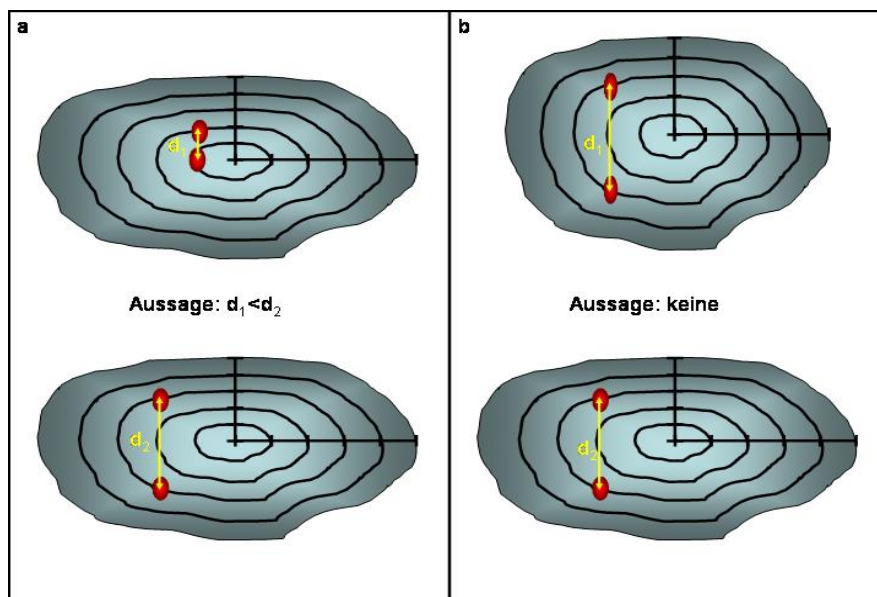


Abbildung 4.8: Die absoluten euklidischen Distanzen der zwei Objekte (rot) im oberen und unteren Zellkern (Abbildung a) ist unterschiedlich, es gilt $d_1 < d_2$. Der Vergleich der beiden absoluten Distanzen ist möglich, da die Form der beiden Zellkerne die Gleiche ist, und die Aussage ist die Distanz zwischen den beiden Objekten hat sich vergrößert. Eine Interpretation der Messung ist möglich. In Abbildung b hingegen ist die Form der beiden Zellkerne und die Distanzen unterschiedlich, es kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob sich die Distanzen aufgrund der Form oder tatsächlich verändert haben. Es ist keine Interpretation der Messung möglich.

4.2.2 Winkel und normierte Distanzen

Die im vorherigen Kapitel angesprochene Problematik der absoluten Distanzen in Abhängigkeit von der Zellkernform kann mittels normierter Distanzen gelöst werden. Die Berechnung der normierten Distanz $dist_{norm}$ erfolgt innerhalb einer Einheitskugel mit einem Wertebereich von $dist_{norm} \in [0, 2]$. Die in Kapitel 4.1.1 eingeführte schwerpunktbasierte Positionierung ermöglicht es die Position zweier Objekte auf den Radius des Zellkerns in die Raumrichtung des Objektes zu normieren und somit in eine Einheitskugel abzubilden. Aus den absoluten euklidischen Distanzen zwischen den Schwerpunkten der Objekte und dem Zellkernschwerpunkt ergibt sich der Schwerpunktwinkel mit dem Kosinussatz (siehe Kapitel 5.5). Der Schwerpunktwinkel und die relativen radialen Positionen ermöglichen die Berechnung der normierten Distanz $dist_{norm}$. Anhand der normierten Distanzen kann der Abstand zweier Chromatinregionen in Zellkernen mit unterschiedlicher Zellkernform innerhalb einer Einheitskugel direkt miteinander verglichen werden. Ein Beispiel für die Anwendung der normierten Distanzen ist in Abbildung 4.9 zu sehen.

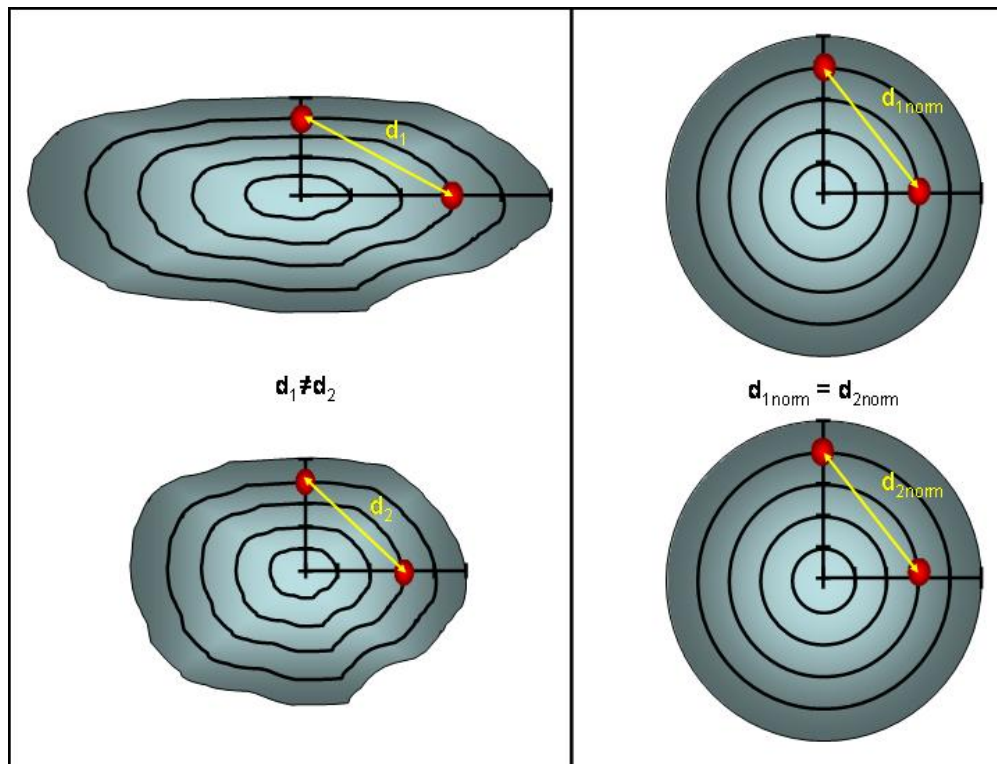


Abbildung 4.9: Anhand der absoluten Distanzen zwischen den zwei Objekten (rot) in den zwei unterschiedlichen Zelltypen (links) ist keine Aussage möglich. Werden die relativen radialen Positionen der Objekte jedoch mittels der schwerpunktbasierten Positionierung in eine Einheitskugel abgebildet, so kann eine Aussage über die Distanzen innerhalb der Einheitskugel gemacht werden. Die normierten Distanzen können, unabhängig vom Zelltyp, miteinander verglichen werden.

4.3 Minkowski Funktionale (=MF)

4.3.1 Einführung

Für die Beschreibung der morphologischen Struktur von Chromosomen in Zellkernen existiert kein aus Experimenten ableitbares vollständiges Modell. Eine quantitative Erfassung von morphologischen Unterschieden zwischen transkriptionell aktiven und inaktiven, sowie genreichen und genarmen, Chromosomen ist jedoch für das Verständnis der Genomarchitektur notwendig. Aus diesem Grund werden die Minkowski Funktionale (=MF) eingeführt. Diese erfassen komplexe Strukturen anhand der Integralgeometrie quantitativ. Die MF sind im dreidimensionalen Raum mit vier grundlegenden geometrischen Parametern: normiertes Volumen, spezifische Oberfläche und spezifische integrierte mittlere und totale Krümmung, assoziiert. Im folgenden Kapitel erhält der Leser eine kurze mathematische Einführung in die Integralgeometrie und eine Herleitung der MF. In Kapitel 4.3.3 wird der Zusammenhang zwischen den MF und der Struktur von Chromosomen hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung des mathematischen Hintergrunds findet der Leser in [84] [60].

4.3.2 Veranschaulichung der MF

Gegeben ist ein zu untersuchendes Objekt O , welches durch eine kompakte konvexe Menge beschrieben wird und Element $O \in C$ des konvexen Rings C im n -dimensionalen euklidischen Raum ist. Das Objekt O wird von den Funktionalen $\phi(O)$ charakterisiert, indem diese dem Objekt reelle Parameter zuordnen. Die Funktionale haben folgenden Eigenschaften:

1. Das Funktional ϕ ist bewegungsinvariant bzgl. der euklidischen Translation und Rotation, d.h es gilt $\phi(mO) = \phi(O)$, wobei m eine euklidische Bewegung ist.
2. Das Funktional ϕ ist additiv, d.h wenn für zwei Objekte $O_1, O_2 \in C$

$$\phi(O_1) + \phi(O_2) = \phi(O_1 \cup O_2) + \phi(O_1 \cap O_2) \quad (4.5)$$

gilt. Die Additivität sichert die Unabhängigkeit der Messungen von der Größe des Meßbereiches.

3. Das Funktional ϕ ist kontinuierlich, d.h wenn gilt

$$\phi(O_i) \rightarrow \phi(O) \quad h(O_i, O) \rightarrow 0 \quad (4.6)$$

wobei $h(O_i, O)$ der Hausdorff-Metrik entspricht. Eine kleine Variation des Objektes O resultiert in einer kleinen Variation des Funktional.

4. Das Funktional ϕ ist monoton, d.h. wenn für zwei Objekte $O_1, O_2 \in C$ mit $O_1 \subseteq O_2$, $\phi(O_1) \leq \phi(O_2)$ folgt. Die Monotonie erlaubt es die Objekte nach der Größe des Wertes des Funktional zu sortieren.

Für räumliche Objekte O betrachten wir die folgenden Funktionale (welche obigen Eigenschaften erfüllen):

1. Das Volumen $V(O)$ des Objektes O
2. Die Oberfläche $S(O)$ des Objektes O

3. Die integrierte mittlere Krümmung $M(O)$ des Objektes O

4. Die integrierte totale Krümmung $K(O)$ des Objektes O

Die geometrische Bedeutung der ersten beiden Funktionale ist selbsterklärend, während die integrierten Krümmungen einer Erläuterung bedürfen. Die Krümmung eines Objektes an einem Oberflächenelement ds des Objektes O entspricht dem inversen Radius $\frac{1}{r}$ des Schmiegunskreises und ist eine Funktion der normalen Richtung einer Schnittebene, welche den Schmiegunskreis enthält. Als Hauptkrümmungen $k_{min} = \frac{1}{r_{min}}$ und $k_{max} = \frac{1}{r_{max}}$ sind die minimalen und maximalen Werte der Krümmungsfunktion definiert. Die mittlere Krümmung entspricht dem arithmetischen Mittel, die totale Krümmung dem Produkt der beiden Hauptkrümmungen. Integration über die Krümmung der gesamten Oberfläche ergibt die Funktionale integrierten mittlere Krümmung $M(O)$

$$M(O) = \frac{1}{2} \int_{\partial O} (k_{min} + k_{max}) \quad (4.7)$$

und integrierten totalen Krümmung $K(O)$

$$K(O) = \int_{\partial O} (k_{min} \cdot k_{max}) \quad (4.8)$$

Aus der integrierten totalen Krümmung kann die Eulerzahl χ über

$$\chi = \frac{K(O)}{4\pi} \quad (4.9)$$

abgeleitet werden, welche anschaulich als die Summe $\chi = l - k + f$ mit $l =$ Komponenten, $k =$ Raumlöcher und $f =$ Kavitäten interpretiert wird (siehe Abbildung 4.10). Hadwigers Charakterisierungstheorem zeigt, dass die eingeführten Funktionale eine Basis $V(O), S(O), M(O)$ und $K(O)$ bilden und mit den Minkowski Funktionalen übereinstimmen (Gilt auch für n -dimensionale Räume mit $n+1$ Funktionalen) [53]. Somit kann jedes Objekt $O \in C$ im dreidimensionalen Raum von vier reellen Werten a_0, a_1, a_2, a_3 und der Basis mit einem Funktional $\phi(O)$ über die Klasse der konvexen Mengen C in der Form

$$\phi(O) = a_0V(O) + a_1S(O) + a_2M(O) + a_3K(O) \quad (4.10)$$

charakterisiert werden, wobei ϕ invariant, additiv und kontinuierlich ist. Die Information über die Orientierung des Objektes ist in der vorliegenden Form der MF, aufgrund der Invarianz, nicht enthalten. Die Anwendung der Integralgeometrie verknüpft die MF mit der Orientierung. Eine Charakterisierung des Objektes, welche eine Orientierungsabhängigkeit enthält, erfolgt über die MF der Schnittebenen, Schnittlinien oder orthogonale Projektionen des Objektes, in eine ausgezeichnete Richtung. Eine Zerlegung der MF in die räumlichen Komponenten, welche die Orientierung des Objektes beschreiben, ist durch die Gleichung von Crofton gegeben [60]

$$X_i(O) = \int_G dE^i \chi(O \cap E^i) \quad (4.11)$$

mit

$$\begin{aligned} X_0(O) &= V(O) \\ X_1(O) &= S(O) \\ X_2(O) &= M(O) \\ X_3(O) &= K(O) \end{aligned} \quad (4.12)$$

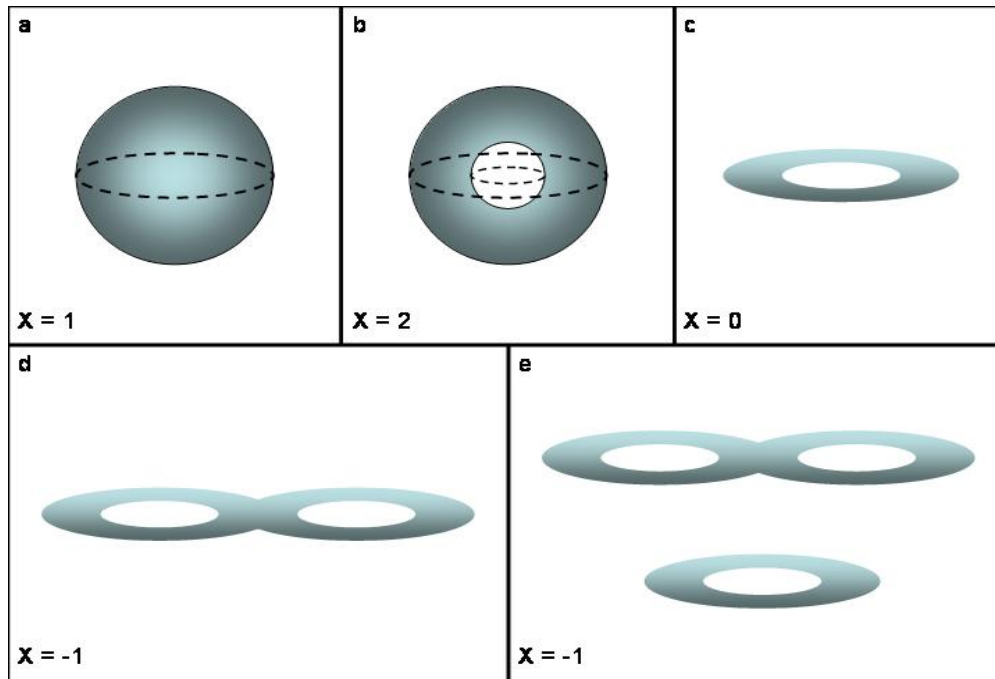


Abbildung 4.10: Abbildung **a** zeigt eine Kugel, also eine Komponente $l = 1$, weshalb die Eulerzahl $\chi = l = 1$ ist. In Abbildung **b** ist zusätzlich eine Kavität $f = 1$ vorhanden, weshalb sich eine Eulerzahl von $\chi = f + l = 2$ ergibt. Der in Abbildung **c** zu sehende Torus hat eine Eulerzahl von $\chi = l - k = 0$, da eine Komponente $l = 1$ und ein Raumloch $k = 1$ vorhanden sind. Ein verbundener Doppeltorus, Abbildung **d** hat eine Eulerzahl von $\chi = l - k = 1 - 2 = -1$, ebenso die Tori in Abbildung **e**. Die Abbildungen **c**, **d** und **e** verdeutlichen einerseits, dass vernetzte Strukturen eine negative und kompakte nicht vernetzte Strukturen eine positive Eulerzahl haben, und andererseits die Definition der Eulerzahl nicht eindeutig ist.

Die Integration erfolgt über alle euklidischen Bewegungen G im dreidimensionalen Raum. Für χ gilt $\chi(O) = 1$ wenn $O \in C$ und $\chi(O) = 0$ wenn $O \notin C$. Das Objekt O wird mit einer n -dimensionalen Ebene E^i geschnitten, d.h. im dreidimensionalen Raum mit einem Punkt, einer Linie, einer Ebene und dem ganzen Raum. Anschaulich kann die Gleichung von Crofton als Integration über die möglichen Schnitte der entsprechenden Dimension mit dem Objekt gesehen werden. Die Oberfläche entspricht z.B. der Anzahl der Schnitte einer Linie, welche in die entsprechenden Raumrichtungen translatiert und rotiert wird, mit dem Objekt. Die Gleichung von Crofton ermöglicht, wie in Kapitel 5.6.2 gezeigt wird, eine Übertragung der kontinuierlichen Definition der MF auf diskrete Gitter, also digitale Bilder.

4.3.3 Biologische Interpretation der MF

Aus den im vorigen Kapitel eingeführten MF können fünf geometrische Parameter abgeleitet werden, welche die Morphologie von Chromatinregionen charakterisieren: Das auf das Zellkernvolumen normierte Objektvolumen, die spezifische Oberflächendichte, die spezifische integrierte mittlere und totale Krümmung und die Eulerzahl. Alle Parameter werden zur Untersuchung und Unterscheidung der Morphologie von Hetero- und Euchromatin von Chromosomen bzw. Chromatinregionen, deren Größe weit oberhalb der Auflösungsgrenze liegt, verwendet. Als Arbeitshypothese dient die Annahme, dass transkriptionell aktive und de-kondensierte Chromatinregionen, im Vergleich zu inaktiven und kondensierten Regionen, bei

gleicher Megabasenanzahl Unterschiede in der Morphologie aufweisen sollten. Die Volumina und die spezifische Oberflächendichte einer ausgedehnten dekondensierten Region sollten größer sein, als die einer kompakten kondensierten Region. Die integrierte mittlere Krümmung hingegen ist ein Maß für die Form der Oberfläche. Regionen mit einer ebenen glatten Oberfläche weisen eine kleinere Krümmung auf als Regionen mit einer gewölbten und komplexen Oberfläche. Die integrierte totale Krümmung, bzw. die anschaulichere Eulerzahl, sind ein Maß für die Vernetzung und die Kompaktheit der DNA-Region, stark negative Werte entsprechen vernetzten Strukturen, kleine positive Werte kompakten Strukturen. In Abbildung 4.11 wird der Unterschied mittels zweier Strukturen verdeutlicht.

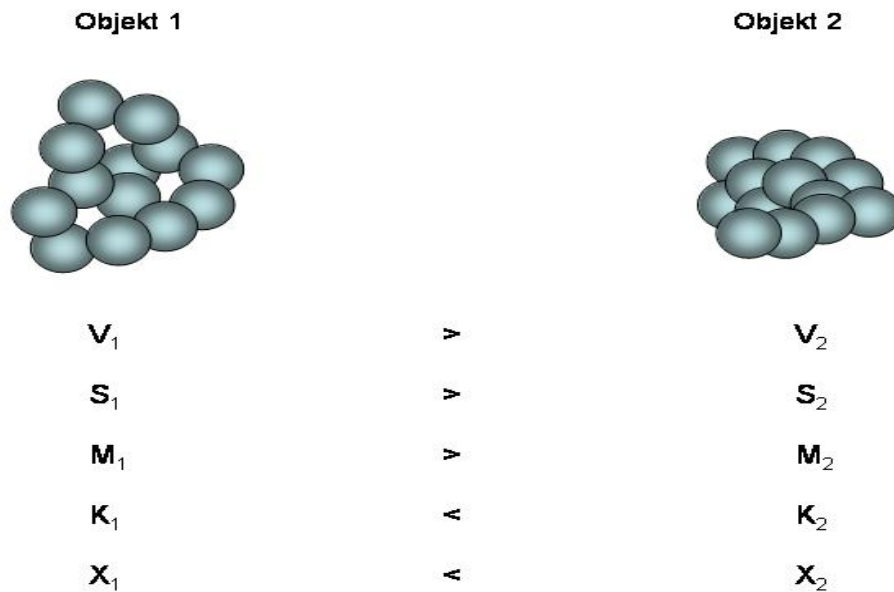


Abbildung 4.11: Die linke Abbildung (Objekt1) zeigt eine weniger dicht gepackte Struktur, die rechte Abbildung (Objekt2) eine kompakte Struktur. Unten sind die Vergleiche in der Größe der einzelnen Parameter zu sehen. Für die Parameter gilt V =Volumen, S =Oberfläche, M =integrierte mittlere Krümmung, K =integrierte totale Krümmung und χ =Eulerzahl.

4.4 Abschätzung der Fluorophorverteilung

Die Struktur von Chromatin nahe oder unter der Auflösungsgrenze des CLSM, z.B. von Genen, ist für biologische Fragestellungen von besonderem Interesse, da aus der Konformation und Größe, Rückschlüsse auf die Aktivität und Organisationsstruktur möglich sind. Die zu untersuchende DNA wird hierbei mittels FISH markiert, weshalb die Detektion der Struktur nur indirekt über die an DNA gekoppelten Fluorophore erfolgt. Aus diesem Grund entsprechen die gemessenen Parameter denen der Fluorophorverteilung, welche, unter der Voraussetzung die zu untersuchende Chromatinstruktur wurde richtig und vollständig markiert, mit denen der markierten DNA korrelieren. Eine weitere Problematik stellt, mathematisch betrachtet, die Konvolution der Fluorophorverteilung mit der PSF des Mikroskopes dar(siehe Kapitel 2). Die zu untersuchende fluoreszenzmarkierte Struktur ist, aufgrund der Konvolution, "verschmiert",

und somit ist eine Charakterisierung mit konventionellen Methoden nicht möglich (siehe Abbildung 4.12).

Als Modellfunktion wird aus diesem Grund sowohl für die Fluorophorverteilung, als auch für die PSF, eine zweidimensionale Gaußfunktion verwendet. Eine Abschätzung des markierten Volumens erfolgt über das Volumen eines Ellipsoids, dessen Halbachsen aus den Halbwertsbreiten einer zweidimensionalen Gaußfunktion, die in alle drei Raumrichtungen an das zu untersuchende Objekt angepaßt wird (siehe Kapitel 3.3.1 und 5.4), berechnet werden. Die Halbwertsbreiten $FWHM_i$ der angepaßten Gaußfunktion ergeben sich aus der Standardabweichung σ_i in die jeweilige Richtung i zu:

$$FWHM_i = \sigma_i \cdot 2.35 \quad (4.13)$$

wobei der Zahlenwert 2.35 die Standardabweichung der Gaußfunktion auf die Größe der Halbwertsbreite skaliert. Die Halbwertsbreite des Objektes $FWHM_i(\text{Objekt})$ kann mit Hilfe der Halbwertsbreite der PSF ($=FWHM_i(\text{PSF})$) aus

$$FWHM_i(\text{Objekt})^2 = \sqrt{FWHM_i^2 - FWHM_i(\text{PSF})^2} \quad (4.14)$$

berechnet werden. Gleichung 4.14 folgt aus der Additivität der Exponenten der Gaußfunktion.

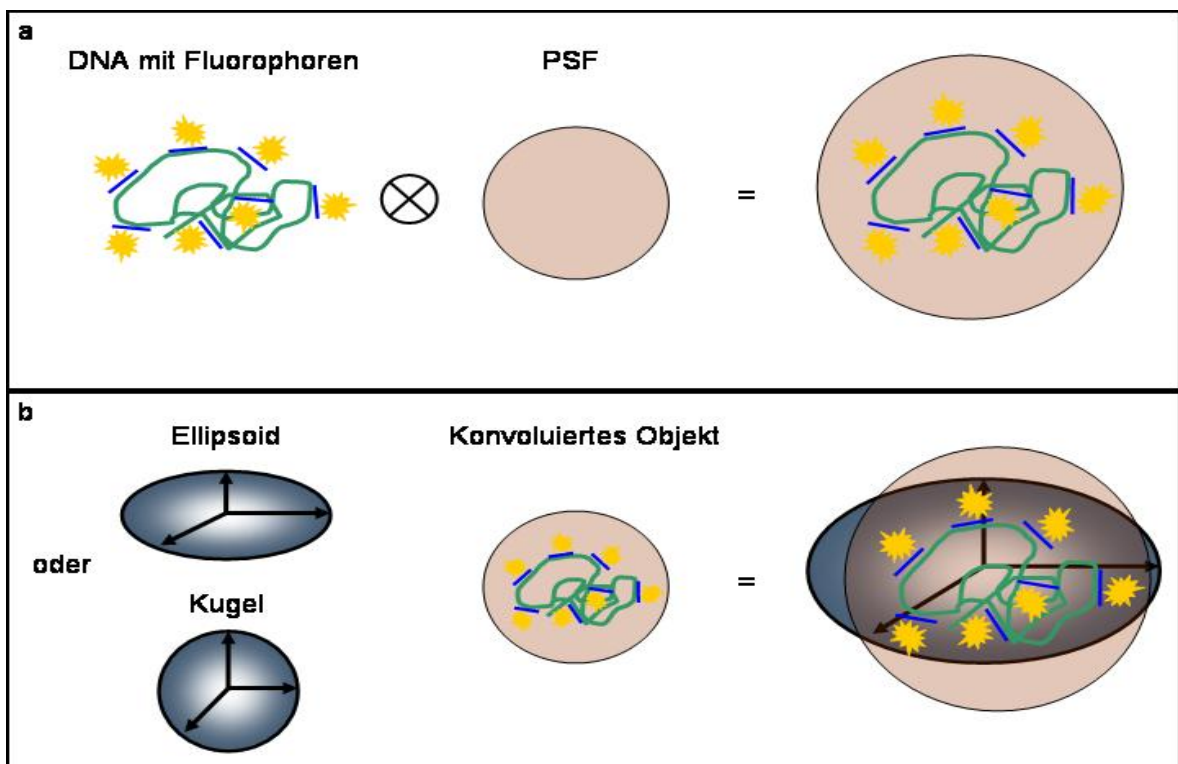


Abbildung 4.12: Abbildung a zeigt eine mittels FISH markierte DNA-Struktur, deren Fluorophorverteilung, durch die Detektion mit dem Mikroskop, mit der PSF (rot) gefaltet wird. Das Resultat ist eine, aufgrund der "Verschmierung" der PSF, nicht zu erkennende Chromatinstruktur bzw. Fluorophorstruktur. In Abbildung b wird das Ellipsoidvolumen oder Kugelvolumen der Fluorophorverteilung ermittelt, indem die Halbachsen oder der Radius anhand der Standardabweichungen der angepaßten zweidimensionalen Gaußfunktionen berechnet werden.

Die Halbwertsbreite der PSF $FWHM_i(PSF)$ wird anhand von Beads gemessen, welche den bekannten Durchmesser d haben. Die Halbwertsbreite der PSF $FWHM_i(PSF)$ ergibt sich aus der gemessenen Halbwertsbreite $FWHM_i(Beads)$, unter der Annahme einer Halbwertsbreite der sphärischen Beads von $\frac{d}{\sqrt{2}}$, zu

$$FWHM_i(PSF) = \sqrt{FWHM_i^2(Beads) - \left(\frac{d}{\sqrt{2}}\right)^2} \quad (4.15)$$

Da die zweidimensionale Gaußfunktion vom Schwerpunkt des Objektes aus in je drei Raumrichtungen angepaßt wird, ergeben sich für jede Halbwertsbreite pro Raumrichtung zwei Schätzwerte. Die Halbachsen $h_i = \frac{FWHM_i(Objekt)}{2}$ des Ellipsoids in die i -te Raumrichtung werden anhand der Mittelwerte $\overline{FWHM_i(Objekt)}$ der zwei Schätzwerte der Halbwertsbreite in die i -te Raumrichtung berechnet. Die Halbachsen ermöglichen es ein Ellipsoidvolumen

$$V_{Ellipsoid} = \frac{4}{3}\pi \cdot h_1 h_2 h_3 \quad (4.16)$$

zu berechnen. Das Volumen einer Kugel kann berechnet werden, indem den lateralen Halbwertsbreiten $R = \frac{h_1+h_2}{2}$ der mittlere Radius R aus berechnet wird. Das Volumen der Kugel ergibt sich aus

$$V_{Kugel} = \frac{4}{3}\pi \cdot R^3 \quad (4.17)$$

Der Unterschied der beiden Verfahren liegt darin, dass das Ellipsoidvolumen zusätzlich die axiale Halbwertsbreite mit einbezieht, während das Kugelvolumen sich nur aus den mittleren lateralen Halbwertsbreiten zusammensetzt. Aus der Anzahl der Basenpaare Z der verwendeten DNA-Sonde kann somit die *Kompaktierung*, die Anzahl der Basenpaare pro Volumen, berechnet werden

$$Kompaktierung_{DNA} = \frac{Z}{V} \quad (4.18)$$

Die berechneten Parameter $V_{Ellipsoid}$, V_{Kugel} und *Kompaktierung* geben eine obere Abschätzung des Chromatinvolumens und der Chromatinkompaktierung wieder.

Kapitel 5

Entwickelte Algorithmen zur quantitativen Bildanalyse

Das Kapitel quantitative Bildanalyse erklärt den Aufbau der entwickelten Algorithmen zur Quantifizierung der Chromatinmorphologie und Chromatintopologie von fluoreszenzmarkierten Objekten innerhalb des Zellkerns, also Chromosomenterritorien, Zentromere und Genregionen. Die im Kapitel 4 eingeführten Parameter werden mit diesen Algorithmen automatisiert berechnet und ausgewertet. Als Bildverarbeitungssoftware wurde das Programm Khoros [1] verwendet, das alle grundlegenden Routineanwendungen der Bildverarbeitung auf einer visuellen Plattform zur Verfügung stellt. Zusätzlich wurden weitere Bibliotheken, Einlese/Ausgabe-Routinen und Programme in C/C++ entwickelt (siehe [58], [33]), die eine automatisierte Bildverarbeitung ermöglichen. Das verwendete Bildformat ist das 8 Bit Kdf-Format, das mehrere zweidimensionale Bilder zu einem dreidimensionalen Stack kombiniert. Zur Lösung der Optimierungs- und Eigenwertprobleme wird die Gnu Scientific Library (=GSL) [50] verwendet. Die GSL bietet ein umfangreiches Paket von Funktionen und Algorithmen an, sodass eine effiziente Implementierung von wissenschaftlichen Fragestellungen unter C/C++ ermöglicht wird.

Die quantitative Bildanalyse von biologischen Objekten ist ein in mehrstufiger Prozeß. Die Vorverarbeitung der Bilder, d.h. die Hintergrundreduzierung und Schwellwertsetzung, ist der erste Schritt, hierbei werden alle Objekte vom Hintergrund isoliert. Als nächster Schritt folgt die Segmentierung, welche die Objekten von den Artefakten trennt, und die Zuweisung einer Objekt Nummer (engl. Labeling). Eine ausführliche Darstellung der Software zur Vorverarbeitung der Bilddaten ist in Kapitel 5.1 zu finden. Dem letzten Schritt, der quantitativen Analyse der selektierten Objekte, d.h. die Messung und Auswertung der im Kapitel 4 vorgestellten Parameter, ist der restliche Teil dieses Kapitels gewidmet. Eine Beschreibung des Programms zur Anpassung eines Ellipsoids ist im Kapitel 5.2 zu finden. Die verschiedenen Algorithmen zur Zellkernkartierung werden im Kapitel 5.3 vorgestellt. Die Thematik der Distanzmessungen wird im Kapitel 5.5 behandelt, der Algorithmus zur Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion an die Fluorophorverteilung von Objekten im Kapitel 5.4 beschrieben und die Berechnung der Minkowskifunktionale wird im den Kapitel 5.6 erklärt. Die verschiedenen Stufen wurden in voneinander unabhängig anwendbaren Programmen implementiert, sodass die einzelnen Programme beliebig miteinander kombiniert werden können.

5.1 Vorverarbeitung der digitalen Bilder

Die Herstellung biologischer Präparate und die anschließende Untersuchung der markierten Strukturen mit dem Mikroskop produziert ein digitales Bild, das Rauschen, Hintergrund und Artefakte beinhaltet. Das Ziel der Vorverarbeitung ist es, das Signal der markierten Objekte zu verstärken, den Hintergrund zu reduzieren und Artefakte auszuschließen. Zusätzlich werden die biologischen Artefakte noch von Rauschen überlagert, dessen Ursache physikalischen Ursprungs ist. Die Problematik der Durchmischung von biologischen und physikalischen Fehlerquellen wäre leicht zu beheben, wenn ein mathematisches Modell (das ein Rauschmodell beinhaltet) der zu untersuchenden Objekte im Zellkern bekannt wäre und dieses durch eine entsprechende Ausgleichsrechnung angepaßt werden könnte. Da dies jedoch nicht der Fall ist, müssen aus der Bildverarbeitung bekannte Algorithmen angewendet werden, deren Ziel die Filterung, Hintergrundreduzierung, Schwellwertsetzung und Segmentierung ist, sodass die vorhandenen Artefakte im Rahmen einer automatisierten Bildanalyse auf reproduzierbare Weise unterdrückt werden.

Die Vorverarbeitung der Daten beginnt mit der Signalverstärkung und Glättung der detektierten Signale. Beides wird mit Binomialfilter realisiert, die auf die Rohdaten angewendet werden. Reproduzierbare Parameter für Hintergrund und Artefakte können anhand des Grauwertistogramms, eine Look up table (=LUT), definiert werden. Die Grauwert LUT reduziert die dreidimensionale räumliche Information und die Intensitätsinformation auf ein zweidimensionales Histogramm, dessen Abszisse dem Grauwert und dessen Ordinate der Häufigkeit des Grauwertes entspricht. Ein Grauwertistogramm eines digitalen Bildes, welches eine optimale Weiterverarbeitung gewährleistet, entspricht einer bimodalen Verteilung. Eine bimodale Verteilung besteht aus zwei getrennten Bereichen mit zwei Maxima (siehe Abbildung 5.1 a und b). Die Verteilung mit dem niedrigeren Grauwertmaximum wird dem Hintergrund, die mit dem höheren Maximum dem Objekt zugeordnet. Im Fall biologischer Präparate sind die Bereiche nicht durch ein Minimum getrennt, die Objekt- und Hintergrundverteilungen liegen sehr dicht nebeneinander und gehen ineinander über, zusätzlich ist nur ein klar definiertes Maximum vorhanden (siehe Abbildung 5.1 c). Als Hintergrund der Aufnahmen eines biologischen Präparates werden alle Grauwerte G definiert die unterhalb des Maximums $G_{Maximum}$ liegen, sodass ein Verlust von Grauwerten, die der Objektverteilung zuzuordnen sind, vermieden wird. Liegt eine optimale Aufnahme vor, so kann an diesem Punkt die Vorverarbeitung beendet werden. Das Resultat der Hintergrundreduzierung ist jedoch ein Bild, in welchem der Hintergrund des Objekträgers korrigiert sind, die aus den biologischen Markierungsverfahren resultierenden Artefakte aber nach wie vor einen deutlich sichtbaren Hintergrundbereich bilden (siehe Abbildung 5.2). Die Ursachen für diese Artefakte sind die schon genannten, fehlerhaft gebundene oder außerhalb der Zelle liegende Sondenreste, Autofluoreszenz (z.B. von Proteinen) usw., deren Grauwertintensität bis in den Objektbereich hineinreicht. Die Unterdrückung dieser Artefakte erfolgt mit Schwellwertverfahren, welche automatisiert einen Schwellwert finden und setzen. Die digitale Bildverarbeitung unterscheidet zwischen globalen, lokalen, kantenbasierten und modellbasierten Schwellwertverfahren. Als globale Verfahren werden in dieser Arbeit in Kapitel 5.1.3 das ISO-Dataverfahren und in Kapitel 5.1.4 das Verfahren nach Otsu vorgestellt. Beide Verfahren arbeiten mit der Annahme eines bimodalen Grauwertistogramms und trennen den Objekt- und Hintergrundbereich der Verteilung nach **reproduzierbaren** Kriterien. Die Segmentierung von Genregionen wird mit einem modellbasierten Verfahren, der Tophatfilterung, realisiert [6]. Die Tophatfilterung verwendet Masken, welche der Halbwertsbreite

der lateralen PSF entsprechen, als Voraussetzung für die Detektion von Objekten nahe der Auflösungsgrenze und arbeitet unabhängig von Grauerthistogrammen.

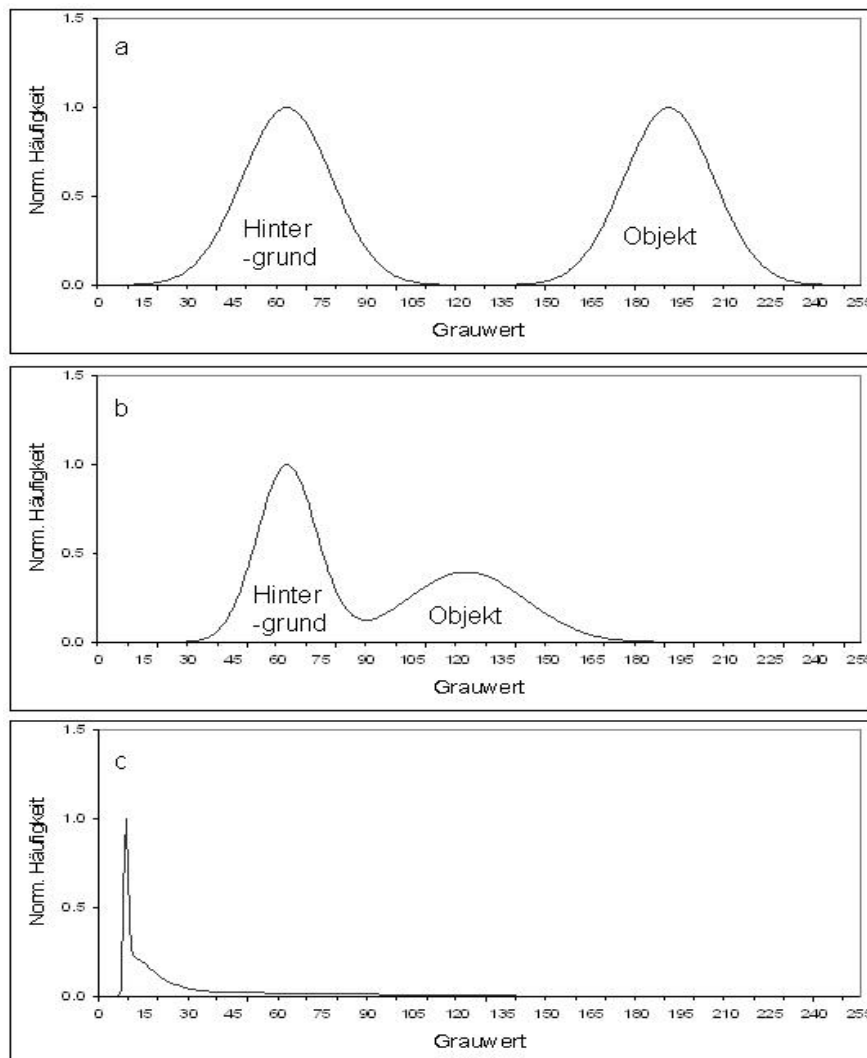


Abbildung 5.1: Abbildung a zeigt ein optimales Grauerthistogramm, der Hintergrund- und Objektbereich können einwandfrei getrennt werden. In Abbildung b ist die Trennung, im Vergleich zu Abbildung a, nicht ganz so eindeutig, dennoch lässt sich hier der Objektbereich vom Hintergrund durch ein Minimum trennen. Abbildung c zeigt das Grauerthistogramm eines biologischen Objektes. Der Hintergrundbereich tritt deutlich mit dem zu sehenden Maximum hervor, während der Objektbereich in den Hintegrund hineinfließt. Es ist kein Minimum zwischen beiden Bereichen vorhanden, sodass diese getrennt werden könnten. Die Abszisse entspricht dem Grauwert, die Ordinate der Häufigkeit des Grauwertes.

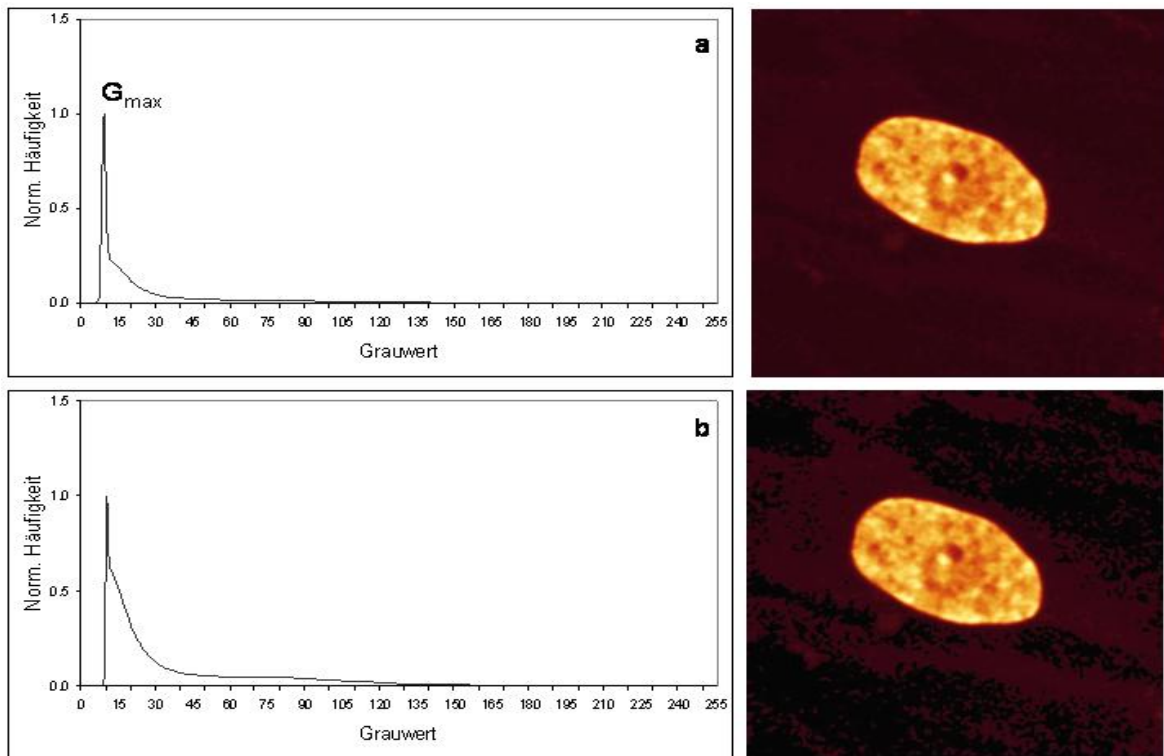


Abbildung 5.2: Abbildung a zeigt das Grauwert histogramm eines Fibroblastenzellkerns vor der Hintergrundreduzierung und Abbildung b danach. Die zugehörigen Bilder zeigen eine mittlere Ebene des Zellkerns vor und nach der Hintergrundreduzierung. Deutlich sichtbar ist der Unterschied zwischen Objekt- und Hintergrundbereich vor und nach der Hintergrundreduzierung. Die Höhe des Hintergrundmaximums $G_{Maximum}$ wurde reduziert, dennoch ist keine eindeutige Trennung der beiden Bereiche möglich (Die Bilder wurden freundlicherweise von Dipl.Biol. Yanina Weiland, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt.)

5.1.1 Filterung

Das Signal zu Rausch Verhältnis von CLSM Aufnahmen ist, wegen der geringen Anzahl von detektierten Photonen, sehr klein. Das Ergebnis ist ein Grauwert histogramm, in welchem die Grauwertintensitäten des zu detektierenden Objektes im Hinteregrundbereich und die der Artefakte im Objektbereich liegen (siehe Abbildung 5.1 c). Aus diesem Grund werden Binomialfilter eingesetzt, diese verstärken das detektierte Signal und somit den Objektbereich und glätten den Hinteregrundbereich [106] [61]. Die Wirkung des Binomialfilters kann an einer mittleren Bildebene des Zellkernes verdeutlicht werden, vor der Filterung überlappen der Objekt- und Hinteregrundbereich, danach sind beide Bereiche getrennt (siehe Abbildung 5.3). Die Filteroperation wird mit dem unter Khoros implementierten Programm *faltung* realisiert, das als Parameter eine Filtermaske verwendet, die in Form eines Textfiles vom Benutzer definiert wird. Die Filterung erfolgt in beide lateralen Richtungen, indem das Programm *faltung* zwei Mal nacheinander in beide Raumrichtungen angewendet wird. Abgeschlossen wird der Filterprozess mit dem Programm *knormal*, dass das Bild in alle drei Raumrichtungen auf 8 Bit renormalisiert. Zellkerne und Chromosomenterritorien vor und nach der Filterung sind in Abbildung 5.4 zu sehen. Für den Zellkern wurde eine Filtermaske verwendet, die diesen, aufgrund der Inhomogenität, stärker glättet, als die markierten Objekte. Wie aus den Ab-

bildungen ersichtlich, bewirkt der Binomialfilter eine Verschmierung der Kanten und somit eine Unschärfe in der Lokalisation der Kanten. Da aber die axiale PSF mehr als die doppelte Halbwertsbreite der lateralen PSF hat, wurde, um eine weitere Erhöhung der Unschärfe in axiale Richtung zu vermeiden, von einer Filterung in axialer Richtung abgesehen.

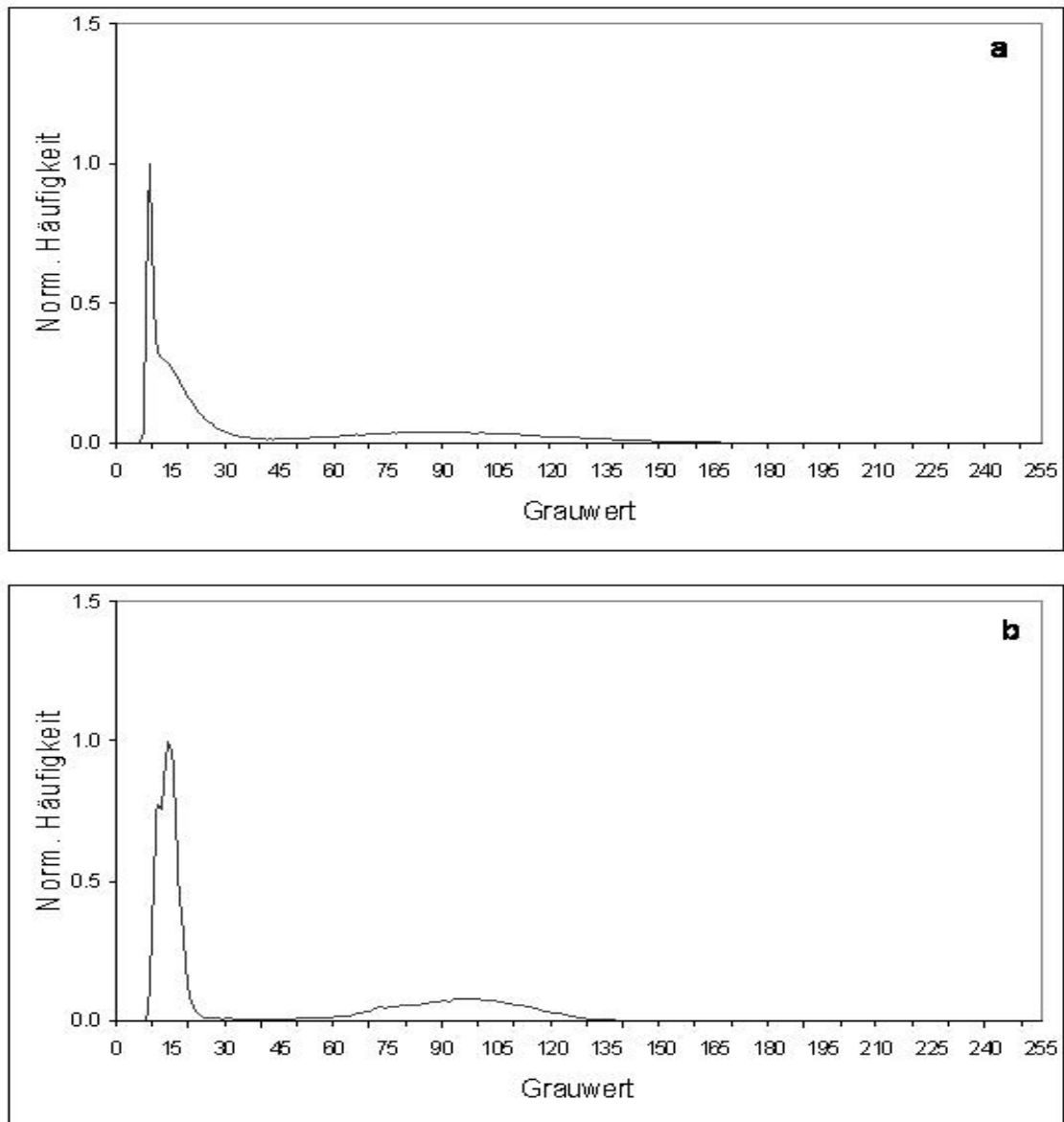
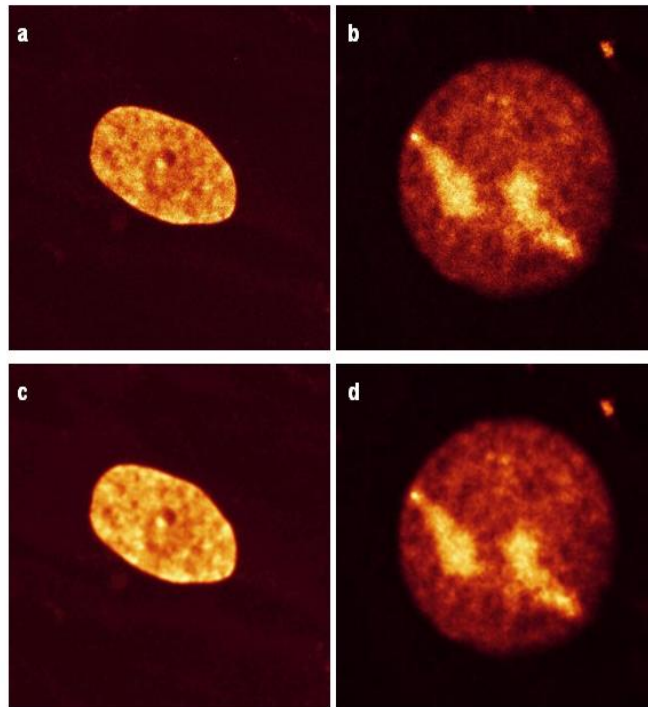


Abbildung 5.3: Abbildung **a** zeigt das Grauwert histogramm eines Zellkernes vor der Anwendung eines Binomialfilters, Abbildung **b** danach. Objekt- und Hintergrundbereich sind nach der Filterung eindeutig zuzuordnen.

Abbildung 5.4: Zu sehen sind Zellkerne und Chromosomenterritorien vor (Abbildung a und b) und nach (Abbildung c und d) der Anwendung eines Binomialfilters. Der Zellkern wurde mit einem stärkeren Binomialfilter gefiltert, sodass die von Artefakten hervorgerufene Inhomogenität unterdrückt wird. Die Chromosomenterritorien wurden mit einem sehr schwachen Filter bearbeitet, um ihre Struktur zu erhalten (Die Bilder wurden freundlicherweise von Dipl.Biol. Yanina Weiland, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt.).



5.1.2 Hintergrundreduzierung

Die Hintergrundreduzierung wurde in zwei verschiedenen Programmvarianten *Hintergrund_global* und *Hintergrund_lokal* implementiert. In der ersten Variante wird das Maximum des globalen Grauwertistogramms ermittelt, in der zweiten Variante das Maximum des lokalen Grauwertistogramms jeder lateralen Bildebene. Der grundlegende Programmablauf ist in beiden Varianten äquivalent:

1. Erstellen des Grauwertistogramms für den ganzen Bildstapel oder jede zweidimensionale Bildebene
2. Suche des Maximums für das vorliegende Grauwertistogramm
3. Auf Null setzen der Grauwerte $G < G_{Maximum}$

Abbildung 5.5 zeigt den Unterschied zwischen lokaler und globaler Variante auf, das globale Hintergrundmaximum liegt unterhalb des lokalen. Der Grund für diesen Unterschied ist die Schwankung des Hintergrundes jeder Bildebene, welche vom lokalen, aber nicht vom globalen Algorithmus erkannt wird. Auch die Trennung des Objekt- und Hintergrundbereiches ist bei der lokalen Variante deutlicher, da der relative Anteil an Objektvoxeln größer ist. Liegen optimale biologische Präparate vor, dann ist keine Schwellwertsetzung nötig. Das Bild wird mit den Programmen *delete_obj* und *Label_3D* segmentiert [33] und die Artefakte werden von den interessierenden Objekten getrennt. Abbildung 5.5 zeigt auf, dass dieser "Idealfall" nicht erreicht wird, weshalb Schwellwertverfahren angewendet werden müssen und die Objekte erst anschließend segmentiert werden können.

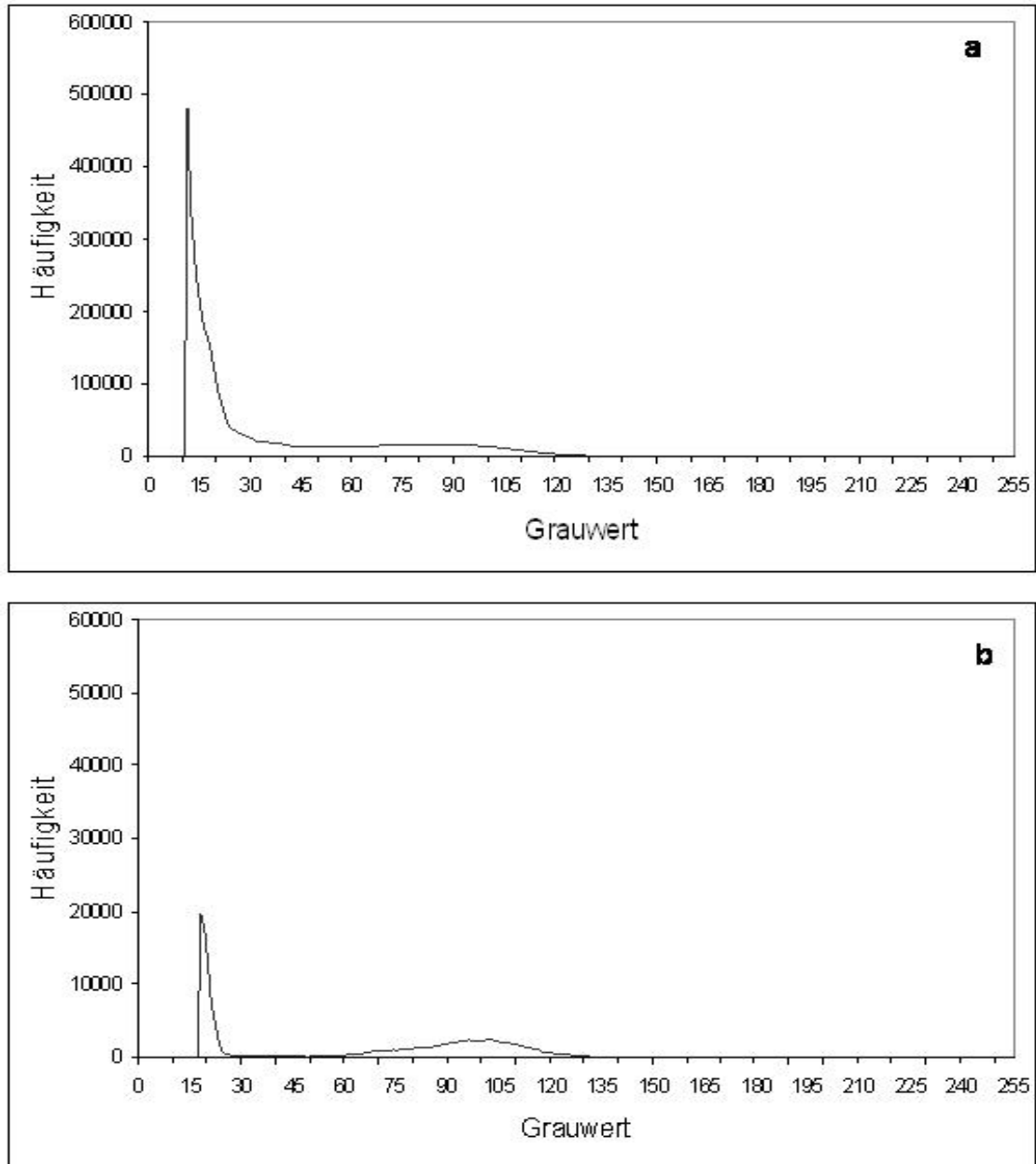


Abbildung 5.5: Das globale Grauwerthistogramm (Abbildung a) nach der Hintergrundreduzierung zeigt keinen eindeutigen Objektbereich auf, da dieser von den globalen Artefakten überragt wird. Das lokale Grauwerthistogramm (Abbildung b) hingegen hebt den Objektbereich hervor, setzt den lokalen Hintergrund bei einem höheren Grauwert und resultiert in einem Grauwert histogramm, welches einen Hintergrund und Objektbereich aufweist. Der Skalierungsunterschied (Faktor 10) verdeutlicht den Zusammenhang zwischen globalen und lokalen Hintergrundanteilen. Die Ordinate zeigt die absolute Häufigkeit eines Grauwertes, die Abszisse die Grauwerte.

5.1.3 Isodataverfahren

Das Isodataverfahren ist ein iteratives Verfahren. Der Schwellwert wird automatisiert, über die Konvergenz des arithmetischen Mittels der Mittelwerte zweier Klassen, berechnet. Die Klassen sind in diesem Fall der Objekt- und Hintergrundbereich. Das Verfahren wurde in zwei Programme implementiert, *Iso_lokal* und *Iso_global*, die analog der Hintergrundreduzierung, den Schwellwert für lokale und globale Grauwertistogramme berechnet. Der Programmablauf kann wie folgt beschrieben werden:

1. Als Startschwellewert wird der halbe maximale Grauwertbereich $t_0 = 2^{n-1}$ gewählt, wobei n der Bildtiefe entspricht.
2. Berechnung des Erwartungswertes des Hintergrund- und Objektbereiches mit Hilfe des Grauwertistogramms. Die Trennung der beiden Bereiche erfolgt durch den aktuellen Schwellwert t

$$\bar{G}_{Hintergrund} = \frac{\sum_{i=0}^t i \cdot G_i}{\sum_{i=0}^{2^n-1} G_i} \quad \bar{G}_{Objekt} = \frac{\sum_{i=t+1}^{2^n-1} i \cdot G_i}{\sum_{i=0}^{2^n-1} G_i} \quad (5.1)$$

wobei G_i der Anzahl der Grauwerte mit dem Wert i entspricht.

3. Berechnung des Schwellwertes, der dem arithmetischen Mittel der beiden Erwartungswerte entspricht

$$t_k = \frac{\bar{G}_{Hintergrund} + \bar{G}_{Objekt}}{2} \quad (5.2)$$

4. Überprüfung der Konvergenzbedingung durch Vergleich der Schwellwerte des k -ten und des $k + 1$ -ten Iterationsschrittes $t_k = t_{k-1}$.
5. Ist die Konvergenzbedingung nicht erfüllt werden die Schritte 2-4 wiederholt; ist sie erfüllt, dann wird der Wert t_{k-1} als Schwellwert gewählt.

Das Prinzip des Isodataverfahrens soll anhand von Grauwertistogrammen und deren Objekt- und Hintergrundbereich verdeutlicht werden (siehe Abbildung 5.6). Der Hintergrund- und Objektbereich von Abbildung 5.6 **a** entspricht einer idealen bimodalen Grauwertverteilung, hier von zwei gleichen Normalverteilungen mit der gleichen Standardabweichung repräsentiert, deren Maxima eine, zum halben maximalen Grauwertbereich symmetrische Verteilung bilden. Der konvergente Schwellwert, der die beiden Verteilungen in Objekt- und Hintergrundbereich teilt, stimmt in diesem Fall mit dem Startwert, dem halben dynamische Bereich, überein, da die Mittelwerte den Maxima entsprechen. Ausgehend von diesem idealen Zustand werden weitere Modellverteilungen betrachtet. In Abbildung 5.6 **b** ist der Objektbereich um den Faktor Fünf kleiner, dennoch wird der Schwellwert an der gleichen Stelle wie in Abbildung 5.6 **a** gesetzt, denn die Mittelwerte der beiden getrennten Bereiche entsprechen wiederum den Maxima. Die Größe des Objekt- und Hintergrundbereiches hat keinen Einfluß auf den Schwellwert, solange sich die beiden Bereiche nicht berühren, werden diese optimal in Objekt und Hintergrund eingeteilt. Eine Verschiebung der Verteilungsmaxima entlang der Abszisse (Abbildung 5.6 **c**) bewirkt, dass die Mittelwerte iterativ berechnet werden. Der konvergente Schwellwert $t_{k+1} = \frac{\bar{G}_{Hintergrund} + \bar{G}_{Objekt}}{2} = t_k$ entspricht dem Punkt, an welchem die Mittelwerte der beiden Bereiche optimal angenähert sind. Da t_{k+1} mit dem arithmetischen Mittel übereinstimmt, werden Objekt- und Hintergrundbereich nicht im Minimum geteilt, weshalb Teile des Objektbereiches verloren gehen.

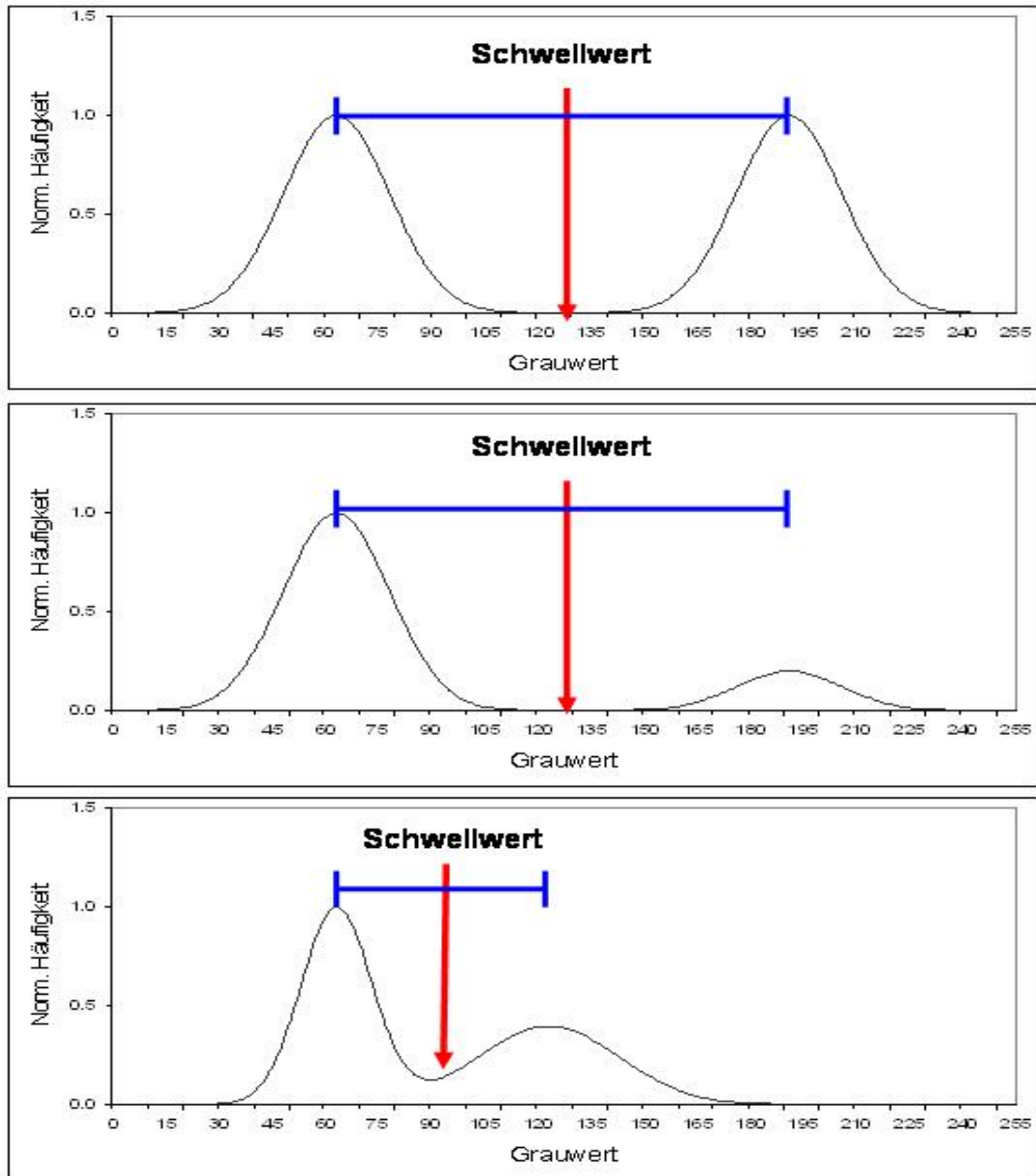


Abbildung 5.6: Das Grauwert histogramm in Abbildung a entspricht einer idealen bimodalen Verteilung, der Objekt- und Hintergrundbereich ist klar definiert und die Maxima stimmen mit den Mittelwerten überein. Das asymmetrische Grauwert histogramm in Abbildung b trennt die beiden Bereiche mit dem gleichen Schwellwert, da diese sich nicht überlappen, und die Maxima stimmen ebenfalls mit den Mittelwerten überein. In Abbildung c hingegen gehen Objekt- und Hintergrundbereich ineinander über und die Maxima werden optimal angenähert. Auffallend ist, da der arithmetische Mittelwert verwendet wird, dass der Schwellwert nicht exakt dem Minimum entspricht.

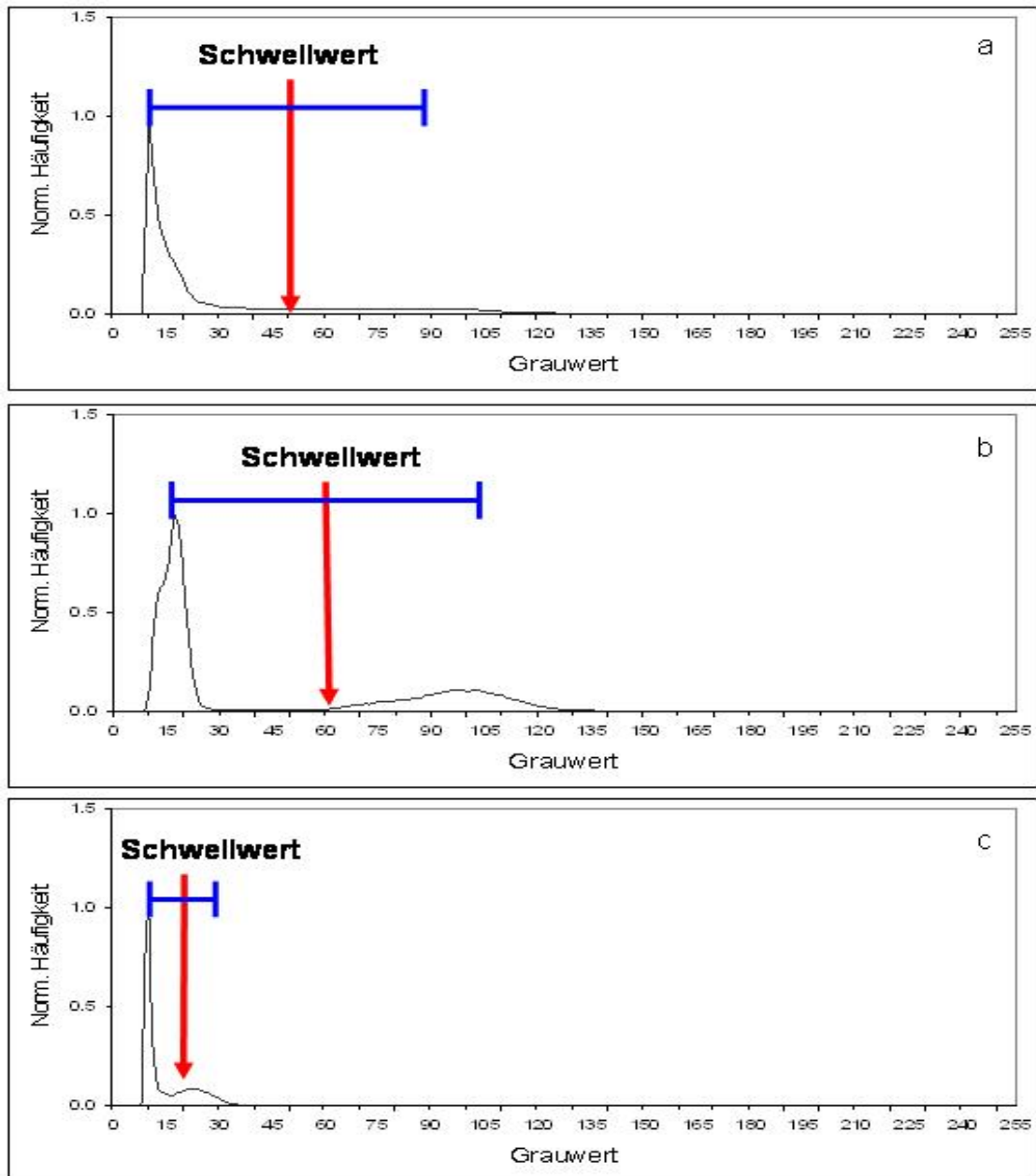


Abbildung 5.7: Das globale Grauwert histogramm in Abbildung a beinhaltet die Information aller Bildebenen. Das Objekt und somit auch der Objektbereich sind aus globaler Sicht klein, weshalb die Mittelwerte in der Art an die Maxima angenähert werden, dass der resultierende Schwellwert optimal für alle Bildebenen gesetzt wird. Die lokalen Schwellwerte hingegen, welche aus den Grauwert histogrammen des Zentral- (Abbildung b) und Randbereiches (Abbildung c) hervorgehen, sind auf die jeweilige Bildebene angepaßt.

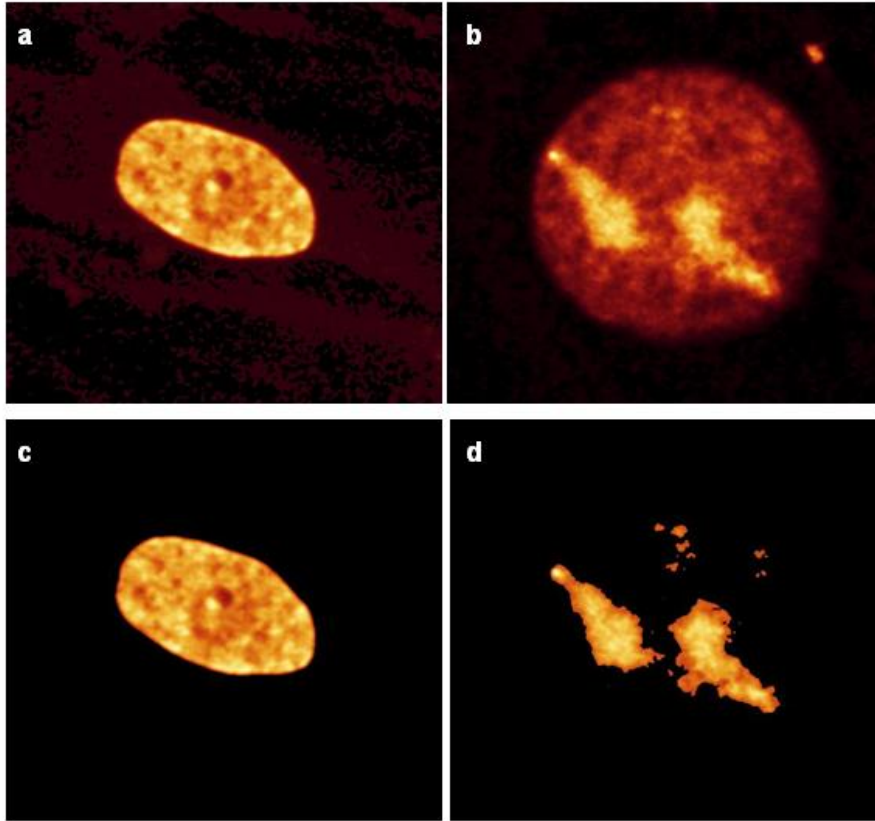


Abbildung 5.8: Zu sehen sind Zellkerne und Chromosomenterritorien vor (Abbildung **a** und **b**) und nach (Abbildung **c** und **d**) der Anwendung eines aus dem Isodataverfahren resultierenden Schwellwerts. (Die Bilder wurden freundlicherweise von Dipl.Biol. Yanina Weiland und Patrick Müller, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt.).

5.1.4 Verfahren nach Otsu

Das Verfahren nach Otsu ist eines der ältesten Schwellwertverfahren [86]. Der Schwellwert wird bei diesem Verfahren anhand der Varianzen der Hintergrund- und Objektverteilung ermittelt. Hierfür wird das Verhältnis $\frac{\sigma_{zw}^2}{\sigma_{in}^2}$ der Varianzen zwischen und innerhalb der Verteilungen maximiert. Der Programmablauf ist wie folgt:

1. Der aktuelle Schwellwert t trennt Objekt- und Hintergrundbereich.
2. Die Mittelwerte der Grauwerte des durch t definierten Objekt- \bar{G}_{Objekt} und Hintergrundbereiches $\bar{G}_{Hintergrund}$ werden berechnet.
3. Die Auftrittswahrscheinlichkeiten

$$P_{Hintergrund} = \frac{\sum_{i=0}^t G_i}{\sum_{i=0}^{2^n-1} G_i} \quad P_{Objekt} = \frac{\sum_{i=t+1}^{2^n-1} G_i}{\sum_{i=0}^{2^n-1} G_i} \quad (5.3)$$

werden gebildet.

4. Der Mittelwert \bar{G}_{Gesamt} des Bildes ergibt sich somit zu

$$\bar{G}_{Gesamt} = P_{Hintergrund}\bar{G}_{Hintergrund} + P_{Objekt}\bar{G}_{Objekt} \quad (5.4)$$

5. Aus den Mittelwerten und Auftretswahrscheinlichkeiten werden die Varianzen der beiden Verteilungen berechnet.

$$\sigma_{Hintergrund}^2 = \sum_{i=0}^t (G_i - \bar{G}_{Hintergrund})^2 \frac{G_i}{\sum_{j=0}^{2^n-1} G_j} \quad (5.5)$$

und

$$\sigma_{Objekt}^2 = \sum_{i=t+1}^{2^n-1} (G_i - \bar{G}_{Objekt})^2 \frac{G_i}{\sum_{j=0}^{2^n-1} G_j} \quad (5.6)$$

6. Die Varianzen innerhalb σ_{in} und zwischen σ_{zw} den Verteilungen ergeben sich zu

$$\sigma_{in}^2 = P_{Hintergrund}\sigma_{Hintergrund}^2 + P_{Objekt}\sigma_{Objekt}^2 \quad (5.7)$$

und

$$\sigma_{zw}^2 = P_{Hintergrund}(\bar{G}_{Hintergrund} - \bar{G}_{Gesamt})^2 + P_{Objekt}(\bar{G}_{Objekt} - \bar{G}_{Gesamt})^2 \quad (5.8)$$

7. Abschließend wird der Quotient $\frac{\sigma_{zw}^2}{\sigma_{in}^2}$ des aktuellen Schwellwerts t berechnet.

8. Die Maximierung des Quotienten erfolgt indem der Schwellwert t den vollständigen Grauwertbereich $G = 0 \dots 2^n - 1$ durchläuft. Hierzu werden die Schritte 1-7 für jeden Wert von t ausgeführt und der Grauwert als Schwellwert t gewählt, welcher $\frac{\sigma_{zw}^2}{\sigma_{in}^2}$ maximiert.

Anders als der Isodata Algorithmus verwendet der Algorithmus von Otsu die Auftretswahrscheinlichkeiten(=Größe) $P_{Hintergrund/Objekt}$ und die Breite(=Form) $\sigma_{Hintergrund/Objekt}^2$ der Objekt- und Hintergrundverteilung. Das Verfahren nach Otsu ermöglicht es somit zusätzliche Information über die Form und die Breite der bimodalen Grauwertistogramme in die Berechnung des Schwellwertes mit einfließen zu lassen. Dies kann wieder anhand einer idealen, zum halben maximalen Grauwertbereich $G = 2^{n-1}$ symmetrischen, bimodalen Verteilung verdeutlicht werden (Abbildung 5.9 a). Das Minimum und somit der maximierende Schwellwert t entspricht in diesem Fall genau dem halben maximalen Grauwertbereich $t = 2^{n-1}$. Wird nun die Hintergrundverteilung vergrößert oder überlappt (Abbildung 5.9 b und c), dann setzt der Isodata-Algorithmus den Schwellwert t_{Iso} immer im arithmetischen Mittel. Der Otsu-Algorithmus hingegen setzt den Schwellwert, aufgrund der Abhängigkeit von den Varianzen der Objekt- und Hintergrundverteilung bei kleineren Werten $t_{Otsu} < t_{Iso}$. Der Otsu- wurde ebenso wie der Isodata-Algorithmus als lokale $Otsu_lokal$ und globale $Otsu_global$ Variante implementiert.

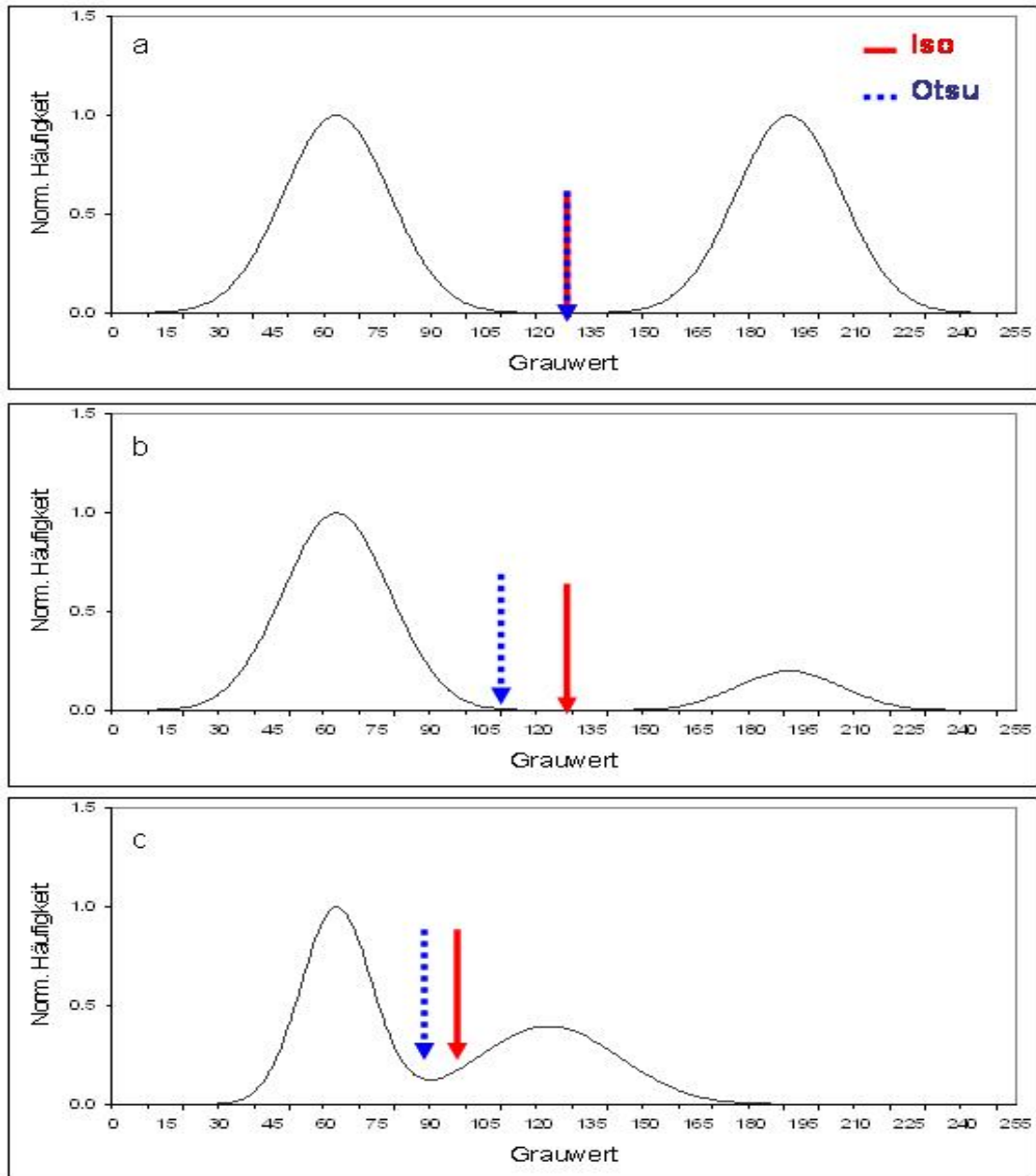


Abbildung 5.9: Das globale Grauwert histogramm (Abbildung a) zeigt ein ideales bimodales Grauwert histogramm, die aus dem globalen Otsu- und Isodata-Algorithmus resultierenden Schwellwerte stimmen überein. Die Grauwert histogramme in den Abbildungen b und c, dass die vom Otsu-Algorithmus gesetzten Schwellwerte, in kleineren Schwellwerten resultieren, als die des Isodata-Algorithmus.

5.1.5 Detektion und Segmentierung von Objekten mittels Tophatfilterung

Die Schwellwertsetzung und Segmentierung von Objekten im Bereich der Größenordnung der PSF, z.B. Gene, kann nicht mit Methoden realisiert werden, welche den Schwellwert anhand von Grauwertistogrammen ermitteln. Der Grund hierfür ist die geringe Anzahl an Voxeln, aus welchen das Objekt besteht, und die daraus resultierende, im Grauwertistogramm nicht sichtbare, Objektverteilung. Der verwendete Tophat Algorithmus hingegen ist ein lokaler modellbasierter Algorithmus [98] [8], der Objekte mit lokalen Grauwertmaxima, die in der Größenordnung der Halbwertsbreite der lateralen PSF sind, erkennt. Die allgemeine Definition des Tophat erfolgt über morphologische Operatoren [61], wobei für zwei Regionen A (Bild) und B (Maske) gilt $Tophat(A, B) = A - max_B[min_B(A)]$. Diese Definition wurde im Programm *Tophat_label* auf biologische Objekte angepaßt. Das Programm *Tophat_label* besteht aus zwei Teilen, dem Tophat Algorithmus und der abschließenden Nummerierung (engl. Labeling) der detektierten Objekte. Der erste Teil, der Ablauf des Tophat Algorithmus, kann wie folgt beschrieben werden:

1. Maximumprojektion der lateralen Ebenen des Originalbildes *Img_3D* in axiale Richtung und Normalisierung der Projektion *Img_2D* auf die maximale Bildtiefe $2^n - 1$.
2. Um das aktuelle zentrale Pixel $G(x, y)$ wird eine isotrope innere (A) und äußere (B) Region mit der in Abbildung 5.10 zu sehenden Maske gelegt.
3. Berechnung der mittleren Grauwerte, $\bar{G}(A)$ und $\bar{G}(B)$, der beiden Regionen.
4. Als Schwellwert $t(x, y, r)$ wird

$$t(x, y, r) = r(2^n - 1 - \bar{G}(B)) \quad (5.9)$$

gewählt. r ist ein vom Benutzer zu setzender Parameter.

5. Ist die Differenz der mittleren Grauwerte kleiner als der Schwellwert

$$t(x, y, r) > \bar{G}(A) - \bar{G}(B) \quad (5.10)$$

wird das Pixel auf Null gesetzt, gilt

$$t(x, y, r) < \bar{G}(A) - \bar{G}(B) \quad (5.11)$$

wird der eingetragene Grauwert beibehalten.

6. Die Schritte 2-5 werden solange wiederholt, bis das ganze Bild abgerastert ist.

Der erste Schritt, die Projektion der axialen Maxima, dient der Verkürzung der Rechenzeit und der Verstärkung der Maxima in laterale Richtung. Der Durchmesser der inneren Region A (hellgraue Region in Abbildung 5.10) entspricht, der Größenabschätzung der PSF. Die äußere 5×5 -Region B wurde gewählt, um auch dicht nebeneinander liegende Maxima zu detektieren und ist in lateraler Richtung isotrop. Das Prinzip, welches dieser Einteilung der Regionen zugrunde liegt wird aus Abbildung 5.11 deutlich. Ist das aktuelle zentrale Voxel $G(x, y)$ ein Hintergrundvoxel (Abbildung 5.11 **b**), dann entsprechen die Mittelwerte $\bar{G}(A)$ und $\bar{G}(B)$ der Regionen A und B dem Hintergrund, und die Differenz $\bar{G}(A) - \bar{G}(B)$ ist klein. Der Schwellwert t hingegen ist groß, da die Differenz zwischen Hintergrund und maximaler Bildtiefe $2^n - 1$

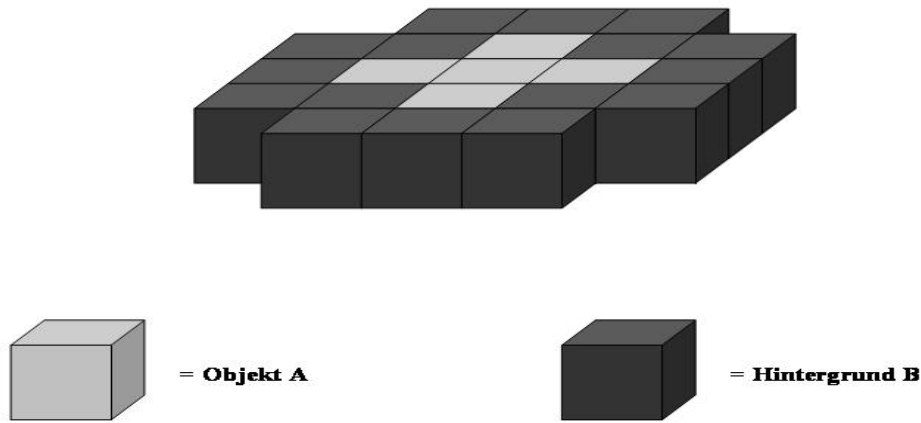


Abbildung 5.10: Die hellgrauen Voxel entsprechen der inneren Region A , die schwarzen Voxel der äußeren Region B . Die Regionen sind isotrop in den beiden lateralen Raumrichtungen. Der Durchmesser der inneren Region A entspricht einem Objekt von der Größe der theoretischen konfokalen PSF mit einem Hintergrund in der Größenordnung der äußeren Region B . Dieser modellbasierte Ansatz unterdrückt größere kompakte Objekte, detektiert aber zwei nebeneinander liegende kleinere Objekte.

groß ist. Das Resultat ist, dass das aktuelle zentrale Voxel unterdrückt, also auf Null gesetzt wird. Liegt der in Abbildung 5.11 **a** gezeigte Fall vor, dass das Voxel $G(x, y)$ sich innerhalb eines Grauwertmaximums befindet, wird die Differenz $\bar{G}(A) - \bar{G}(B)$ größer als der lokale Schwellwert $t(x, y, r)$. Die Abschätzung des Schwellwertes $t(x, y, r)$ erfolgt in Abhängigkeit von der Höhe des Hintergrundes und dem Parameter r . Ein hoher Hintergrund läßt den Schwellwert $t(x, y, r) = r(2^n - 1 - \bar{G}(B))$ entsprechend klein werden, sodass auch Signale mit einem sehr kleinen Signal zu Rausch Verhältnis erkannt werden. Über den Parameter r fließt dem Benutzer bekannte experimentelle Informationen über den Hintergrund in den Schwellwert $t(x, y, r)$ in der Form mit ein, sodass dieser den Schwellwert $t(x, y, r)$ skaliert. Die Grundeinstellung ist $r = 0.5$.

Der zweite Teil des Programmes ist das Labeling der detektierten Objekte im dreidimensionalen Bild Img_3D , dessen Ablauf folgendermaßen ist:

1. Labeling der über eine 8er Nachbarschaft zusammenhängenden n Objekte im Projektionsbild Img_2D .
2. Berechnung des lateralen Intensitätsschwerpunktes $S_i(x_0, y_0)$ für das i -te Objekt mit $i = 1 \dots n$.
3. Detektion des axialen Grauwertmaximums bei z_0 im dreidimensionalen Bild Img_3D entlang des lateralen Schwerpunktes $S_i(x_0, y_0)$ und Definition des dreidimensionalen Schwerpunktes $S_i(x_0, y_0, z_0)$.
4. Labeling des Objektes im Bild Img_3D mit der aktuellen Objekt Nummer i . In axiale Richtung werden die Voxel entlang des Schwerpunktes $S_i(x_0, y_0, z)$ im Bereich $z_0 - 2 <$

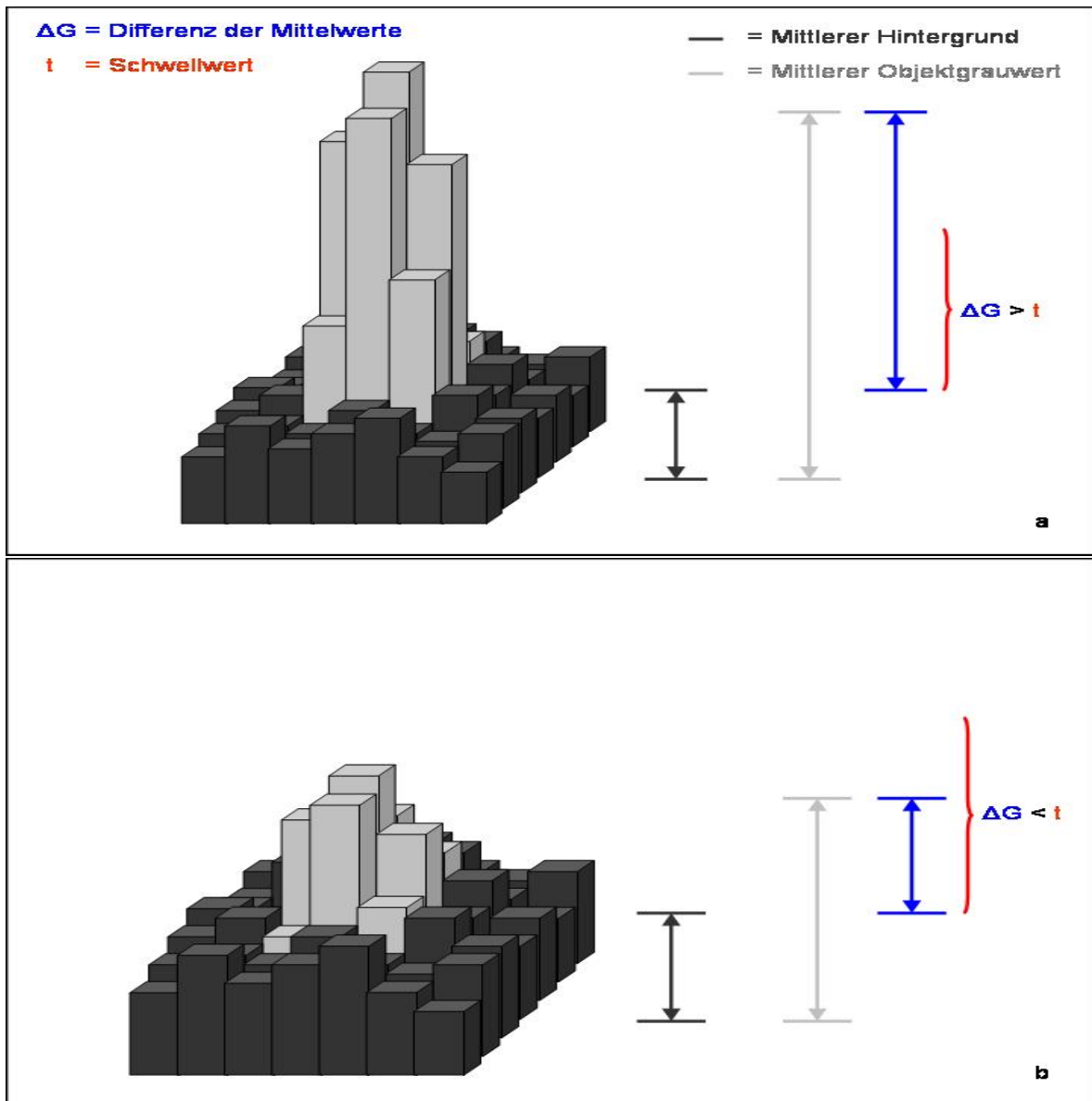


Abbildung 5.11: Die Größe und die Intensität des zu detektierenden Objektes in Abhängigkeit vom Schwellwert $t(x, y, r)$ legen fest, ob dieses als solches erkannt wird. Abbildung **a** zeigt ein Voxel mit hoher Grauwertintensität innerhalb einer kleinen Region. Die Differenz der regionalen Mittelwerte $\bar{G}(A) - \bar{G}(B)$ ist größer als der Schwellwert $t(x, y, r = 0.5)$, weshalb das Objekt detektiert wird. Anders verhält sich dies in Abbildung **b**, die Differenz $\bar{G}(A) - \bar{G}(B)$ ist kleiner als der Schwellwert, das Objekt wird verworfen.

$z < z_0 + 2$ und in laterale Richtung im Bereich um den lateralen Schwerpunktes $S_i(x_0, y_0)$ gelabelt.

5. Wiederholung der Schritte 2-4 für alle n Objekte.

Der Labeling Algorithmus (Punkt 1) basiert auf einem Algorithmus, der die Objekte über Zweige (=Zeilen des Bildes) verknüpft und diesen Objektnummern zuweist [97] [33]. Die Zweige werden anschließend über eine 8er Nachbarschaft miteinander verknüpft, d.h. befindet sich zwei Zweige innerhalb dieser Nachbarschaft, so gehören diese zu einem Objekt und erhalten die gleiche Objektnummer. Der Algorithmus wurde dahingehend verändert und mit dem Tophat verknüpft (Punkte 2-4), sodass die detektierten Objekte um den Schwerpunkt herum gelabelt sind und aus den segmentierten Objekten die Startwerte für die Anpassungsalgorithmen extrahiert werden können.

5.2 Anpassung von kugelförmigen und ellipsoiden Körpern an Zellkerne

Die nach dem 1 Mbp SCD-Modell simulierten Verteilungen von Chromosomen werden in kugelförmigen oder ellipsoiden Körpern vorgenommen, welche Zellkerne darstellen. Für einen simulierten Datensatz muß aber vor Beginn der Simulation die Geometrie der Körper festgelegt werden. Um zukünftig eine bessere Übereinstimmung zwischen den experimentellen Zellkernen und den simulierten Zellkernen zu erreichen, wurden ein Algorithmus entwickelt, welcher mittels Lagranger Optimierung kugelförmige und ellipsoide Körper an die experimentellen Zellkerne anpaßt. Diese stehen anschließend für Simulationszwecke zur Verfügung. Als Modellfunktion wurde ein Ellipsoid gewählt, der aufgrund der Geometrie, auch Kugeln beinhaltet.

Die Anpassung des Ellipsoids wurde in das Programme *Ellipsoid_3D* mittels Lagranger Optimierung implementiert. Als Startbild werden gefilterte, hintergrundreduzierte und segmentierte Zellkernbilder verwendet. Die Endungen *_3D* bezieht sich auf den zur Kantendetektion verwendeten Gradienten. Anzumerken ist, dass sich der in diesem Kapitel geschilderte Programmablauf sich nur auf den programmiertechnischen Hintergrund bezieht, die mathematischen Grundlagen findet der interessierte Leser im Kapitel 3.2.

5.2.1 Implementierung an segmentierten Bildern

Ausgehend von den segmentierten Zellkernbildern kann der Programmablauf wie folgt geschildert werden:

1. Detektion der Kanten in laterale Richtung mit dem Sobel-Operator und in axiale Richtung mit dem Canny-Operator [61].
2. Initialisierung der $10 \times m$ Matrizen \mathbf{Z}^t, \mathbf{Z} mit der Anzahl der m Kantenpunkte und der 10×10 Scattermatrix \mathbf{S} . Die Matrizengröße 10 ergibt sich aus der Anzahl der anzupassenden Parameter.
3. Einlesen der Kantenkoordinaten $\vec{x} = (x_1, x_2, x_3)$ und Bildung der Matrix \mathbf{Z}
4. Bildung der transponierten Matrix \mathbf{Z}^t und Matrizenmultiplikation liefert die Scattermatrix $\mathbf{W} = \mathbf{Z}^t \mathbf{Z}$.

5. Initialisierung des Eigenwertvektors $eval = (\lambda_1, \dots, \lambda_i$, Eigenvektormatrix $eval$ und des Eigenwertarbeitsplatzes der GSL-Bibliothek. Die Eigenwerte werden als Vektor nach Größe aufsteigend sortiert ausgegeben, d.h. $\lambda_1 < \dots < \lambda_i$.
6. Berechnung der Eigenwerte und Eigenvektoren, der optimale Parametersatz \hat{a} entspricht der ersten Spalte der Matrix $eval$.
7. Die ersten sechs Parameter werden zur Bildung der 3x3 Matrix A verwendet. Aus der Singulärwertzerlegung der Matrix $A = UTU$ werden die Halbachsen $\vec{h} = (T_{11}^{-\frac{1}{2}}, T_{22}^{-\frac{1}{2}}, T_{33}^{-\frac{1}{2}})$ berechnet.
8. Darstellung des Ellipsoids.
9. Als Anpassungseffizienz $F_{1/2}$ wird das Verhältnis der Schnittmenge von Zellkern- und Ellipsoidvolumen $V_0 = V_{Zellkern} \cap V_{Ellipsoid}$ zum Volumen $V_{Zellkern}$ berechnet.

Die Anpassungseffizienzen ermöglichen es, die Zellkerne und die angepassten Ellipsoide zu vergleichen und gegenüberzustellen. Die Ausgabe des Ellipsoids erfolgt im KDF-Format, sodass die Bilddatensätze für die Kartierung und Distanzmessung weiter verwendet werden können. Die Syntax der Funktionen und Arbeitsbereiche zur Bearbeitung von Matrizen, der Lösung von Eigenwertgleichungen und Funktionen zur Singulärwertzerlegung ist in der Dokumentation der GSL-Bibliothek zu finden [50].

5.3 Die Kartierung des Zellkerns

Aus Kapitel 4.1 ist bekannt, dass die relative radiale Position von fluoreszenzmarkierten Chromatinregionen in Interphase-Zellkernen auf zwei verschiedene Varianten berechnet werden kann. Eine Variante, welche den Schwerpunkt des Zellkerns als Bezugspunkt verwendet, und eine zweite Variante, welche den Zellkernrand als Bezugspunkt verwendet. Im Folgenden werden die entsprechenden implementierten Algorithmen vorgestellt. In Kapitel 5.3.1 wird die schwerpunktsbasierte Kartierung des Zellkerns erklärt, während in den Kapitel 5.3.2 und 5.3.3 zwei Algorithmen vorgestellt werden, die den Zellkern vom Zellkernrand mittels Distanztransformationen (=DT) kartieren. Im Kapitel 5.3.4 wird ein Auswertalgorithmus, welcher die relative radiale Position von Chromatinregionen berechnet, vorgestellt.

5.3.1 Schwerpunktsbezogene radiale Kartierung

Die schwerpunktsbezogene radiale Kartierung des Zellkerns besteht aus drei wesentlichen Schritten:

1. Berechnung des geometrischen Schwerpunktes des Zellkernes anhand des binären Zellkernbildes.
2. Berechnung der schwerpunkt-basierten relativen radialen Position der Zellkernvoxeln mit dem geometrischen Zellkernschwerpunkt als Bezugspunkt.
3. Normierung der Distanzen auf prozentuale Abstände.

Der erste Schritt, die Berechnung des geometrischen Schwerpunktsvektors des Zellkern in digitalen binären Bildern, erfolgt analog der Berechnung des Schwerpunktes einer Verteilung von Massepunkten in der Mechanik. Für den Schwerpunktsvektor von n Massepunkten gilt:

$$\vec{S}_{\text{Objekt}} = \frac{\sum_{i=1}^n \vec{r}_i \cdot m_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad (5.12)$$

wobei r_i den Abstandsvektor zwischen Ursprung und dem i -ten Massepunkt beschreibt, m_i der Masse des i -ten Massepunktes entspricht und \vec{S}_{Objekt} den Schwerpunktsvektor darstellt. In einem digitalen binären Bild, welches den Zellkern als Objekt enthält, entspricht die Masse m_i der Intensität des i -ten Voxels mit $m_i = 1$, wodurch sich Gleichung 5.12 zu

$$\vec{S}_{\text{Zellkern}} = \frac{\sum_{i=1}^n \vec{r}_i}{n} \quad (5.13)$$

vereinfacht. Angewendet auf ein digitales Bild bedeutet dies, dass das Bild einmal abgerastert wird, die drei räumlichen Komponenten der zum Zellkern gehörenden Voxel aufsummiert werden und jede durch die Anzahl der Voxel dividiert wird. Im nächsten Schritt werden die relativen radialen Positionen jedes Voxels berechnet, welche dem Verhältnis der Beträge der Strecken

$$\frac{\text{Schwerpunkt-Objekt}}{\text{Schwerpunkt-Objekt-Zellkernhülle}} \quad (5.14)$$

entsprechen. Zur Berechnung der Strecken wird die Gleichung einer Geraden aufgestellt, deren Richtungsvektors \vec{v} durch den Vektor Objektvektor-Schwerpunktsvektor definiert ist und deren Stützvektor der Schwerpunktsvektor ist.

$$g : \quad \vec{x} = \vec{S}_{\text{Zellkern}} + t \cdot \vec{v} \quad (5.15)$$

Die relative radiale Position ergibt sich aus dem Verhältnis der unterschiedlichen Skalierungsfaktoren des Richtungsvektors.

$$\frac{t_1}{t_2} \quad (5.16)$$

Der Zähler entspricht dabei der Skalierung des Richtungsvektors mit t_1 , so dass der Richtungsvektor dem Betrage nach die Länge der Strecke Schwerpunkt-Objekt hat, und der Nenner einer Skalierung des Richtungsvektors mit t_2 , und der Richtungsvektor durch das Objekt geht und die Zellkernhülle schneidet (siehe Abbildung 5.12). Wird obige Betrachtung auf diskrete Gitter adaptiert, so bedeutet dies, dass das Bild ein zweites Mal abgerastert wird und für jedes dem Zellkern zugehörige Voxel die Komponenten des Richtungsvektors \vec{v} berechnet werden müssen, welche sich aus der Differenz von aktuellem Voxelvektor \vec{P}_{Voxel} und Schwerpunktsvektor $\vec{S}_{\text{Zellkern}}$ ergeben.

$$\vec{v} = \vec{P}_{\text{Voxel}} - \vec{S}_{\text{Zellkern}} \quad (5.17)$$

Ausgehend vom Schwerpunkt werden die Skalierungsfaktoren t_1 und t_2 erhöht, t_1 solange, bis die Gerade das aktuelle Voxel \vec{P}_{Voxel} schneidet, also

$$\vec{S}_{\text{Zellkern}} + t_1 \cdot \vec{v} = \vec{P}_{\text{Voxel}} \quad (5.18)$$

gilt, und t_2 bis die Gerade ein Voxel der Zellkernhülle \vec{X}_{Rand} schneidet, also

$$\vec{S}_{\text{Zellkern}} + t_2 \cdot \vec{v} = \vec{X}_{\text{Rand}} \quad (5.19)$$

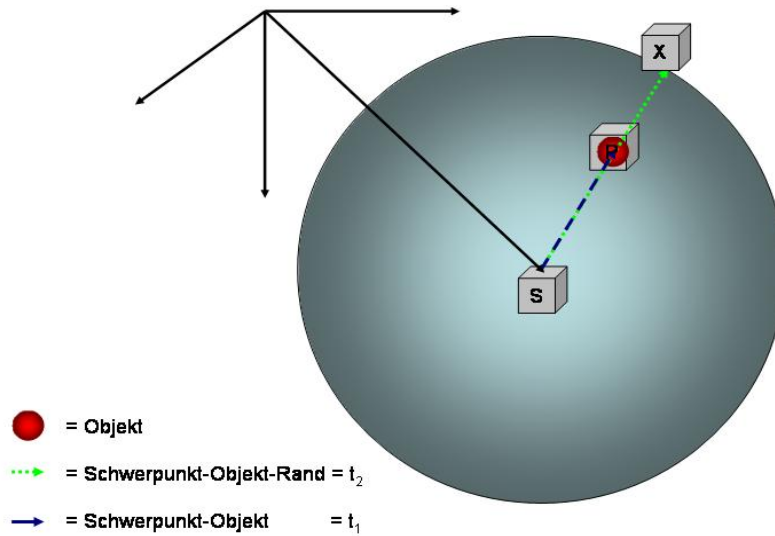


Abbildung 5.12: Die unterschiedliche Skalierungen des Richtungsvektors t_1 (gelb) und t_2 (grün) werden iterativ vom Schwerpunkt S aus berechnet. t_1 entspricht dem Abstand S-P, t_2 dem Abstand S-X. Das Verhältnis der Skalierungen $\frac{t_1}{t_2}$ gibt die schwerpunkt-basierte relative radiale Position des Voxels P an.

gilt. Die Zellkernhülle entspricht den Voxeln X_{Rand} , welche ein Nachbarvoxel mit einem Grauwert von Null haben. Im letzten Schritt, welcher eine dritte Abraasterung des Bildes nötig macht, werden nun die relativen radialen Positionen in entsprechende Distanzklassen, sogenannte Schalen, eingeteilt und normiert.

$$\frac{t_1}{t_2} \cdot \text{Schalenanzahl} \quad (5.20)$$

Die schwerpunkt-basierte Zellkernkartierung wurde in dieser Form in das Programm *RRD_variableshells* implementiert.

5.3.2 Zellkernkartierung mittels Chamfering Distanztransformation (=DT)

Der in dieser Arbeit implementierte Chamfering DT-Algorithmus basiert auf den Chamfer DT's von Rosenfeld und Borgefors [96] [5]. Bei Chamfering DT's das Distanzbild anhand der Distanz eines Voxels oder Pixels zu seinen Nachbarn berechnet, weshalb diese Algorithmen eine sehr kurze Rechenzeit benötigen. Der verwendete Algorithmus kartiert den dreidimensionalen Zellkern nach einem Vorwärts- und einem Rückwärtsscan vollständig, wird aber, da die Montanari Metrik [79] verwendet wird, nur auf isotrope Gitter mit der in Abbildung 5.13 gezeigten Maske angewendet. Die Einträge in den verwendeten Masken entsprechen den Distanzen innerhalb einer 26er Nachbarschaft, d.h. vom zentralen Voxel aus gesehen haben Nachbarn, die eine Seite berühren die Distanz $d_1 = 1$. Nachbarn, die das Zentralvoxel an einer Kante berühren die Distanz $d_2 = \sqrt{2}$, und Nachbarn, die eine Ecke berühren die Distanz $d_3 = \sqrt{3}$.

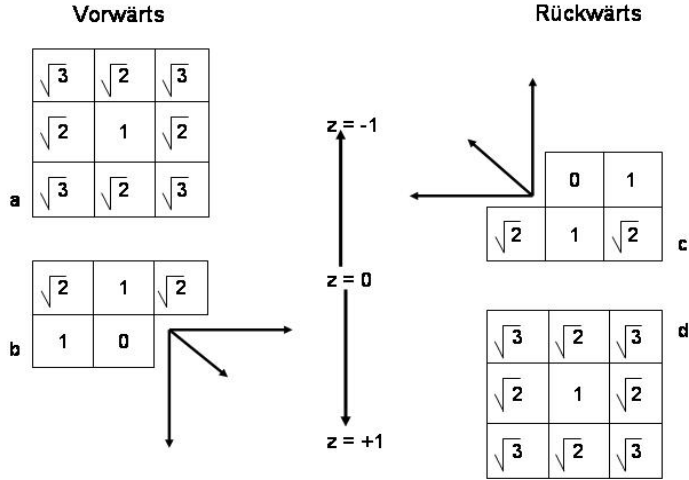


Abbildung 5.13: Die Filtermasken links werden für den Vorwärtsscan verwendet, die 3x3 Maske **a** für die Ebene $z = -1$ und 5er Maske für die aktuelle Ebene $z = 0$ **b**. Die Filtermasken rechts werden analog für den Rückwärtsscan verwendet, die 3x3 Maske **d** für die Ebene $z = +1$ und 5er Maske **c** für die aktuelle Ebene $z = 0$. Die Einträge entsprechen den Distanzen innerhalb eines 3x3x3 Kubus, ausgehend vom zentralen Voxel, welches den Eintrag 0 hat.

Somit gilt für die Distanz zweier benachbarter Voxel \vec{x} und \vec{y} , unter Verwendung der Montanari Metrik:

$$\begin{aligned}
 dist_{cha(d_1:d_2:d_3)}(\vec{x}, \vec{y}) &= d_1 \cdot \max(\Delta_1, \Delta_2, \Delta_3) + \\
 &+ (d_2 - d_1) \cdot \text{median}(\Delta_1, \Delta_2, \Delta_3) + \\
 &+ (d_3 - d_2) \cdot \min(\Delta_1, \Delta_2, \Delta_3)
 \end{aligned} \tag{5.21}$$

mit $\Delta_1 = |x_1 - y_1|$, $\Delta_2 = |x_2 - y_2|$ und $\Delta_3 = |x_3 - y_3|$. Die Chamfering DT wurde mit dem Programm *Distanz_traf_26nachb* realisiert und ist wie folgt definiert:

1. Belegung aller Zellkernvoxel mit der maximalen Distanz, d.h. mit der Länge der Raumdiagonalen.
2. Vorwärtsscan und Abtastung mit der Vorwärtsmaske.
3. Rückwärtsscan und Abtastung mit der Rückwärtsmaske.
4. Normierung der Distanzen auf die maximale Distanz

Der erste Programmschritt ist die Belegung aller Zellkernvoxel mit der maximalen Distanz, welche sich aus

$$dist_{max} = \sqrt{(Size_1^2 + Size_2^2 + Size_3^2)} \tag{5.22}$$

ergibt. Die $Size_i$ geben die Größe des Bildes in die i -te Raumrichtung an. Der Vorwärtsscan wird mit den in Abbildung 5.13 (links) zu sehenden Masken realisiert und erfolgt in die angegebenen Richtungen. Die einzutragende Distanz des aktuellen zentralen Voxels \vec{x} zu einem Nachbarvoxel \vec{y} erhält man nach Rasterung der 13er Nachbarschaft. Diese ergibt sich aus

$$dist(\vec{x} | \vec{y}) = \min(dist_{cha(d_1:d_2:d_3)}(\vec{x}, \vec{y}) + dist_{\vec{y}}) \tag{5.23}$$

wobei $dist_{\vec{y}}$ der dem Voxel \vec{y} bereits zugeordneten Distanz und $dist_{cha(d_1:d_2:d_3)}$ der in der Maske eingetragenen Distanz zwischen Voxel \vec{x} und \vec{y} entspricht. Aus Gleichung 5.23 wird

ersichtlich, weshalb alle Zellkernvoxel die maximale Distanz als Startwert erhalten. Da alle noch nicht abgerasterten Voxel die maximale Distanz eingetragen haben, können diese nicht die Bedingung der minimal Distanz erfüllen, und das aktuelle zentrale Voxel erhält so die tatsächlich minimale Distanz. Der Rückwärtsscan erfolgt mit den in Abbildung 5.13 (rechts) zu sehenden Masken und Richtungen. Die Bedingungen für die minimale Distanz sind analog dem Vorwärtsscan. Die resultierenden Distanzwerte, nach dem Rückwärtsscan, entsprechen den minimalen Distanzen vom Zellkernrand aus betrachtet. Die Normierung und Einteilung des Zellkernes in Schalen erfolgt anhand der maximalen Minimaldistanz $dist_{max}(\vec{x} | \vec{y})$ zu:

$$dist_{norm}(\vec{x}) = \frac{dist_{\vec{x}}}{dist_{max}} \cdot Schalenanzahl \quad (5.24)$$

Die normierten Distanzen werden abschließend invertiert, sodass die prozentuale Schaleneinteilung von innen nach außen zunimmt. In Abbildung 5.15 ist ein Beispiel zu sehen, welches den Ablauf der Chamfering DT verdeutlicht.

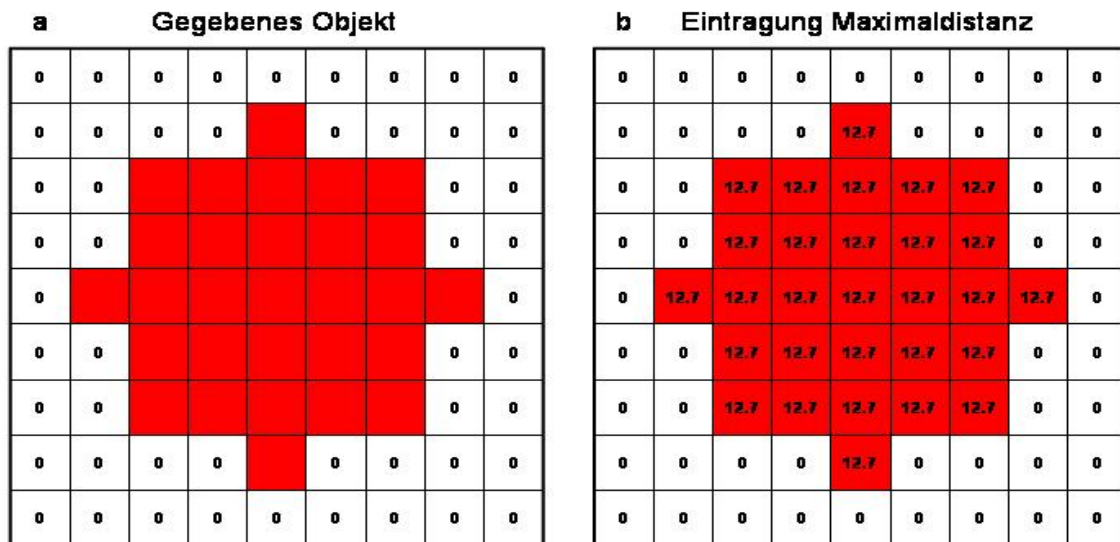


Abbildung 5.14: Funktionsweise der Chamfering DT. Das zu kartierende Objekt ist in Abbildung a (rot) zu sehen. Der erste Schritt des Algorithmus weist allen Objektvoxeln die maximale Distanz, hier 12.7, zu (Abbildung b).

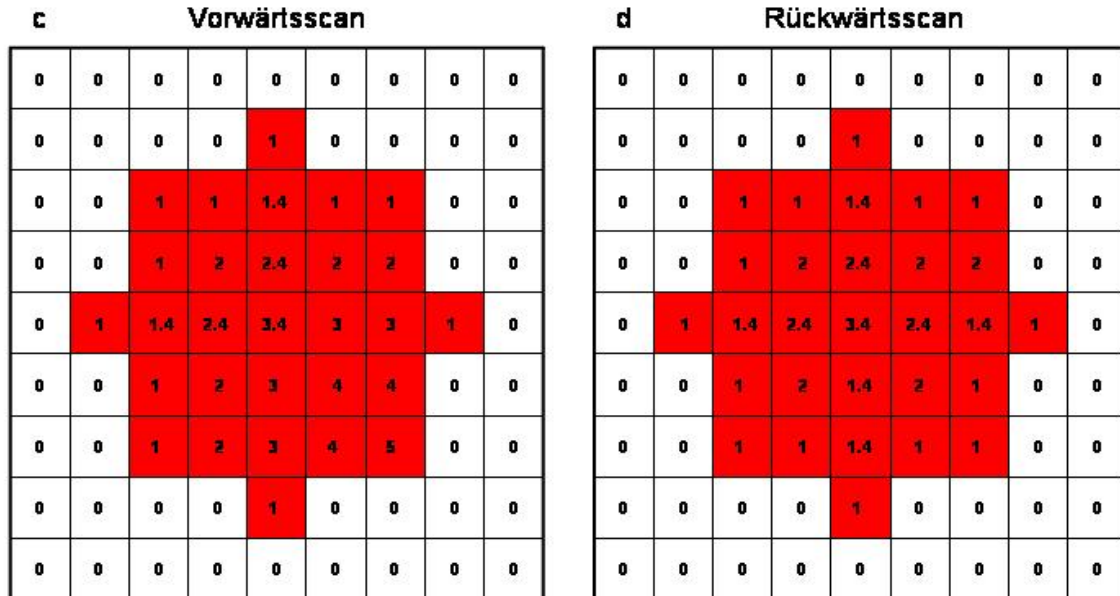


Abbildung 5.15: Funktionsweise der Chamfering DT. Das Objekt (rot) wird mittels eines Vorwärts- und Rückwärtsscans vollständig kartiert (Abbildung c und b).

5.3.3 Zellkernkartierung mittels euklidischer vektorieller Distanztransformation (=DT)

Distanztransformationen, die exakt sind und sowohl auf anisotrope als auch auf isotrope Gitter angewendet werden können, sind vektorbasiert und verwenden die euklidische Metrik, die die Distanz zweier Voxel \vec{x} und \vec{y} wie folgt definiert:

$$dist_{euklid}(\vec{x} | \vec{y}) = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + (x_3 - y_3)^2} \quad (5.25)$$

Anders als Chamfering DTs, die jedem Voxel eine skalare Distanz zuordnen, werden hierbei jedem Voxel Distanzvektoren zugeordnet. Vektorielle DTs wurden erstmals von Yamada in zwei Dimensionen angewendet [118]. Yamada setzte eine 3x3 Filtermaske ein, deren Einträge die Komponenten des Distanzvektors ausgehend vom zentralen Voxel sind. Die Maske wurde solange wiederholt auf alle Pixel angewendet, bis eine stabile Lösung erreicht war. Diese Maske wurde auf eine dreidimensionale 3x3x3 Maske erweitert (siehe Abbildung 5.16) und in zwei verschiedene Programme *EDT_3D* und *EDT_3D_terr* implementiert. Die erste Version kartiert den Zellkern, die zweite kartiert den Zellkern von den Rändern eines Objekts, z.B. Chromosomenterritorien, ausgehend.

Der Programmablauf, der beiden Programmen zugrundeliegt, ist jedoch der gleiche:

1. Detektion der Zellkernränder mittels eines zwei- oder dreidimensionalen Gradienten.
2. Alle Voxel, die dem Zellkernrand angehören, werden im binären Gradientenbild markiert.
3. Initialisierung eines Vektorfeldes, welches die Größe des Bildes hat.
4. Abrastern des Gradientenbildes, wobei die Abrasterung gestoppt wird, wenn eines der Voxel im Gradientenbild markiert ist.
5. Abtastung der 26er Nachbarschaft (3x3x3 Maske) des markierten zentralen Voxels.
6. Ist das Nachbarvoxel im Gradientenbild nicht markiert, dann wird der Distanzvektor des zentralen Voxels übernommen, die Komponenten der Maske zu diesem hinzuaddiert und das Voxel im Gradientenbild markiert.
7. Ist ein Nachbarvoxel im Gradientenbild markiert, dann werden die Komponenten der Maske zu den Vektorkomponenten des Nachbarvoxels addiert, die Beträge der Distanzvektoren des Nachbarvoxels und des zentralen Voxels berechnet und verglichen und der Vektor mit minimalem Betrag als neuer Distanzvektor eingetragen.
8. Wiederaufnahme des Scanns des Gradientenbildes.
9. Die Schritte 4 bis 8 werden solange wiederholt und der Bildstapel solange iterativ vorwärts abgerastert, bis die Einträge des Vektorfeldes sich nicht mehr ändern, also eine stabile Lösung erreicht ist.

Der erste Schritt, die Detektion der lateralen Zellkernränder, erfolgt mit dem Sobeloperator, auf welchen zusätzlich in axiale Richtung ein Cannyoperator folgt [61]. Für die Erkennung der Ränder von Objekten innerhalb des Zellkernes wurden die gleichen Operatoren angewendet.

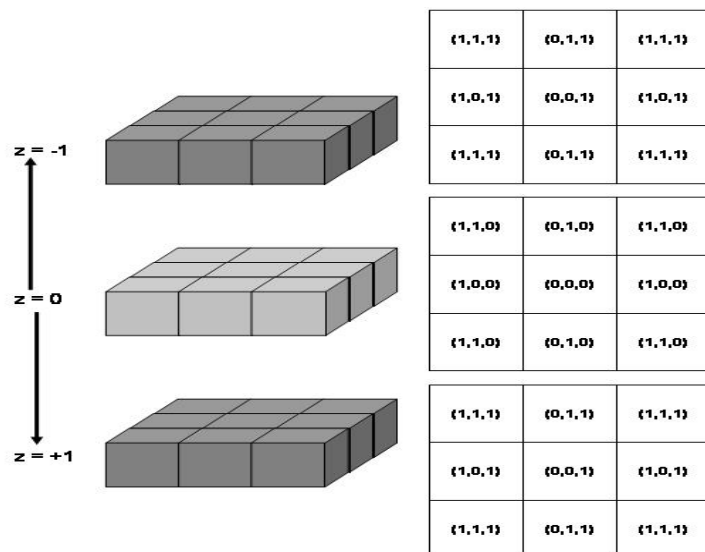


Abbildung 5.16: Die verwendete Maske ist eine 3x3x3 Maske, welche das Objekt in drei Ebenen, ausgehend von der zentralen Ebene $z = 0$ abtastet. Die Einträge sind Vektoren, die den Abstand $dist_{Maske}(x_i | y_i)$ eines Voxel \vec{y} vom zentralen Voxel $\vec{x} = (0, 0, 0)$ angeben.

Die als Zellkernrand erkannten Voxel werden im binären Gradientenbild markiert. Zur Speicherung der Distanzvektoren wird ein sechsdimensionales Vektorfeld initialisiert, wobei drei Komponenten für die Koordinaten des Voxels und drei Komponenten für den Distanzvektor reserviert sind. Der Scan des Gradientenbildes erfolgt von links oben nach rechts unten und wird gestoppt, wenn ein Voxel \vec{x} im Gradientenbild markiert ist. Die Abtastung der 26er Nachbarschaft des zentralen Voxels \vec{x} erfolgt zunächst im Gradientenbild. Ist ein Voxel \vec{y} innerhalb dieser Nachbarschaft nicht markiert, werden die Koordinaten im Vektorfeld gespeichert und die Komponenten $dist_{euklid}(y_i)$ des Distanzvektors nach

$$dist_{euklid}(x_i | y_i) = dist_{Maske}(x_i | y_i) + dist(x_i) \quad (5.26)$$

berechnet und als Distanzvektor gespeichert, wobei $dist_{Maske}(x_i | y_i)$ der i-ten Maskenkomponente und $dist(x_i)$ der i-ten Distanzkomponente des zentralen Voxels entspricht. Abschließend wird das Voxel \vec{y} im Gradientenbild markiert. Ist ein Voxel \vec{z} hingegen innerhalb der 26er Nachbarschaft im Gradientenbild markiert, so werden zunächst die Distanzkomponenten von \vec{x} und die Maskenkomponenten von \vec{z} addiert (siehe Gleichung 5.26). Der Betrag des resultierenden Distanzvektors $dist_{euklid}(\vec{x} | \vec{z}_x)$ gibt den Abstand des Voxels \vec{z} zum Zellkernrand vom Voxel \vec{x} aus gesehen an und wird mit dem Betrag des eingetragenen $dist(\vec{z})$ verglichen. Ist der Betrag des Vektors $dist_{euklid}(\vec{x} | \vec{z}_x)$ kleiner, so wird der zugehörige Vektor als neuer Vektor eingetragen, d.h. es erfolgt eine Veränderung des Vektorfeldes, welche gespeichert wird. Sind alle Nachbarvoxel abgetastet, so wird der Scan des Bildes fortgesetzt und iterativ wiederholt, bis keine Veränderungen des Vektorfeldes mehr erfolgt, also eine stabile Lösung erreicht ist. Durch Multiplikation der einzelnen Distanzvektorkomponenten mit den Voxelgrößen $\vec{\Delta} = (\Delta_1, \Delta_2, \Delta_3)$ in die zugehörige Raumrichtung und unter Verwendung der euklidischen Metrik wird die Distanz jedes Voxels zu den Zellkern- oder Objekträndern berechnet. Die maximale minimale Distanz $dist_{max}$ wird, analog dem Chamfering Algorithmus, zur Normierung und Einteilung des Zellkernes in Schalen verwendet:

$$dist_{norm}(\vec{x}) = \frac{dist_{\vec{x}}}{dist_{max}} \cdot Schalenanzahl \quad (5.27)$$

Die Invertierung der normierten Distanzen erfolgt analog dem Chamfering Algorithmus, sodass die prozentuale Schaleneinteilung von innen nach außen zunimmt. Abbildung 5.17 zeigt die Kartierung eines Beispielobjektes.

5.3.4 Auswertung der Zellkernkartierung

Die Berechnung der Schwerpunktsposition von Genen, Zentromeren und Chromosomen und die Verteilung der DNA im kartierten Zellkern erfolgt mit dem Programm *Statistik1*, welches auf alle kartierten Zellkerne angewendet werden kann. Bevor die markierten Chromosomen und Subregionen jedoch kartiert werden können, müssen diese zunächst gelabelt werden, d.h. jedem zusammenhängenden Objekt wird eine Nummer zugeordnet. Das Labeling erfolgt mit den Programmen *deleteobj_3D* und *Label_3D* (siehe [33]), wobei alle Voxel, welche sich innerhalb einer 26er Nachbarschaft des zentralen Voxel befinden, als Objekt angesehen werden. Das resultierende gelabelte Bild wird anschließend, zusammen mit dem segmentierten Bild und dem kartierten Zellkern, in das Programm *Statistik1* eingelesen. Der Programmablauf ist folgender:

1. Detektion der Anzahl der Objekte innerhalb des Zellkerns.

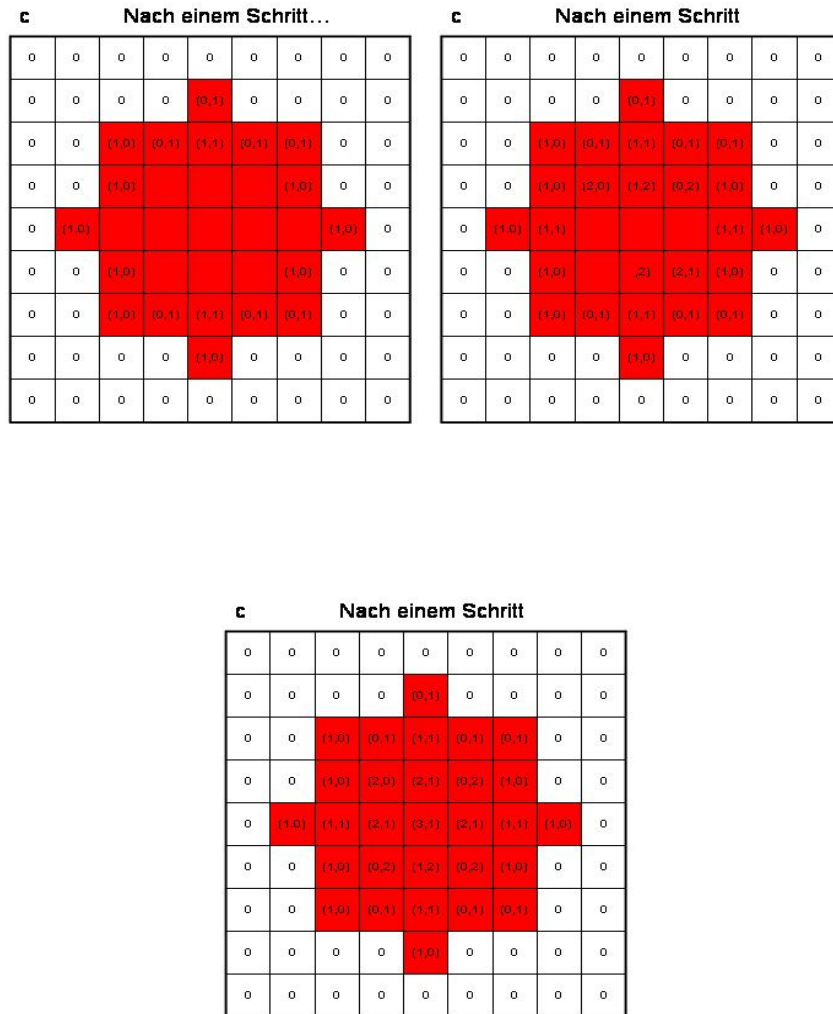


Abbildung 5.17: Die Abbildung verdeutlicht die Funktionsweise der euklidischen DT. In Abbildung a ist das zu kartierende Objekt (rot) zu sehen. Zunächst werden die Ränder detektiert und diesen ein Vektor zugewiesen (Abbildung b). Ausgehend von den detektierten Rändern wird das ganze Objekt abgerastert, bis es vollständig kartiert ist (Abbildung c). Auffallend ist der Unterschied zur Chamfering DT, das zentrale Objektvoxel hat die Distanz $dist_{eukl} = \sqrt{3^2 + 1^2} = 3.16$, während die Chamfering DT einen Wert von $dist_{cham} = 3.4$ ergibt.

2. Berechnung der Koordinaten des geometrischen Schwerpunktes und des Intensitätsschwerpunktes jedes Objektes.
3. Auslesen der relativen radialen Position mittels der Schwerpunktskoordinaten aus dem kartierten Zellkernbild.

Der erste Punkt wird durch Abrastern des Bildes realisiert. Hierbei wird die maximale Objektzahl n_{max} gesucht, welche, aufgrund des Labeling, der Anzahl der Objekte im Bild entspricht. Zur Berechnung der Schwerpunkte muß das Bild nochmals n_{max} Mal abgerastert werden. Die Berechnung des geometrischen Schwerpunktes erfolgt analog der Berechnung des geometrischen Zellkernschwerpunktes nach Gleichung 5.13, der Intensitätsschwerpunkt ist gegeben durch:

$$\vec{S}_{Objekt} = \frac{\sum_{i=1}^n \vec{r}_i I_i}{\sum_{i=1}^n I_i} \quad (5.28)$$

wobei I_i die Intensität am Ort r_i ist. Anhand der Schwerpunktskoordinaten kann jetzt die relative radiale **und** die absolute Position bestimmt werden, da diese dem eingetragenen Variablenwert an der Position des Objektschwerpunktes im kartierten Zellkernbild entspricht. Die relative radiale Position wird zusammen mit der Objektzahl und Zellkernnummer in einem ASCII-File gespeichert.

5.4 Messung der Fluorophorverteilung von Objekten

Da die Größe von Objekten im Zellkern ein entscheidender Ansatzpunkt für funktionelle Eigenschaften ist, wurde das Programm *Gaussfit* entwickelt. Das Programm paßt über den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Levenberg-Marquardt-Algorithmus eine zweidimensionale Gaußverteilung an die mit dem Tophat (siehe Kapitel 5.1.5) segmentierten Objekte an. Aus den resultierenden Standardabweichungen $\vec{\sigma}$ werden die, um die PSF korrigierten, Halbwertsbreiten $\vec{F} = (F_x, F_y, F_z)^t$ berechnet. Die Anpassung erfolgt drei Mal in jeweils zwei Raumrichtungen, sodass jede Halbwertsbreite F_i zweimal berechnet wird. Mit Hilfe der Halbwertsbreiten werden die Fluorophorverteilungen der Objekte als Ellipsoide und Kugeln beschrieben (siehe Kapitel 4).

5.4.1 Berechnung der Halbwertsbreite

Das Programm *Gaussfit* besteht aus drei Funktionen und dem Hauptteil. Die Funktion *gauss_ls* berechnet anhand der Modellfunktion 3.32 und dem gegebenen Datensatz die LS-Funktion (engl. least square) und die Funktion *gauss_jacobi* die entsprechenden Einträge der Jacobi-Matrix. Die dritte Funktion wird dazu verwendet die Parameter der beiden anderen Funktionen zu bündeln, sodass dem GSL-Arbeitsbereich zur Lösung ein vollständiges System der Modellfunktion und deren Ableitungen übergeben wird. Ausgehend von diesen Funktionen ist der Ablauf des *Gaussfit*-Programmes wie folgt:

1. Berechnung der Startparameter $\vec{a}_0 = (A, \bar{x}_i, \bar{x}_j, \sigma_i, \sigma_j, b)$.
2. Initialisierung des GSL-Arbeitsbereiches und der Funktionenumgebungen. Hierbei wird einerseits eine Optimierungsklasse initialisiert, welche die Matrizenrechnung und die Optimierungsschritte vornimmt, und andererseits die Funktion und deren Ableitungen berechnet.
3. Einlesen der Datenpunkte y_i und des Fehlers γ_i in einer 20x20 Umgebung, was einem Quadrat mit einer Seitenlänge von ca. $1 - 1.5\mu m$ entspricht.
4. Starten des Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit der Konvergenzbedingung $|S(\vec{x} | \vec{a}) - S(\vec{x} | \vec{a} + \delta\vec{a})| < \epsilon$, wobei $\epsilon < 10^{-6}$ gilt. Wenn diese erfüllt ist, so wird der Algorithmus unterbrochen, andernfalls wird nach 2000 Iterationen unterbrochen und die Anpassung als nicht möglich angesehen.
5. Ausgabe des optimalen Parametersatzes und deren Fehler, sowie die Berechnung der Halbwertsbreiten.

Der erste Schritt, die Berechnung der Startparameter erfolgt über mehrere Stufen. Zunächst wird der Schwerpunkt \vec{x} berechnet und je 2 Koordinaten als Startparameter der Erwartungswerte \bar{x}_i, \bar{x}_j gewählt. Die Amplitude A ergibt sich aus dem Grauwert im Schwerpunkt. Als Startwert des Hintergrundes b wird der mittlere Hintergrund des Zellkerns gewählt und die Halbwertsbreiten der PSF in Richtung i und j als Standardabweichungen σ_i, σ_j . Die Syntax zur Initialisierung und Verarbeitung des GSL-Arbeitsbereiches ist in der Dokumentation der GSL-Bibliothek nachzulesen [50]. Der dritte Schritt, die Wahl des Bereiches, aus welchem die Datenpunkte eingelesen werden, ergibt sich aus Vorabinformation des Experimentators über die Größe des Objektes und ist entsprechend groß gegenüber der Objektgröße gewählt. Der

mathematische Hintergrund und Ablauf des Levenberg-Marquardt-Algorithmus, ebenso wie die Berechnung des Volumens der Fluorophorverteilung kann der interessierte Leser in Kapitel 3.3.1 und 4.4 nachlesen.

5.5 Distanzmessungen

Die absoluten und normierten Distanzen und Schwerpunktswinkel zwischen zwei im Zellkern markierten Objekten wurde in das Programm *Distanzen* implementiert. Die Eingabe des Programms verlangt, das die Objekte bereits gelabelt sind, was mit den Khorosprogrammen *deleteobj_3D* und *Label_3D* [33] realisiert wird. Der Programmablauf ist wie folgt:

1. Zählen der n gelabelten Objekte im Bild
2. Berechnung der geometrischen Schwerpunkte $\vec{S}_{geo}(\vec{x} | i)$ und der Intensitätsschwerpunkte $S_{Int}(\vec{x} | i)$ aller Objekte $i = 1 \dots n$. Zusätzlich wird der Zellkern kartiert (siehe Kapitel 5.3) und dessen Schwerpunkt $\vec{S}_{Kern}(\vec{x})$ berechnet.
3. Berechnung der euklidischen absoluten Distanzen (siehe Gleichung 5.25) $d_{euklid}(Kern - i) = \|\vec{S}_{geo/Int}(\vec{x} | i) - \vec{S}_{Kern}(\vec{x})\|$ zwischen i -ten Objekt und den Zellkernschwerpunkt, sowie zwischen den Objekten i und j $d_{j-i} = \|\vec{S}_{geo/Int}(\vec{x} | j) - \vec{S}_{geo/Int}(\vec{x} | i)\|$.
4. Aus den Distanzen d_{Kern-i} , d_{Kern-j} und d_{j-i} wird anhand des Cosinussatzes, der Schwerpunktswinkel α_{Kern}

$$\alpha_{Kern} = \arccos\left(-\frac{(d_{j-i})^2 - (d_{Kern-i})^2 - (d_{Kern-j})^2}{2d_{Kern-i}d_{Kern-j}}\right) \quad (5.29)$$

berechnet.

5. Die normierten Distanzen n_{Kern-i} und n_{Kern-j} Objekt-Zellkernschwerpunkt werden anhand des kartierten Zellkernes bestimmt.
6. Die normierte Distanz n_{j-i} zwischen den Objekten i und j wird mit den normierten Distanzen n_{Kern-i} und n_{Kern-j} und dem Schwerpunktswinkel α_{Kern} anhand des Cosinussatzes

$$n_{j-i} = \sqrt{(n_{Kern-i})^2 + (n_{Kern-j})^2 - 2n_{Kern-i}n_{Kern-j}} \quad (5.30)$$

berechnet.

Die resultierenden Parameter absolute und normierte Distanz zwischen den Objekten d_{j-i} bzw. n_{j-i} und der Schwerpunktswinkel α_{Kern} werden in Kapitel 4.2 erklärt.

5.6 Minkowskifunktionale

Die in Kapitel 4.3 eingeführten Gleichungen der Minkowskifunktionale sind kontinuierliche Funktionen. Da digitale Aufnahmen diskrete Gitter sind, wird die Gleichung von Crofton in diesem Kapitel auf diskrete Gitter adaptiert. Eingehendere Darstellungen zur Diskretisierung der integralgeometrischen Gleichungen, so wie Ansätze zum Quellcode können in [84] nachgelesen werden. Die Berechnung der Minkowskifunktionale wurde das Programm *Minkowski_abs* implementiert. Das Programm besteht aus zwei wesentlichen Schritten, einem Integrationsschritt, der im Kapitel 5.6.1 erklärt und mit einem Marching Cube realisiert wird, und einem Analyseschritt, bei welchem die MF berechnet werden und auf dessen Ablauf in Kapitel 5.6.2 eingegangen wird.

5.6.1 Marching Cube Methode

Die Ausführung des Integrationsschrittes beginnt mit dem gegebenen binären Bild B , welches mit einem $2 \times 2 \times 2$ Filter F gefaltet wird. Die Konvolution $G = B * F$ resultiert in einem Grauwertbild G , dessen Bildtiefe 8 Bit mit $n = 2^8 - 1$ möglichen Werten ist. Die acht Filtermaskeneinträge sind gegeben durch

$$f_{ijk} = 2^{i+2j+4k} \quad (5.31)$$

Eine Darstellung des Filters F ist in Abbildung 5.18 **a** zu sehen. Die Berechnung der resultierenden Grauwerte $g(x_1, x_2, x_3)$ ergibt sich aus

$$\begin{aligned} g(x_1, x_2, x_3) = & b(x_1, x_2, x_3) + 2b(x_1 + 1, x_2, x_3) + 4b(x_1, x_2 + 1, x_3) + \\ & 8b(x_1 + 1, x_2 + 1, x_3) + 16b(x_1, x_2, x_3 + 1) + \\ & 32b(x_1 + 1, x_2, x_3 + 1) + 64b(x_1, x_2 + 1, x_3 + 1) + \\ & 128b(x_1 + 1, x_2 + 1, x_3 + 1) \end{aligned} \quad (5.32)$$

wobei für $b(\vec{x})$ gilt

$$b(\vec{x}) = \begin{pmatrix} 1 & \text{wenn das Voxel zum Objekt O gehört} \\ 0 & \text{wenn das Voxel zum Komplement von O gehört} \end{pmatrix}$$

Der Wert $g(x_1 x_2 x_3)$ gibt die Nachbarschaftrelation des Voxels \vec{x} innerhalb der $2 \times 2 \times 2$ Nachbarschaft wieder. Ein Beispiel für die Berechnung der Konvolution des Bildes B mit der Filtermaske F ist in Abbildung 5.18 **b** zu sehen. Mit den gegebenen Grauwerten $g(x_1 x_2 x_3)$ wird nun der Integrationsschritt durchgeführt

$$h(i) = \sum_{x_1=0}^{SizeX-1} \sum_{x_2=0}^{SizeY-1} \sum_{x_3=0}^{SizeZ-1} \delta_i(g(x_1 x_2 x_3)) \quad (5.33)$$

Der Vektor \vec{h} entspricht der kondensierten Form des binären Bildes B und wird als absoluter Häufigkeitsvektor der Nachbarschaftskonfigurationen bezeichnet. Die Summation ist korrespondierend zu den Integrationen in Kapitel 4, da diese über das ganze Bild $x_j = 0 \dots Size(j) - 1$ in drei Raumrichtungen erfolgt, und alle Informationen zur Berechnung der Minkowskifunktionale enthält. Der Name Marching Cube Methode resultiert aus der Betrachtung des kubischen Filters F , mit welchem das Bild abgerastert wird.

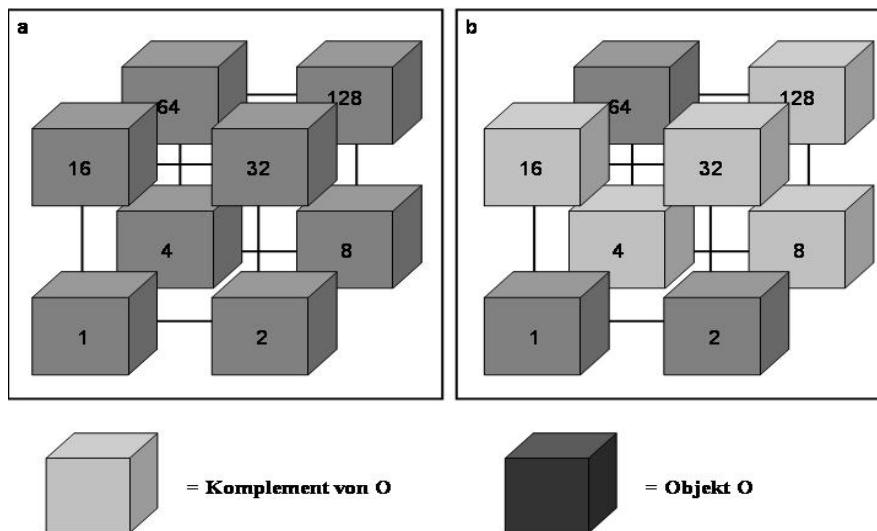


Abbildung 5.18: Anhand des Marching Cube (Abbildung a), ein $2 \times 2 \times 2$ F Filter, wird jedem Voxel die Nachbarschaftsrelationen innerhalb des Cube zugewiesen. Abbildung b zeigt ein Beispiel Cube, die hellgrauen Voxel gehören dem Komplement des Objektes an, die dunkelgrauen Voxel sind Objekt. Der resultierende Grauwert der Nachbarschaftsrelationen ist $g = 1 + 2 + 64 = 67$.

5.6.2 Berechnung der MF

Die Berechnung der MF in diskreten Gittern erfolgt anhand des absoluten Häufigkeitsvektors $\vec{h}(i)$. Da dieser den Integrationsschritt enthält, müssen, um die MF zu erhalten, nur noch die jeweiligen Schnitte des Objektes O mit den n -dimensionalen Ebenen auf diskrete Gitter übertragen werden.

Normiertes Volumen

Das normierte Volumen $V_V(O)$ eines Objektes entspricht dem relativen Volumen, bezogen auf den Zellkern und ist definiert als:

$$V_V(O) = \frac{\sum_{i=0}^{127} h(2i+1)}{\sum_{i=0}^{2^n-1} h(i)} \quad (5.34)$$

Dies entspricht einem Zählen der Anzahl der dem Objekt zugehörigen Voxel mit anschließender Normierung auf das gesamte untersuchte Volumen. Nach der Gleichung von Crofton entspricht dies dem Schnitt des Objektes mit einem Punkt und anschließender Normierung auf das Gesamtvolumen.

Spezifische Oberflächendichte

Die diskrete Definition der spezifische Oberflächendichte $\hat{S}(O)$ des Objektes O ist, im Vergleich zum Volumen, nicht trivial. Nach Croftons Formel (Kapitel 4.3) ergibt sich die Fläche aus der Integration über alle Richtungen der Totalprojektion. Im Diskreten entspricht dies dem Abzählen der Schnitte einer Geraden mit dem Objekt O in alle Raumrichtungen. In einem $2 \times 2 \times 2$ Kubus kann eine Schnittlinie zwischen 2 Ecken des Kubus definiert werden, wenn eine Ecke dem Objekt O und die andere zum Komplement von O angehört. Dies ergibt ein

System von 26 möglichen Testsegmenten (unter Beachtung der Symetrie nur 13) zwischen zwei Eckpunkten innerhalb eines Kubus bei einem Drehwinkel von 45° . Die 13 verschiedenen Linien entsprechen den 3 Seitenlinien, 6 Flächendiagonalen und 4 Raumdiagonalen. Die Länge r_ν und Richtung $\omega_\nu = (\vartheta_\nu, \varphi_\nu)$ des Segmentes $\nu = 1 \dots 13$ werden mittels Kugelkoordinaten definiert (siehe Tabelle in [84], Seite 131), wobei r_ν aus den Voxelgrößen $\vec{\Delta} = (\Delta_1, \Delta_2, \Delta_3)$ berechnet wird. Die diskrete Summe der Totalprojektionen pro Volumeneinheit in Richtung $\hat{\phi}(\omega_\nu)$ des Segmentes ν ist gegeben mit

$$\hat{\phi}(\omega_\nu) = \frac{1}{nr_\nu} \sum_{i=0}^{255} h_i \delta_i (i \vee \kappa_{0,\nu}) \delta_0 (i \wedge \kappa_{1,\nu}) \quad (5.35)$$

wobei $\kappa_{0,\nu}$ und $\kappa_{1,\nu}$ den Koeffizienten der Filtermaske F entsprechen. Die spezifische Oberflächendichte $\hat{S}(O)$ ergibt sich mit Gleichung 5.35 aus der Summation über alle Richtungen ν

$$\hat{S}(O) = 4 \sum_{\nu=0}^{25} c_\nu \hat{\phi}(\omega_\nu) \quad (5.36)$$

Der Übergang zu einer diskreten Formulierung der Gleichung von Crofton, macht es nötig die Gewichte c_ν , für welche $c_{\nu+13} = c_\nu$ gilt, einzuführen. Die Gewichte c_ν erzeugen somit eine Isotropie der Schnittlinien. Die Werte der Gewichte ergeben sich aus einer Zerlegung der Einheitskugel in Voronoizellen des entsprechenden Testsegmentes ν und stimmen mit der Fläche der Voronoizelle. Abbildung 5.19 verdeutlicht die Berechnung der spezifischen Oberflächendichte.

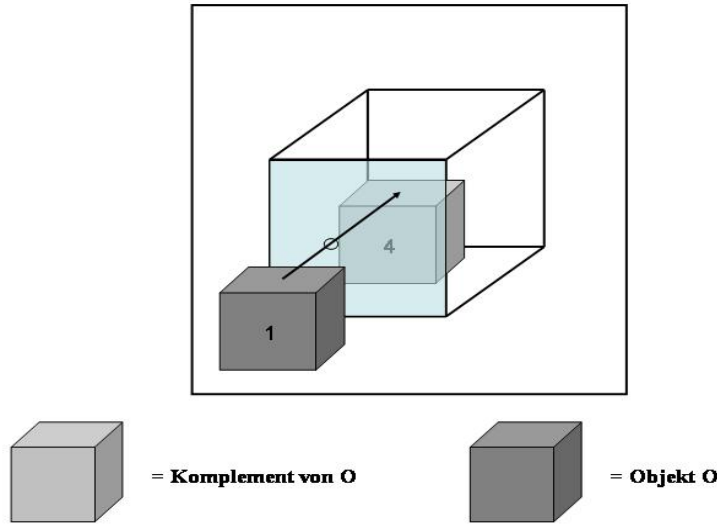


Abbildung 5.19: Die Gerade (blau), welche die Verbindungslinie zwischen den Voxel an der Position 1 und 4 bildet, die Länge $r_\nu = \Delta_2$ in Richtung $\nu = 1$, wird mit einer senkrechten Ebene geschnitten. Die Projektion dieser Ebene auf die Einheitszelle entspricht der spezifischen Fläche $\phi(\omega_1) = \frac{\Delta_1 \Delta_2 \Delta_3}{\Delta_2}$. Normiert auf das Volumen entspricht dies einer spezifischen Oberflächendichte von $\phi_V(\omega_1) = \frac{\phi(\omega_1)}{\Delta_{123}}$ mit $\Delta_{123} = \sqrt{\Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \Delta_3^2}$.

Spezifische aufintegrierte mittlere Krümmung

Die allgemeine Definition der Krümmung k entspricht der Richtungsänderung pro Länge. Ein Kreis mit dem Radius R hat demnach die Krümmung $k = \frac{1}{R}$, was dem inversen Wert des Radius entspricht. Die allgemeine Definition der mittleren Krümmung $\hat{k} = \frac{1}{2}(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2})$ einer gewölbten Fläche ergibt sich aus dem minimalen r_1 und maximalen r_2 Radius der Kreise, die an die Krümmungskurve k in einem Punkt angelegt werden können. Das Integral über die mittlere Krümmung ergibt, mit der Objektoberfläche als Grenze, die mittlere aufintegrierte Krümmung. Aus der Gleichung von Crofton ergibt sich die diskrete aufintegrierte Krümmung $\hat{M}(O)$ aus der Summation über die Anzahl der Schnitt einer Ebene mit dem Objekt O . Analog der Definition von $S(O)$, lassen sich in einem Kubus 26 Schnittebenen, unter Beachtung der Symmetrie nur 13, mit den Ecken des 2x2x2 Kubus definieren. Hieraus ergeben sich neun rechteckige und vier dreieckige Schnittprofile. Über die auf die Schnittfläche a_ν normierte Eulerzahl $\hat{\chi}_A(\omega_\nu) = \frac{\hat{\chi}^2(\omega_\nu)}{a_\nu}$ in Abhängigkeit von der Richtung ω_ν ergibt sich die spezifische aufintegrierte Krümmung zu:

$$\hat{M}(O) = 2\pi \sum_{\nu=0}^{25} c_\nu \hat{\chi}_A(\omega_\nu) \quad (5.37)$$

An Abbildung 5.20 wird deutlich, wie sich die Eulerzahl für die Schnittebenen aus einer gegebenen Konfiguration des Vektors \vec{h} ergibt, deren allgemeine dreidimensionale Definition $\chi = l - k + f$ mit $l = \text{Ecken}$, $k = \text{Kanten}$ und $f = \text{Elementarflächen}$ ist. Die richtungsabhängige Eulerzahl für rechteckige und dreieckige Schnitte, sowie die Gewichtungen c_ν , die aus Gründen der Isotropie die Eulerzahl gewichten, können in [84] nachgelesen werden.

Eulerzahl und totale integrierte Krümmung

Die oben eingeführte Eulerzahl kann, nach obiger Definition, auch auf die 256 Nachbarschaftskonfigurationen innerhalb des 2x2x2 Kubus angewendet werden. Die Aussage der Eulerzahl bezieht sich dann auf die Kompaktheit des Objektes O , eine große negative Eulerzahl entspricht einem weit verzweigten Objekt, eine kleine positive Eulerzahl einem sehr dichten, wenig verzweigten Objekt. Der Beitrag der 256 Nachbarschaftskonfigurationen ist über einen Vektor u gegeben (siehe [84] und [114]). Die auf das Volumen $V = (\sum_{i=0}^{255} h(i))\Delta_1\Delta_2\Delta_3$ normierte Eulerzahl

$$\hat{\chi}_V = \frac{1}{V} \sum_{i=0}^{255} h(i)u(i) \quad (5.38)$$

resultiert aus dem Skalarprodukt des absoluten Häufigkeitsvektors $h(i)$ und dessen Gewichtung $u(i)$. Da der Marching Cube richtungsabhängig ist und hieraus ein Kanteneffekt resultiert, ist $\hat{\chi}_V$ verzerrt. Eine Mittelung über alle 24 Rotationsrichtungen des im Mittelpunkt zentrierten Kubus hebt diesen Effekt auf und führt auf die totale integrierte Krümmung \hat{K}_V . Die Definition der totalen integrierten Krümmung kann anhand der Definition der gaußschen Krümmung $k = \frac{1}{r_1} \cdot \frac{1}{r_2}$ verdeutlicht werden, diese ist unabhängig vom Bezugssystem und macht es möglich die Orte der Krümmung zu klassifizieren. Die diskrete Definition der totalen integrierten Krümmung ergibt sich aus der Summation über alle Richtungen ω_ν des Kubus zu

$$\hat{K}_V = 4\pi \sum_{\nu=0}^{23} c_\nu \hat{\chi}_V(\omega_\nu) \quad (5.39)$$

Für die Gewichtungen c_ν gilt hier $c_\nu = \frac{1}{24}$, da keine bevorzugte Richtung existiert.

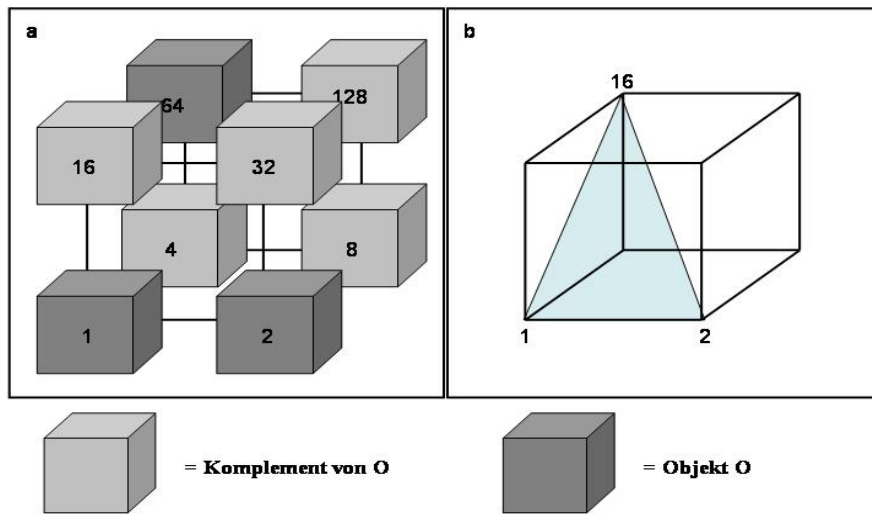


Abbildung 5.20: Die Eulerzahl der gegebenen Objektkonfiguration kann anhand der dreieckigen Schnittebenen (blau) hergeleitet werden. Das Dreieck hat drei Ecken, drei Kanten und eine Dreiecksfläche, woraus sich die Eulerzahl $\chi = 1$ ergibt.

Kapitel 6

Ergebnisse der vital COMBO-FISH (=vCF)

Die biologische Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung einer Methode zur spezifischen Markierung von Chromatin mittels PNA-Oligonukleotiden in lebenden Zellen, vital COMBO-FISH (=vCF) genannt. Die Motivation für die Entwicklung einer vCF ist die Erhaltung der nativen Chromatinstruktur, weshalb auf einen Denaturierungsschritt der Ziel-DNA, auf chaotrope Detergenzien und eine enzymatische Behandlung der Zellen verzichtet werden muß (siehe Kapitel 1). Die vorhandenen Standard-FISH Methoden verwenden Detergenzien, welche die Zellen permeabilisieren, behandeln die Zellen mit Enzymen, welche zur Zerstörung der Proteinstruktur führen, und denaturieren die DNA bei ca. 70-80 Grad Celsius. Die vCF Methode hingegen verzichtet auf alle aufgezählten Prozeduren. vCF erfolgt in lebenden Zellen, indem eine PNA-Sonde in den Zellkern mikroinjiziert wird, und zur Untersuchung der markierten Chromatinstruktur werden die Zellen lediglich fixiert. Die PNA-Sonde wurde in primäre T-Lymphozyten mit einem eindeutigen Karyotypen injiziert, sodass die Spezifität der Bindung anhand der Anzahl der Signale gewährleistet ist. Das entwickelte Protokoll, d.h. die Vorbereitung der Zellen zur Mikroinjektion, die Prozedur der Mikroinjektion, die anschließende Behandlung der Zellen und die qualitativen Ergebnisse werden in Kapitel 6.1 und 6.2 vorgestellt. Die Resultate des quantitativen Vergleichs der Topologie von Zentromer 9 zwischen Standard-FISH und vital COMBO-FISH erfolgt in Kapitel 6.3. Die verwendeten Protokolle und Lösungen sind im Anhang zu finden.

6.1 Mikroinjektion

Im Folgenden wird das Protokoll der vCF von der Vorbereitung, über die Mikroinjektion bis zur Fixierung der T-Lymphozyten erklärt. Die Bearbeitung des vollständigen Protokolls, d.h. die gesamte Vor- und Nachbearbeitung der Zellen, inklusive Mikroinjektion, dauert drei Tage. Die Arbeitsschritte des ersten Tages, an welchem die Materialien vorbereitet werden, sind wie folgt:

1. Reinigung der Deckgläser für 5 min unter Schütteln mit einer Reinigungslösung (50% H_2O /25%Ammoniak/25%Isopropanol).
2. Die Reinigungslösung mit deionisiertem und autoklaviertem H_2O durch 2x Spülen der Deckgläser entfernen.

3. Sterilisation der Deckgläser bei 200°C für 2 Stunden oder in der Sterilbank mit einem Bunsenbrenner (=Rußbildung beachten).
4. Alle weiteren Schritte finden in der Sterilbank statt! Die Deckgläser in 180 mm Petrischalen (steril) legen.
5. Auftropfen von 100 μ l einer 0.01% Poly-L-Lysin Lösung und Inkubation für 3 Stunden bei Raumtemperatur (=RT).
6. Spülen der Deckgläser in der Petrischale mit deionisiertem und autoklaviertem H₂O.
7. Absaugen und Trocknen der Deckgläser. Die Petrischalen werden verschlossen und können bei RT so steril für mehrere Tage gelagert werden.
8. Vorbereitung einer 20 mM HEPES-Kulturmediumlösung. Die Lösung wird über Nacht bei 37°C gelagert.
9. Vorbereitung der Injektionslösung. Die Zentromer 9 PNA-Sonde wird im Injektionspuffer auf eine 2.67 μ M Konzentration gebracht.

Mit den Protokollen des zweiten Tages sollte am Morgen begonnen werden, da für die im Folgenden geschilderten Arbeitsschritte ca. 6-8 Stunden benötigt werden. Da die Mikroinjektionsanlage für adhärenz Zellen ausgelegt ist, T-Lymphozyten¹ aber Suspensionszellen sind, werden diese mittels der Poly-L-Lysin Beschichtung adhärenz an den Deckgläser fixiert. Das Absinken und Fixieren der T-Lymphozyten am Poly-L-Lysin dauert ca. 3 Stunden und erfolgt folgendermaßen (in der Sterilbank!):

1. Lösen der Zellen durch leichtes Klopfen an der Kulturflasche, da diese absinken und leicht anheften.
2. Überführen der Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen.
3. Ermittlung der Vitalität und Dichte der Zellen (siehe Anhang).
4. Zentrifugieren der Zellsuspension für 10 min bei 200 g
5. Absaugen des Mediums bis zum Zellpellet.
6. Resuspension und 5 min Inkubation des Pellets in 10 ml 1xPBS (vorgewärmt auf 37°C).
7. Zentrifugieren der Zellsuspension für 10 min bei 200 g
8. Absaugen des Mediums bis zum Zellpellet.
9. Resuspension der Zellen in der 20 mM HEPES-Kulturmediumlösung und Verdünnung auf 500.000 Zellen pro ml.
10. Auftropfen von 0.1 ml der Zellsuspension auf die mit Poly-L-Lysin behandelten Deckgläser, welche sich in den Petrischalen befinden.

¹Die verwendeten primäre T-Lymphozyten wurden, mit freundlicher Unterstützung von Frau Hug aus der Arbeitsgruppen von Frau Prof. Hänsch, Immunbiologie Universitätsklinikum Heidelberg, mit CD3-Magnetbead Antikörpern aus dem Blut extrahiert und aufgereinigt.

11. Die Deckgläser werden für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass die Zellen absinken und anheften.
12. Nach 3 Stunden wird die Petrischale mit je 4 ml 20 mM HEPES-Kulturmediumlösung aufgefüllt (vorsichtig!).

Nach der Anheftung der Zellen an die Deckgläser kann mit der Mikroinjektion begonnen werden. Die Mikroinjektion findet bei RT und ohne CO₂ statt, weshalb die Zellen nicht länger als 30 min injiziert werden, um die Apoptose zu vermeiden. Die HEPES-Kulturmediumlösung wirkt hierbei stabilisierend auf den pH-Wert des Mediums. Die verwendete Mikroinjektionsanlage ist ein AIS2-System² [62], welche in Abbildung 6.1 zu sehen ist. Die Anlage ist



Abbildung 6.1: Das Mikroskop mit dem entsprechenden Mikroinjektionsaufsatz ist links zu sehen. In der Mitte und Rechts sind der PC mit der AIS2-Software, der Femtojet und die Kontrolleinheiten für die Motoren abgebildet. (Quelle [62])

vollautomatisiert, d.h. die Zellen werden mit einer Kamera aufgenommen, sodass der Benutzer die Anlage über eine Kontrolleinheit und die AIS2 Software von einem PC aus steuert. Die Injektion erfolgt, indem die zu injizierende Zelle mit einem Mausklick auf dem Bildschirm markiert wird. Anhand der Koordinaten der Markierung wird die Zelle über Motoren angefahren und von diesen eine automatisierte Injektionsbewegung vollzogen. Die auf der Zelle verbleibende Markierung und ein 8x8 Raster über dem Arbeitsbereich ermöglicht eine systematische Mikroinjektion, zusätzlich verhindert dies eine zweifache Injektion der gleichen Zelle. Die Automatisierung und die leicht zu bedienende AIS2 Benutzeroberfläche (Abbildung 6.2) ermöglichen dem geübten Benutzer die Injektion von bis zu 500 Zellen in 30 min. Die einzelnen Arbeitsschritte von der Kalibration des Gerätes bis zum Ende der Injektionen sind wie folgt:

1. Ziehen der benötigten Anzahl von Kapillaren am Puller (Gerät zum ziehen der Kapillare). Verwendet wird das Programm 10, welches Kapillare mit einem Durchmesser der Spitze von ca. 300-500 nm zieht.

²Die Mikroinjektionsanlage wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Licher zur Verfügung gestellt, DKFZ Heidelberg

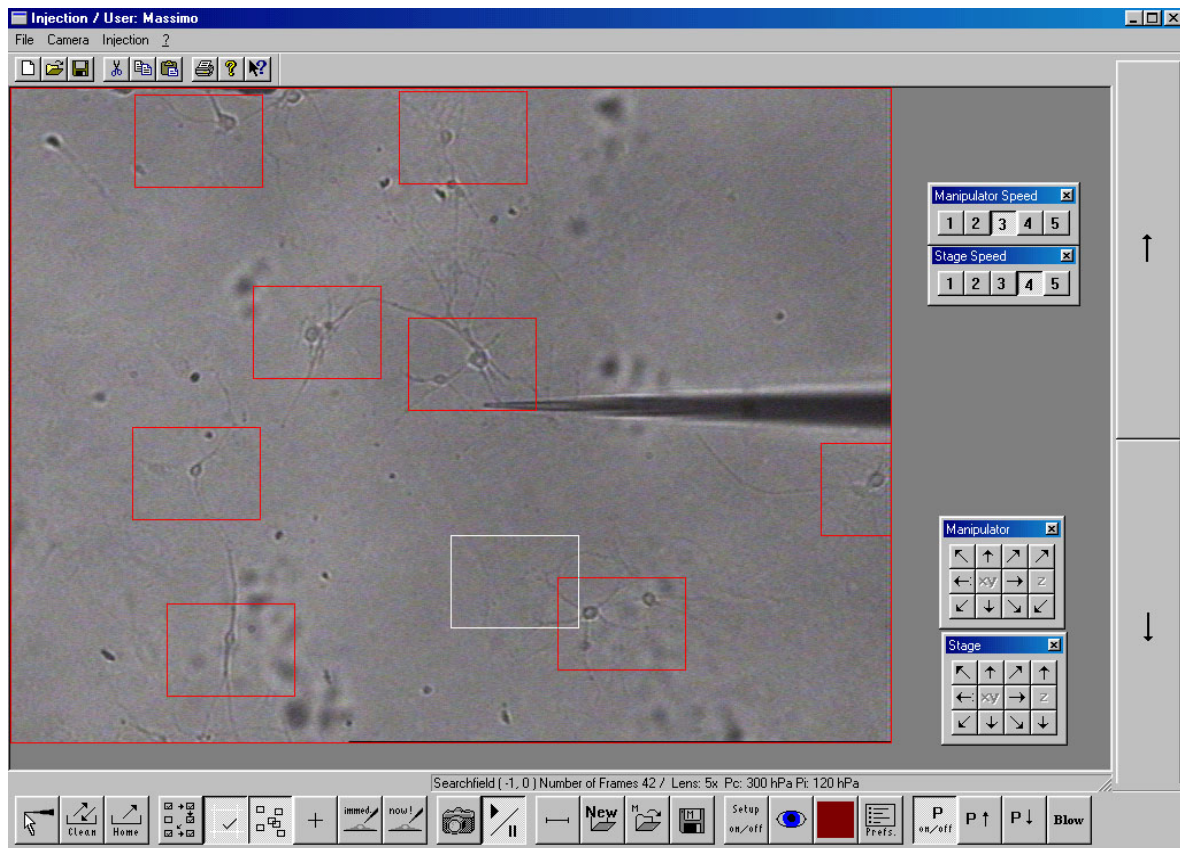


Abbildung 6.2: In der Mitte ist das Kamerabild mit der Spitze der Injektionskapillare zu sehen. Die Bedienerfelder “Manipulator“ und “Stage“ sind für die Steuerung der Motoren und des Mikroskoptisches. Die unter Knopfleiste dient der Steuerung der Mikroinjektionsschritte und der Kalibration des Gerätes. (Quelle [62])

2. Starten des Computers und der AIS2-Software.
3. Beim Starten des Femtojet ist zu beachten, dass entweder der Injektionsschlauch abgezogen, oder die Kapillarspitze verschlossen ist, da ansonsten kein ordnungsgemäßer Druckaufbau erfolgt.
4. Das Objektiv mit der minimalen Vergrößerung wird als Startkonfiguration verwendet.
5. Füllen einer Kapillare mit der zu injizierenden Substanz. Als Pipettenspitzen bieten sich Microloader an, die verlängerte Spitzen haben. Die Kapillare ist unbedingt zu schütteln, um eine Bildung von Luftblasen zu vermeiden, da ansonsten kein ordentlicher Druckaufbau erfolgt.
6. Einspannen einer Kapillare in die Kapillarhaltespitze (Vorsichtig!).
7. Einlegen der Petrischale in die auf dem Mikroskoptisch vorgesehene Halterung.
8. Mit einer sterilen Pinzette wird das Deckglas in die Mitte der Petrischale geschoben. Dieser Schritt sollte nicht vergessen werden, da der Aktionsradius der Kapillare, aufgrund der Petrischale, beschränkt ist.

9. Die Kapillare wird mit der Steuerung an die Petrischale herangefahren und, bis die Kapillarspitze das Kulturmedium, berührt abgesenkt (Blick auf der Petrischale).
10. Weiteres Absenken der Kapillare in das Medium (Vorsichtig! Blick auf den Monitor). Wenn die Spitze der Kapillare sichtbar ist, wird diese in der Mitte des Monitors plziert und zum nächsten Punkt übergegangen.
11. Wechsel des Objektivs zu einer 32-40x Vergrößerung.
12. Einstellen der Fokusebene, sodass, aus axialer Sicht, die obere Zellkernmembran sichtbar ist.
13. Absenken der Kapillare bis die Spitze oberhalb der Zellen ist (Sehr vorsichtig!). Die Kapillarspitze darf sich an diesem Punkt noch nicht im Fokus befinden (oberhalb der Zellen).
14. Drücken des "Setup on/off" Knopfes. Jetzt wird die Höhe der Kapillarspitze eingestellt, sodass diese deutlich sichtbar ist. Der Vorgang wird mit dem Anklicken der Kapillarspitze abgeschlossen.
15. Das Einstellen des Injektionsdruckes p_i , des Kompensationsdruckes p_c und der Injektionszeit erfolgt mit dem Knopf "Pref". Der Injektionsdruck und die -zeit sind zelltypspezifische Parameter und müssen für jeden Zelltyp neu getestet werden. Für die verwendeten T-Lymphozyten wurde ein Injektionsdruck von 50 hPa und eine Injektionszeit von 0.5 s gewählt. Zusätzlich hängt das Injektionsvolumen von diesen beiden Parametern ab. Der Kompensationsdruck ist so zu wählen, dass die zu injizierende Flüssigkeit im Gleichgewicht ist, also statisch die ganze Spitze füllt und keine Flüssigkeit nach innen oder außen läuft (ca. 30 hPa).
16. Mit dem Drücken des "+" Knopfes wird ein 8x8 Raster über die Injektionsumgebung gelegt und die zu injizierenden Zellen werden mit einem Kreuz markiert.
17. Beginn der Injektion, wobei die vollständige 8x8 Umgebung abgerastert wird. Sind alle sich darin befindenden Zellen injiziert wird in einer anderen Region des Deckglases wieder mit Punkt 4 begonnen.
18. Ist die Kapillarspitze verschmutzt, so kann mit dem Drücken des "Clean" Knopfes versucht werden diese wieder zu reinigen. Der "Clean" Knopf verursacht einen 0.1 s langen Injektionsdruck von 6000 hPa. Soll die Kapillarspitze gewechselt werden oder das Injizieren beendet werden, so wird der vollständige Kapillarhalter mit dem "Home" Knopf in die Ruheposition gefahren.

Der Ablauf des eigentlichen Injektionvorgangs ist in Abbildung 6.3 schematisch beschrieben. Nach Beenden des Injektionsvorgang, wird die HEPES-Kulturmedium Lösung gegen das Standardmedium ausgetauscht. Die Deckgläser bleiben zusammen mit den Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Kulturschrank. Der Grund hierfür ist, dass die Zellen, welche das Injizieren überlebt haben, von den apoptotische Zellen nach ca. 4-5 Stunden unterschieden werden können. Nach 24 Stunden werden die Zellen fixiert und gegengefärbt. Die Arbeitsschritte des Protokolls sind wie folgt (in der Petrischale):

1. Waschen der Zellen mit 1xPBS für 30 s.

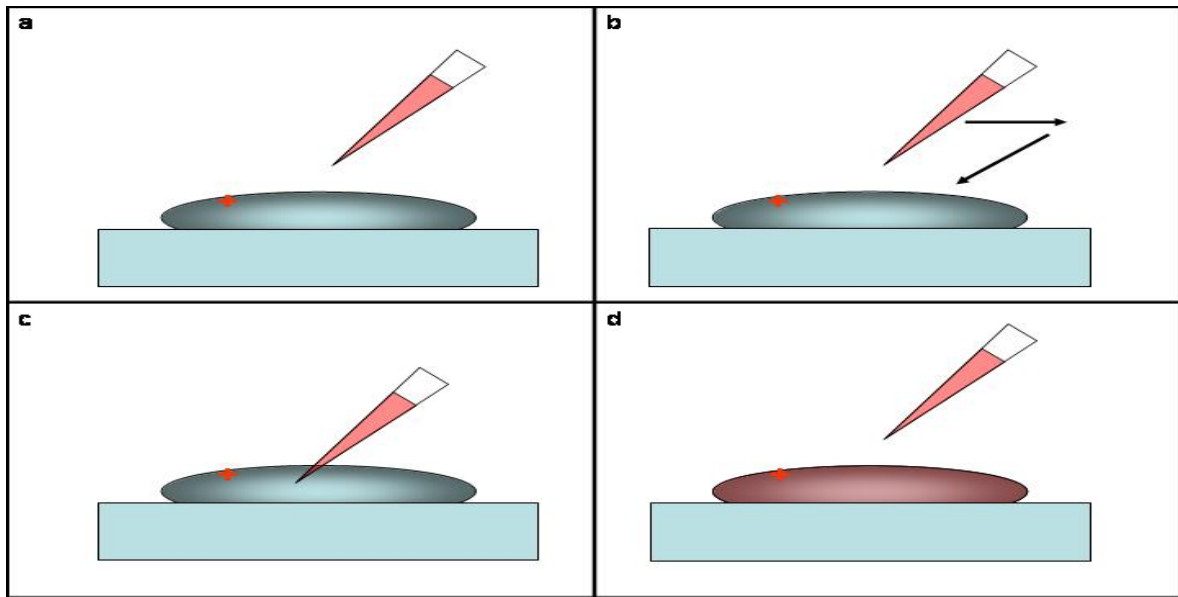


Abbildung 6.3: Die zu injizierende Zelle wird innerhalb des AIS-Arbeitsbereiches markiert (rotes Kreuz) Abbildung a. Die Motoren vollziehen die Injektionsbewegung, indem die Kapillare nach rechts und dann nach links unten bewegt wird (Abbildung b). Die eigentliche Injektion erfolgt mit einem Injektionsdruck von 50 hPa und einer Injektionszeit von 0.5 s (Abbildung c). Die Motoren fahren die Kapillare in die Ausgangsposition zurück (Abbildung d).

2. Fixieren der Zellen mit dem Fixierungsmittel Merckofix, welches auf die Zellen gesprüht wird. Die Einwirkdauer beträgt zwischen 3-10 min.
3. 2x Waschen in 1xPBS für je 7.5 min.
4. Werden die Zellen **ohne** Gegenfärbung verwendet, so kann an dieser Stelle zu Punkt 9 übergegangen werden.
5. Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit 0.5% Triton-X-100 in 1xPBS.
6. Inkubation für 30 min bei 37°C mit 200 μl RNase (Konzentration 100 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$).
7. 2x Waschen in 2xSSC für je 5 min.
8. Gegenfärbung für 2 min mit YOYO-1 in 2xSSC (Konzentration 0.25 μM).
9. Kurz mit 2xSSC waschen und in Vectashield auf einem Objektträger einbetten.
10. Versiegeln des Zwischenraumes von Objektträger und Deckglas mit Fixogum oder Nagellack.

Die Detektion der Zentromer 9 PNA-Sonde, welche am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMR (Tetramethylrhodamin) versehen ist, erfolgt am CLSM mit einem 63xPlanApo NA 1.4 oder 100xPlanApo NA 1.4 Objektiv. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, d.h. YOYO-1 für die Färbung der DNA des Zellkerns (Gegenfärbung) und TMR, wurden mit einem Laser mit den Wellenlängen $\lambda_{YOYO} = 488$ und $\lambda_{TRITC} = 568$ (Abbildung 6.4) angeregt.

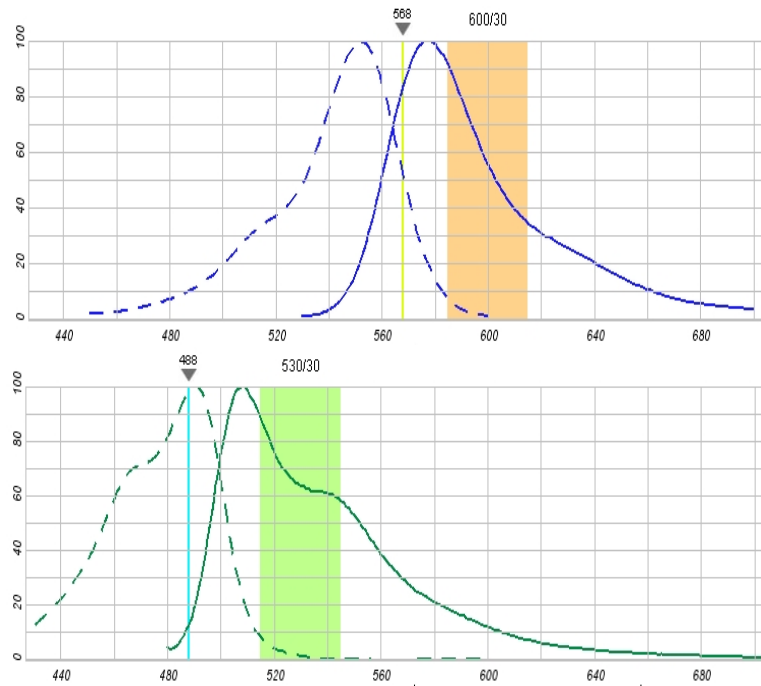


Abbildung 6.4: Die gestrichelten Kurven entsprechen den Absorptionsspektren, die durchgezogenen Kurven den Emmisionsspektren (blau=TMR, grün=YOYO-1). Die hellgrünen und hellbraunen Blöcke entsprechen den Transmissionsbereichen der Blockfilter des CLSM (Leica TCS NT) der Arbeitsgruppe Prof.Cremer. (Quelle [77])

6.2 Qualitative Ergebnisse

Mit dem im Kapitel 6.1 vorgestellten optimierten Protokoll wurde zunächst der qualitative Nachweis erbracht, dass die Zentromer 9 PNA-Sonde in lebenden Zellen hybridisiert. Die in Abbildung 6.5 zu sehenden T-Lymphozyten (in Interphase) wurden 24 Stunden nach der Mikroinjektion einer $2.67 \mu\text{M}$ Sondenkonzentration, ohne weitere Behandlung mit Detergenzien bzw. Enzymen und ohne Denaturierung, fixiert. Es sind zwei Zentromer 9 Signale zu sehen. Der Nachweis, dass die verwendete PNA-Sonde an Zentromer 9 bindet, erfolgte mit einem Kolokalisationsexperiment, d.h. die zwei Sonden, welche die gleiche oder nebeneinander liegende Zielsequenzen haben, werden auf das gleiche Präparat hybridisiert. Die T-Lymphozyten wurden hierzu in der Metaphase fixiert und die Zentromer 9 PNA-Sonde zusammen mit einer kommerziell erhältlichen Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde (MP Biomedical) hybridisiert (siehe Abbildung 6.6) (Protokolle siehe Anhang). Es sind je zwei Zentromersignale an einem Bindungsort zu sehen, ein Signal der DNA-BAC- und eines der PNA-Sonde. Die Sonden kolokalisieren eindeutig. Nachdem der Nachweis erbracht war, dass die Zentromer 9 PNA-Sonde in vitalen T-Lymphozyten Markierungen bildet und am richtigen Ort im Genom auf Metaphasechromosomen hybridisiert, wurde dazu übergegangen die Anzahl der Zentromersignale pro Zelle zu evaluieren und die Topologie der PNA-Sonde mit der Topologie der kommerziellen Zentromersonde zu vergleichen. Hierzu wurde das Zentromer 9 von T-Lymphozyten in Interphase markiert. Im ersten Experiment wurde die PNA-Sonde mikroinjiziert, fixiert und gegengefärbt (Protokoll siehe Kapitel 6.1) und im zweiten Experiment das Zentromer 9 mit einer kommerziell erhältlichen Zentromerprobe mittels Standard-FISH markiert (siehe Abbildung 6.7). Die quantitativen Resultate dieser Experimente werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

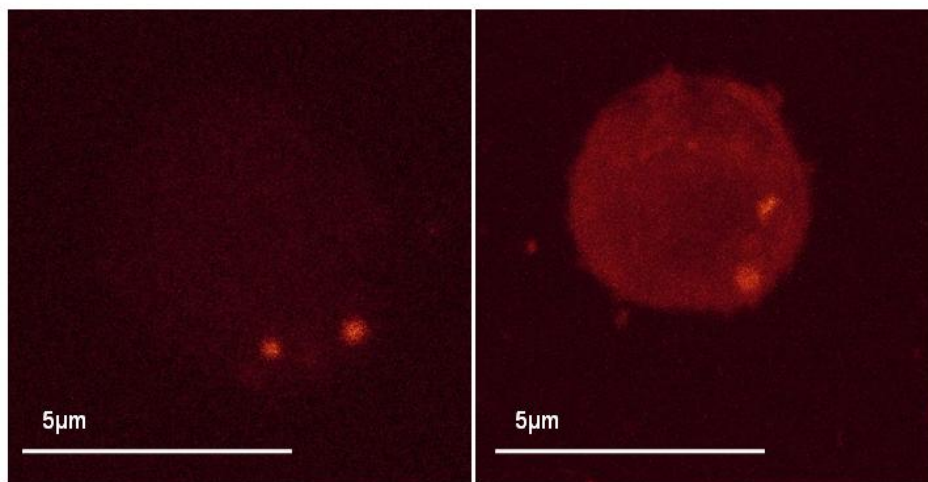


Abbildung 6.5: Die Abbildung zeigt zwei T-Lymphozyten nach Mikroinjektion einer $2.67 \mu\text{M}$ Konzentration der Zentromer 9 PNA-Sonde. Die T-Lymphozyten wurden nach der Injektion 24 Stunden bei 37°C und einer $5\% \text{CO}_2$ im Kulturschrank regeneriert und anschließend fixiert. Es erfolgte **keine** weitere Behandlung mit Detergenzien oder Enzymen.

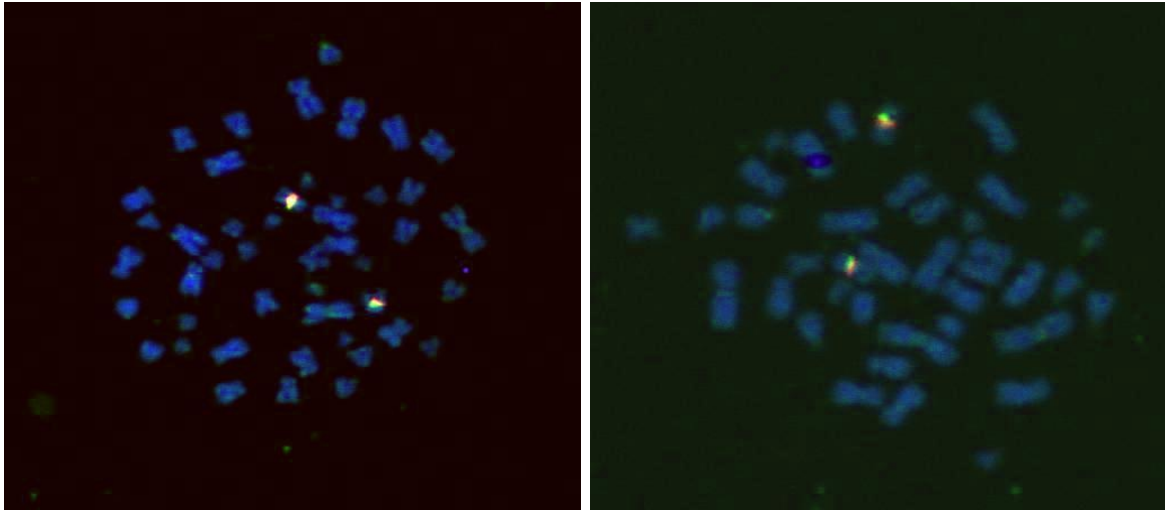


Abbildung 6.6: Beiden Abbildungen zeigen eine Metaphasenspreizung von T-Lymphozyten. Die hybridisierte kommerzielle Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde (grün) und die Zentromer 9 PNA-Oligonukleotid-Sonde kolokalisieren (rot), wodurch gezeigt ist, dass die PNA-Sonde spezifisch an Zentromer 9 bindet.

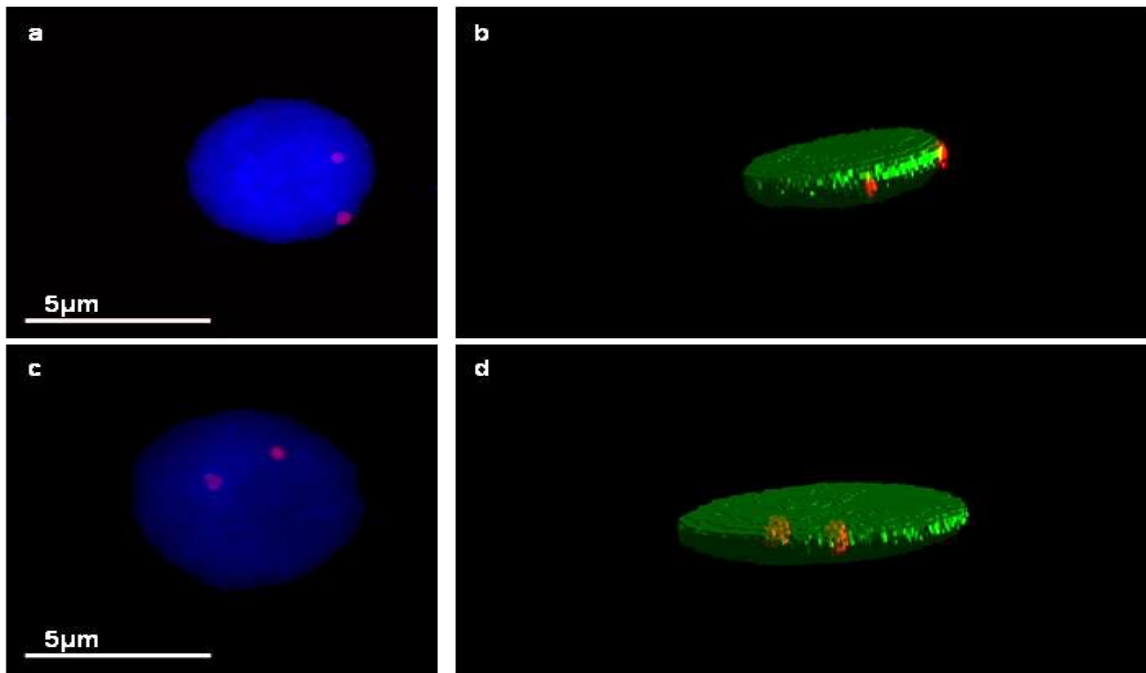


Abbildung 6.7: Die Abbildungen **a** und **b** zeigen einen Interphase T-Lymphozyten Zellkern mit Gegenfärbung und injizierter Zentromer 9 PNA-Sonde und dessen 3D-Rekonstruktion. Die Abbildungen **c** und **d** zeigen einen in der Interphase fixierten T-Lymphozyten Zellkern mit Gegenfärbung und hybridisierter Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde und dessen Rekonstruktion.

6.3 Quantitativer Vergleich der vCF und Standard-FISH Methode anhand der Topologie des Zentromer 9

Die Anzahl der Zentromer 9 Signale pro Zelle, nach Mikroinjektion der PNA-Sonde und Fixierung, wurde durch Zählen der Signale in 50 Zellen ermittelt. Die geringe Anzahl an ausgezählten Zellen resultiert aus dem hohen Verlust an Zellen aufgrund der mechanischen Kräfte, welche während der Arbeitsschritte auf diese einwirken. Die Unterscheidung der injizierten Zellen von den nicht injizierten Zellen ergab sich aus dem durch die Injektionsanlage definierten Injektionsbereich, in welchem das Deckglas positioniert wurde. Bei der Untersuchung der Präparate am Mikroskop, zeigte sich, dass die injizierten Zellen tatsächlich nur in diesem Bereich zu finden waren. Eine Trennung von apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen erfolgte durch die Waschschrte vor und nach der Fixierung. Abbildung 6.8 zeigt das Resultat der Zählung der Zentromer 9 Signale, es ergibt sich ein Maximum der Verteilung bei zwei Zentromersignalen. Die prozentuale Häufigkeit der Zellen mit zwei Zentromersignalen liegt bei 38%, der Anteil von Zellen mit mehr als vier Signalen liegt <12%. Die Topologie der Zentromere 9, welche aus Standard-FISH (DNA-BAC-Sonde) und vCF (PNA-Sonde) resultiert, wurde in Interphase T-Lymphozyten anhand der randbasierten, relativen radialen Position und der absoluten Distanzen miteinander verglichen. Hierzu wurden 17 Methanol-Eisessig fixierte Interphase T-Lymphozyten Zellkerne, in welchen das Zentromer 9 mittels Standard-FISH markiert war, und 15 T-Lymphozyten Zellkerne, in welchen das Zentromer 9 mittels vCF markiert war, am CLSM (Leica TCS NT SP1) aufgenommen. Das verwendete Objektiv war ein PlanApo 63x/NA 1.4 Ölobjektiv (0.77 Pinhole). Die Bildgröße betrug 512x512 bei einer Voxelgröße von 45 nm lateral, wobei Bildstapel mit einer axialen Schrittweite von 203 nm aufgenommen wurden. Die Anregungswellenlänge entsprach 488 nm (YOYO-1) und 568 nm (TMR), das emittierte Fluoreszenzlicht wurde mit einem Blockfilter in einem Bereich von 530 ± 15 nm bzw. 600 ± 15 nm selektiert und einem Photomultiplier detektiert.

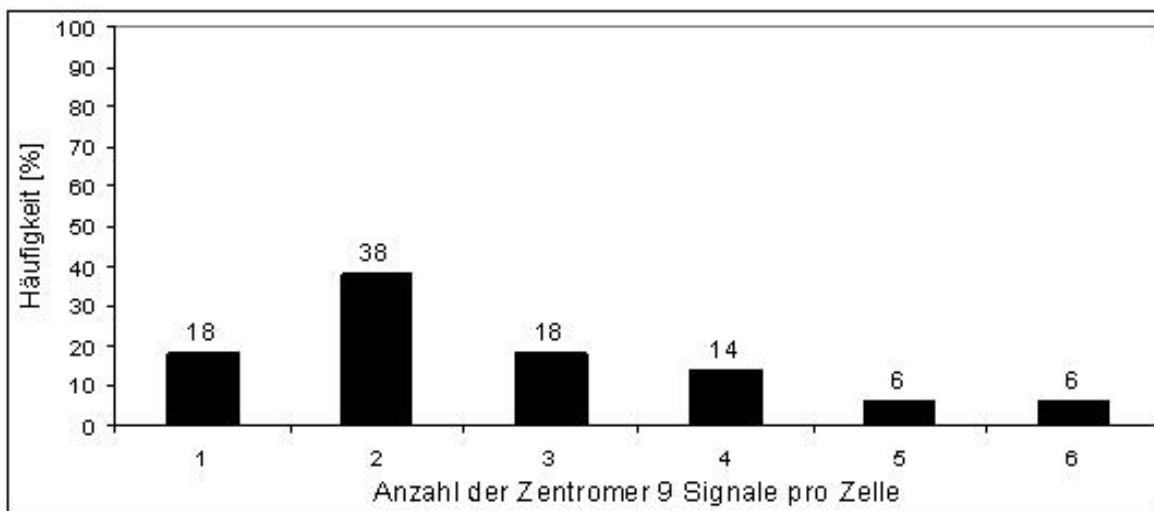


Abbildung 6.8: Das Diagramm zeigt die prozentuale Häufigkeit der Zentromersignale pro Zelle. Auf der Abszisse ist die Anzahl der Zentromersignale und auf der Ordinate die prozentuale Häufigkeit der Bindungen zu sehen. Es wurden 50 Zellen ausgezählt, von welchen 38% zwei Bindungen aufwiesen.

Das Datenmaterial lag im 8 Bit Tiff-Format vor und wurde zunächst in das KDF-Format konvertiert und die Signale der Zellkerne bzw. Zentromere mit einem $3 \times 1 \times 1$ und $1 \times 3 \times 1$ bzw. $5 \times 1 \times 1$ und $1 \times 5 \times 1$ Binomialfilter verstärkt. Die Schwellwertsetzung erfolgte mit dem globalen Isodata-Algorithmus (siehe Kapitel 5.1.3) und die Segmentierung mit dem Khorosprogramm *Label_obj_3D*. Die Messung der randbasierten, relativen radialen Position erfolgte mit den in den Kapiteln 5.3.3 und 5.5 vorgestellten Algorithmen. Es wurden nur die mikroinjizierten Zellen in die Auswertung mit eingebezogen, welche zwei Zentromersignale hatten.

Die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung der Zentromere 9, welche mittels vCF (PNA-Sonde, schwarz gestrichelt) markiert wurden, indiziert, dass diese radial zentraler liegen, als die Zentromere, welche mit Standard-FISH (DNA-BAC-Sonde, schwarz durchgezogen) markiert wurden. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9 sind im Diagramm **a** der Abbildung 6.9 zu sehen. Alle absoluten Distanzen sind $\geq 2 \mu\text{m}$ und $\leq 11 \mu\text{m}$. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position von Zentromer 9 ist im Diagramm **b** der Abbildung 6.9 aufgetragen. 77% der Meßwerte der Zentromere 9, welche sich aus der vCF (PNA-Sonde, schwarz gestrichelt) und Standard-FISH (DNA-BAC-Sonde, schwarz durchgezogen) liegen bei einer radialen Position $\leq 50\%$. Die Verteilungen der Meßwerte weisen keine Unterschiede auf.

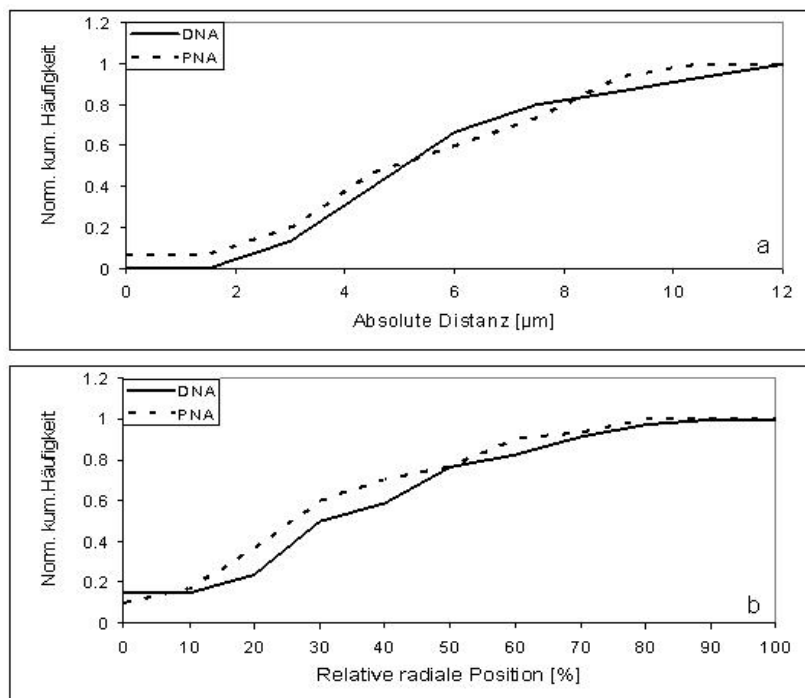


Abbildung 6.9: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9 (Diagramm **a**) und der randbezogenen, relativen radialen Position der Zentromere 9 (Diagramm **b**), welche mittels der vCF (PNA-Sonde, schwarz gestrichelt Kurve) und Standard-FISH (DNA-Bac-Sonde, schwarz durchgezogene Kurve) markiert wurden. Auf der Abszisse in Diagramm **a** ist absolute Distanz in μm aufgetragen, in Diagramm **b** die randbasierte relative radiale Position in % aufgetragen, wobei 0% einer radial im Zellkern inneren und 100% einer radial am Zellkernrand liegenden Position entsprechen. Die Ordinate entspricht in beiden Diagrammen der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

Die Mittelwerte, Standardabweichungen der relativen radialen Position der Zentromere 9 und die absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9, welche sich aus der vCF (PNA-Sonde) und Standard-FISH (DNA-BAC-Sonde) ergaben und die Resultate der Kolmogorov-Smirnov-Tests (=KS-Tests) [106] [120], sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 gegenübergestellt. Die rand-

Sonde	Parameter	Einheit	Mittelwert	Sta.Abw
Standard-FISH	Rel. rad. Pos.	[%]	39	± 25
vCF	Rel. rad. Pos.	[%]	34	± 23
Standard-FISH	abs. Distanz	$[\mu m]$	5.90	± 2.24
vCF	abs. Distanz	$[\mu m]$	5.78	± 2.10

Tabelle 6.1: Meßergebnisse der topologischen Untersuchung der Zentromere 9, welches mittels einer hybridisierten kommerziell erhältlichen DNA-BAC- und einer injizierten PNA-Oligonukleotid-Sonde markiert wurde. Die randbasierten, relativen radialen Positionen sind in % angegeben, wobei 0% dem radial zentralen Bereich im Zellkerninneren und 100% dem radial peripheren Bereich am Zellkernrand liegenden Bereich entsprechen. Die absoluten Distanzen zwischen den zwei Zentromer 9 Signalen sind in μm angegeben.

basierte relative radiale Position von Zentromer 9 ergibt bei Anwendung der vCF Methode einen Mittelwert von 34% und eine Standardabweichung von 23%. Der Mittelwert der mittels Standard-FISH markierten Zentromere 9 liegt bei 39% und die Standardabweichung bei 25%. Die absolute Distanz zwischen den Zentromeren, welche mittels vCF markiert wurden, liegt bei $5.78 \mu m$ mit einer Standardabweichung von $2.10 \mu m$, der der mittels Standard-FISH markierten beträgt $5.90 \mu m$ mit einer Standardabweichung von $2.24 \mu m$. Der statistische Vergleich der normierten kumulierten Häufigkeitsverteilungen mittels KS-Test, mit der Nullhypothese, H_0 = Beide Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit, und der Alternativhypothese H_1 = Beide Stichproben entstammen unterschiedlichen Grundgesamtheiten, bestätigte die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.001$. Der visuell indizierte Unterschied konnte statistisch nicht bestätigt werden. Die Stichproben wurden der gleichen Grundgesamtheit und waren nicht zu unterscheiden ($p < 0.001$).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Topologie der mittels vCF markierten Zentromere 9 mit denen der mittels Standard-FISH markierten übereinstimmt. Die Zentromere 9, welche mittels vCF markiert wurden, weisen eine Tendenz nach radial innen auf, was allerdings statistisch nicht signifikant ist.

KS-Test ($p < 0.001$)	Rel. rad. Pos. Standard-FISH	abs. Dist. Standard-FISH
Rel. rad. Pos. vCF	negativ	–
abs. Dist. vCF	–	negativ

Tabelle 6.2: Ergebnisse des statistischen Vergleichs der randbasierten, relativen radialen Position der Zentromere 9 und der absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9 mittels KS-Tests. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.001$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

Kapitel 7

Anwendungen

7.1 Anwendung der entwickelten Algorithmen zur quantitativen Bildanalyse

Die aus FISH-Experimenten resultierenden Daten liegen, nachdem die markierten biologischen Strukturen am Mikroskop (z.B. CLSM oder Apotome) detektiert wurden, in Form von digitalen Bildern vor. Die Aufgabe der quantitativen Bildanalyse ist die Extraktion von biologisch relevanter Information aus den digitalen Bildern, sodass die Resultate **reproduzierbar** sind und ein direkter Zusammenhang mit der biologischen Fragestellung hergestellt werden kann. Eine der aktuellen Fragestellungen ist die Extraktion von biologischen Objekten in der Größenordnung von μm aus den digitalen Bildern und die Analyse von deren Topologie und Morphologie.

Die Problematik der Extraktion besteht im Wesentlichen aus der Definition des biologischen Hintergrunds, welcher mit Apparatur bedingtem Rauschen überlappt, und einem nicht vorhandenen vollständigen mathematischen Modell, welches angepaßt werden könnte. Aus diesem Grund werden Schwellwerte verwendet, welche die biologischen Objekte von ihrem Hintergrund trennen. Die Anwendung von Schwellwerten setzt jedoch voraus, dass diese reproduzierbar gesetzt werden und die aus den extrahierten Objekte resultierenden Ergebnisse in Bezug auf die Biologie sinnvoll sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Algorithmen, der Isodata- und Otsu Algorithmus, in je zwei verschiedenen Versionen angewendet. Beide Algorithmen sind globale Schwellwertalgorithmen, die in je einer Version einen Schwellwert für das dreidimensionale Bild ermitteln und in je einer Version für jede zweidimensionale Bildebene. Das Testen der Algorithmen erfolgte, indem diese auf digitale dreidimensionale CLSM-Bilder der Chromosomen 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen angewendet, deren Volumen bestimmt und ein biologisch sinnvoller Bereich für ein minimales und maximale Volumen definiert wurde. Die Ergebnisse dieses Tests werden in Kapitel 7.1.1 vorgestellt.

Eine topologische Fragestellung ist die relative radiale Positionierung von biologischen Objekten im Zellkern. Die im Kapitel 5.3 vorgestellten Algorithmen der randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Positionierung wurden, um anhand bekannter Ergebnissen zu diskutieren, auf die Messung der relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 angewendet. Die Resultate des Vergleichs sind im Kapitel 7.1.2 zu sehen. An die Fibroblastenzellkerne, in welchen die Chromosomenterritorien 18 und 19 markiert sind, wurden zusätzlich Ellipsoide mit dem im Kapitel 5.2 beschriebenen Algorithmus angepaßt, da untersucht werden sollte, inwiefern eine Näherung von Zellkernen als Ellipsoide möglich ist. Hierzu

wurde die Anpassungseffizienz der Ellipsoide ermittelt und die randbasierte relative radiale Position der Chromosomen 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen und Ellipsoiden verglichen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 7.1.3 vorgestellt.

Die Morphologie und Struktur von Chromosomen kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht anhand eines mathematischen Modells beschrieben werden. Es werden deshalb Parameter benötigt, welche die vorhandenen Modelle mit den experimentellen Ergebnissen vergleichen. Der Ansatz der Erfassung von komplexen Strukturen mittels Minkowskifunktionalen ist als solcher in den Materialwissenschaften und der Astronomie weit verbreitet. In dieser Arbeit wurden die Minkowskifunktionale als Mittel zur Analyse der Morphologie der Chromosomenterritorien 18 und 19 angewendet. Die Ergebnisse werden im Kapitel 7.1.4 vorgestellt.

Die in diesem Kapitel verwendete Fibroblasten sind human und weiblichen Typs. Die Chromosomenterritorien 18 und 19 wurden mittels FISH markiert, wobei der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Anregungswellenlänge 488 nm) war, und die Zellkerne mit TOPRO-3 (Anregungswellenlänge 642 nm) gegengefärbt. Die optischen Schnitte wurden mit einem CLSM (LSM 410, Zeiss Deutschland) mit einem PlanApo 63x/1.4 Ölobjectiv aufgenommen. Die Bildtiefe betrug bei einem Format von 512x512 Pixel 8 Bit und die Abtastung in axiale Richtung 200 nm. Die Aufnahme erfolgte mit einem Zoom von 9, was einer lateralen Voxelgröße von 65 nm entspricht¹. Das Datenmaterial lag im Tiff-Format vor und wurde zunächst in das KDF-Format konvertiert und die Signale der Zellkerne bzw. Chromosomenterritorien mit einem 3x1x1 und 1x3x1 bzw. 5x1x1 und 1x5x1 Binomialfilter verstärkt.

Es standen die Bildstapel von

1. 28 Fibroblastenzellkerne mit 56 Chromosomenterritorien 18.
2. 34 Fibroblastenzellkerne mit 68 Chromosomenterritorien 19.

zur Verfügung.

7.1.1 Vergleich des Isodata- und Otsu-Algorithmus

Die Schwellwertalgorithmen wurden auf alle Chromosomenterritorien 18 bzw. 19 in den vorhandenen 62 Fibroblastenzellkernen angewendet. Die Untersuchung der Schwellwertsetzung mit dem Isodata-Algorithmus (Kapitel 5.1.3) und Otsu-Algorithmus (Kapitel 5.1.4) erfolgte in vier verschiedenen Varianten. Die lokale Hintergrundreduzierung (Kapitel 5.1.2) wurde mit den lokalen Schwellwertalgorithmen und die globale Hintergrundreduzierung (Kapitel 5.1.2) mit den globalen Schwellwertalgorithmen kombiniert. Die vier Experimente hatten somit folgende Konstellation:

1. Experiment **Iso 2D**, Hintergrundreduzierung mit *Hintergrund_lokal* und Schwellwertsetzung mit *Iso_lokal*.
2. Experiment **Otsu 2D**, Hintergrundreduzierung mit *Hintergrund_lokal* und Schwellwertsetzung mit *Otsu_lokal*.
3. Experiment **Iso 3D**, Hintergrundreduzierung mit *Hintergrund_global* und Schwellwertsetzung mit *Iso_global*.

¹Die biologischen Experimente wurden von Dr. Marion Cremer (LMU München) durchgeführt und die Bilddaten freundlicherweise zur Verfügung gestellt

4. Experiment **Otsu 3D**, Hintergrundreduzierung mit *Hintergrund_global* und Schwellwertsetzung mit *Otsu_global*.

Ein erstes Resultat ergab sich bei der Anwendung der Algorithmen auf die Fibroblastenzellkerne. Der einzige Algorithmus, welcher mehr als 20 (von 62) verwertbare Zellkerne ausgab, war der des **Iso 3D** Experimentes. Diese 62 Zellkerne wurden dazu verwendet, um die Zellkernvolumina zu berechnen und um eine ausreichende große Stichprobe zu gewährleisten. Die Segmentierung der Chromosomenterritorien, aus den Bildstapeln, welche aus der Anwendung der Hintergrundreduzierung und Schwellwertalgorithmen resultierten, erfolgte mit dem Programm *Label_obj_3D*. Als Parameter, welcher eine Aussage über die Güte der Algorithmen ermöglicht, wurde der prozentuale Volumenanteil der Chromosomenterritorien am Zellkernvolumen $V_{Prozent}$ gewählt. Die Berechnung der Volumina der segmentierten Chromosomenterritorien und Zellkernvolumens wurde mit Khorosprogramm *Volume* realisiert [106]. Anhand des Zellkern- und Chromosomenvolumens $V_{Zellkern}$ und $V_{Chromosom}$ wurde das auf das Zellkernvolumen normierte Volumen der Chromosomenterritorien $V_{Norm} = \frac{V_{Chromosom}}{V_{Zellkern}}$ berechnet, welches durch Multiplikation mit einem Faktor 100 das prozentuale Volumen der Chromosomenterritorien $V_{Prozent}$ am Zellkernvolumen ergibt. Die Mittelwerte μ_{18} bzw. μ_{19} und Standardabweichungen σ_{18} und σ_{19} der prozentualen Volumina der Chromosomenterritorien 18 und 19, welche sich aus den vier Experimenten ergeben, sind in Tabelle 7.1 dargestellt. Die Mittelwerte der prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 18 liegen in einem Bereich von 0.1% bis 10.7%, mit Standardabweichungen in einem Bereich von 0.1% bis 4.2%. Die Mittelwerte prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 19 befinden sich in einem Bereich von 0.2% bis 29.2% und die Standardabweichungen in einem Bereich von 0.2% bis 13.3%.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 18, welche aus den Experimenten **Iso 2D** und **Iso 3D** bzw. **Otsu 2D** und **Otsu 3D** resultieren, sind in den Diagrammen **a** bzw. **b** in Abbildung 7.1 zu sehen. Die Verteilungen der 2D Experimente entsprechen den blauen gestrichelten, die der 3D Experimente den blauen durchgezogenen Kurven. 98% der Meßwerte des Experimentes **Iso 2D** liegen bei einem Volumenanteil von 0.0% bis 0.5%, 80% der Meßwerte des Experimentes **Iso 3D** in einem Bereich 1.5% bis 3.0%, 75% der Meßwerte des Experimentes **Otsu 3D** in einem Bereich von 4.0% bis 8.0% und 75% der Meßwerte des Experimentes **Otsu 2D** in einem Bereich von 8.0% bis 20.0% Volumenanteil. Das Diagramm **c** in Abbildung 7.1 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen, welche aus den vier Experimenten resultieren, logarithmisch aufgetragen.

Experiment	Einheit	Iso 2D	Otsu 2D	Iso 3D	Otsu 2D
μ_{18}	[%]	0.1	10.7	2.1	5.3
σ_{18}	[%]	± 0.1	± 4.2	± 0.6	± 1.4
μ_{19}	[%]	0.2	29.2	1.8	8.1
σ_{19}	[%]	± 0.2	± 13.3	± 1.0	± 6.2
Zellkerne		62	62	62	62

Tabelle 7.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen, welche sich aus den Experimenten **Iso 2D**, **Otsu 2D**, **Iso 3D** und **Otsu 2D** ergeben.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 19, welche aus den Experimenten **Iso 2D** und **Iso 3D** bzw. **Otsu 2D** und **Otsu 3D** resultieren, sind in den Diagrammen **a** bzw. **b** in Abbildung 7.2 zu sehen. Die Verteilungen der 2D Experimente entsprechen den roten gestrichelten, die der 3D Experimente den roten durchgezogenen Kurven. 96% der Meßwerte des Experimentes **Iso 2D** liegen bei einem Volumenanteil von 0.0% bis 0.5%, 93% der Meßwerte des Experimentes **Iso 3D** in einem Bereich 1.0% bis 3.0%, 80% der Meßwerte des Experimentes **Otsu 3D** in einem Bereich von 4.0% bis 40.0% und 100% der Meßwerte des Experimentes **Otsu 2D** in einem Bereich von 4.0% bis 52.0% Volumenanteil. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der vier Experimente sind im Diagramm **c** der Abbildung 7.2 logarithmisch aufgetragen zu sehen. Die Güte der Schwellwertalgorithmen wird danach bewertet, ob die resultierenden Volumina in einem biologisch sinnvollen Wertebereich liegen. Ein guter Maßstab ist in diesem Fall der Anteil der Chromosomenterritorien in MBp an der gesamten im Zellkern vorhandenen DNA, der mit dem prozentualen Volumen korreliert. Zu beachten ist hierbei, dass nicht ein bestimmter Zahlenwert, sondern ein ganzer Bereich gewählt wird. Die Überlegung für einen biologisch sinnvollen Bereich sind folgende:

Das Chromosomenterritorium 18 besteht aus 76 MBp, das Chromosomenterritorium 19 aus 63 MBp und die gesamte DNA eines haploiden Chromosomensatzes in einem Zellkern aus 3000 MBp. Für den DNA-Anteil, unter der Annahme einer homogenen DNA-Verteilung, des Chromosomenterritoriums 18 ergibt sich somit ein prozentualer DNA-Anteil von 2.5% und für das Chromosomenterritorium 19 ein prozentualer Anteil von 2.1%. Bei einer homogenen Verteilung der DNA im Zellkern, entsprechen diese Werte den prozentualen Volumenanteilen. Da aber von einer Schwankung des Volumens aufgrund der Kondensation und Dekondensation der DNA ausgegangen werden muß, wird ein Vertrauensintervall von 1% bis 3% definiert, welches in den Diagrammen **c** der Abbildung 7.1 und 7.2 als schwarz gestrichelte Linie eingezeichnet ist.

Die einzigen Mittelwerte, welche sich, sowohl für das Chromosomenterritorium 18, als auch 19, innerhalb des definierten Vertrauensintervall befinden, sind die des **Iso 3D** Experimentes. Beide Mittelwerte der prozentualen Volumenanteile liegen jedoch unterhalb der theoretisch kalkulierten, was auf einen, innerhalb des Vertrauenintervall korrekten, aber zu hohen Schwellwert hinweist. Ein Vergleich der Verhältnisse $\frac{1.8}{2.1} = 0.9 \pm 0.2$ zueinander zeigt, das im Vergleich zum theoretischen Verhältnis von 0.8, keine Unterschiede zwischen den Chromosomenterritorien vorhanden sind. Der prozentuale Volumenanteil des **Iso 2D** Experimentes ist, wie aus der logarithmischen Auftragung hervorgeht, einen Faktor 10 kleiner. Das 10 mal kleinere Volumen dieses Experimentes resultiert aus einem zu hohen Schwellwert, sodass das resultierenden Volumen zu klein ist. Die Mittelwerte der **Otsu 2D** und **Otsu 3D** Experimente weisen auf einen zu niedrigen Schwellwert hin, da deren prozentuale Volumenanteile deutlich oberhalb des Vertrauensintervalls liegen.

Zusammenfassung der Resultate

1. Es wurde ein Vertrauenintervall von 1% bis 3% für die Chromosomenterritorien 18 und 19 definiert, in welchem sich die Mittelwerte der gemessenen prozentualen Volumenanteile befinden müssen.
2. Die Experimente **Otsu 2D**, **Otsu 3D** und **Iso 2D** resultieren in prozentualen Volumenanteilen, welche **nicht** innerhalb des definierten Intervalls liegen.

3. Das Experiment **Iso 3D** ergibt für den prozentualen Volumenanteil der Chromosomenterritorien Mittelwerte, welche innerhalb des Vertrauensintervalls liegen. Für das Chromosomenterritorium 18 mit 76 MBp ergibt sich ein Mittelwert von $2.1 \pm 0.6\%$ und für das Chromosomenterritorium 19 von $1.8 \pm 1.0\%$.
4. Die theoretischen Werte für beide Chromosomenterritorien liegen oberhalb, aber innerhalb der Standardabweichungen der experimentellen Werte (aus Punkt 3), bei 2.5% für Chromosomenterritorium 18 und bei 2.1% für Chromosomenterritorium 19.
5. Der globale Isodata-Algorithmus, welcher einen Schwellwert für den ganzen Bildstapel setzt, ist ein geeigneter Schwellwertalgorithmus und wurde auf alle weiteren Datensätze angewendet.
6. Bei der Anwendung des *Iso_global* kommt es zu einer Überschätzung der Schwellwerte.

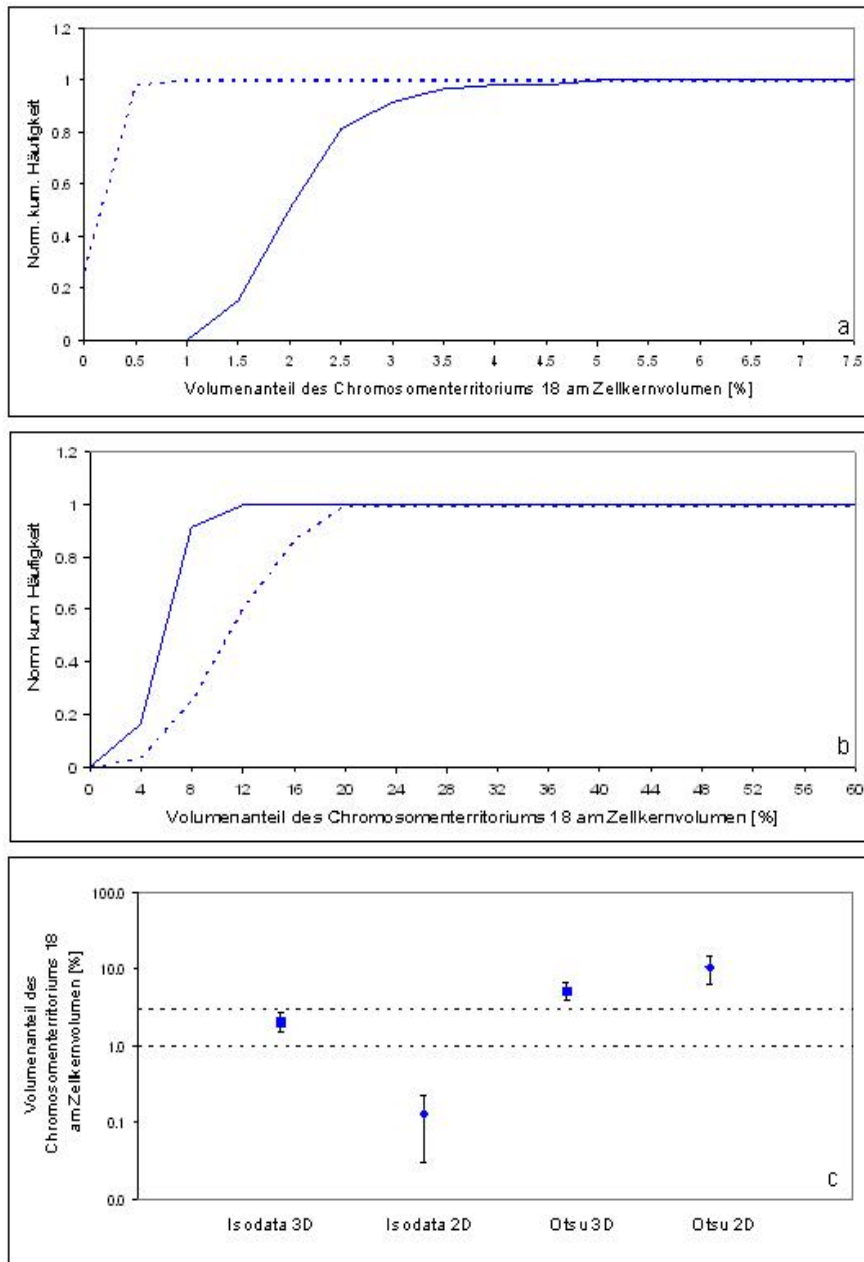


Abbildung 7.1: Die Diagramme a bzw. b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der prozentualen Volumenanteile des Chromosomenterritoriums 18, welche sich aus den Experimenten **Otsu 2D** (blau gestrichelt) und **Otsu 3D** (blau durchgezogen) bzw. **Iso 2D** (blau gestrichelt) und **Iso 3D** (blau durchgezogen) ergeben. Auf der Abszisse ist der Volumenanteil des Chromosomenterritoriums am Zellkernvolumen in % und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Das Diagramm c zeigt aus den Experimenten resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Vertrauensintervall (schwarz gestrichelt) von 1% bis 3%. Die Ordinate entspricht dem Volumenanteil der Chromosomenterritorien am Zellkernvolumen in % und ist logarithmisch aufgetragen.

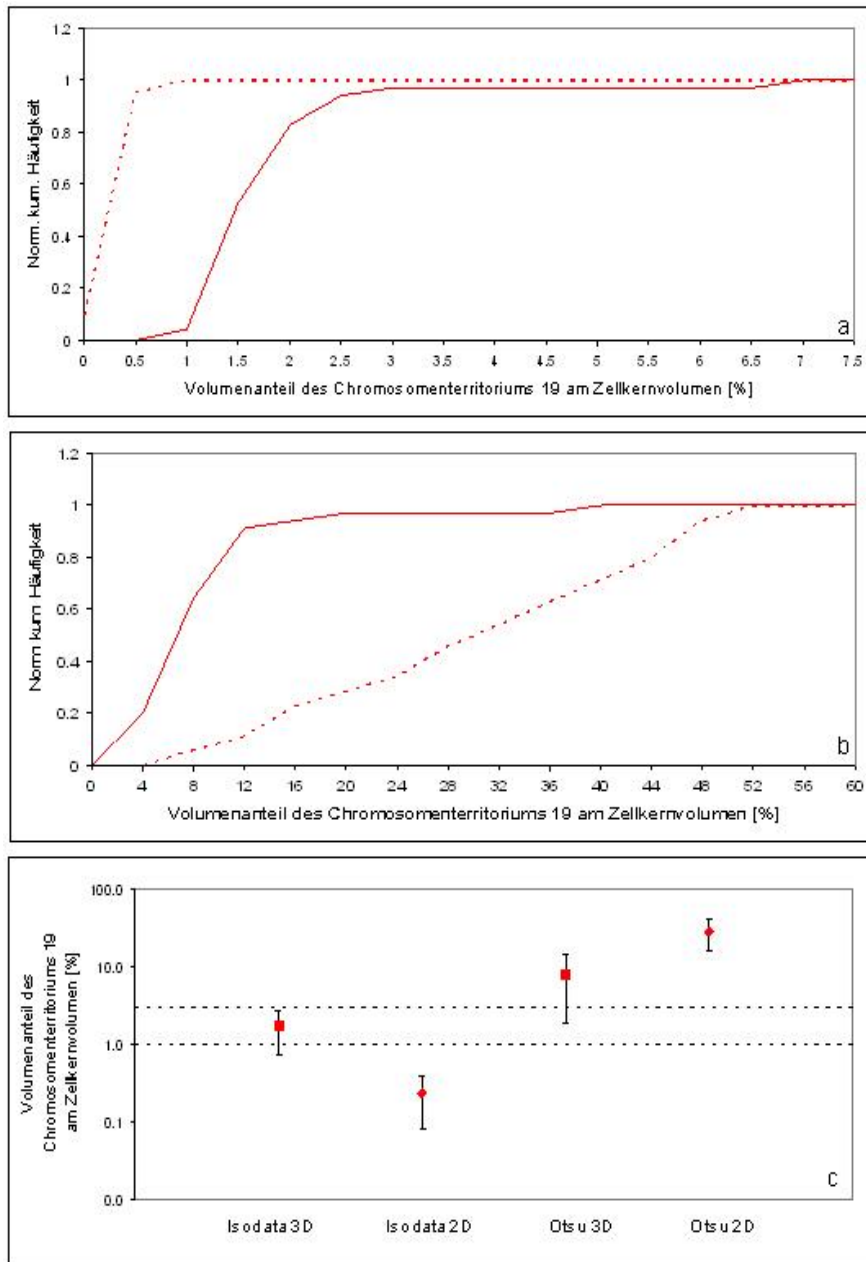


Abbildung 7.2: Die Diagramme a bzw. b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der prozentualen Volumenanteile des Chromosomenterritoriums 19, welche sich aus den Experimenten **Otsu 2D** (rot gestrichelt) und **Otsu 3D** (rot durchgezogen) bzw. **Iso 2D** (rot gestrichelt) und **Iso 3D** (rot durchgezogen) ergeben. Auf der Abszisse ist der Volumenanteil des Chromosomenterritoriums am Zellkernvolumen in % und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Das Diagramm c zeigt aus den Experimenten resultierenden Mittelwerte mit Standardabweichungen und das Vertrauensintervall (schwarz gestrichelt) von 1% bis 3%. Die Ordinate entspricht dem Volumenanteil der Chromosomenterritorien am Zellkernvolumen in % und ist logarithmisch aufgetragen.

7.1.2 Vergleich der Distanztransformations-Algorithmen

Die relative radiale Kartierung des Zellkernes, welche der relativen radialen Positionierung von Objekten innerhalb des Zellkernes dient, wurde in drei verschiedenen Algorithmen implementiert. Die schwerpunktbasierte Kartierung des Zellkernes wird in Kapitel 5.3.1 und die beiden Algorithmen zur randbasierten Kartierung, die Chamfering DT und die euklidische DT, in den Kapiteln 5.3.2 und 5.3.3 beschrieben. Die relative radiale Positionierung der Objekte innerhalb der kartierten Zellkerne erfolgt anhand des in Kapitel 5.3.4 beschriebenen Algorithmus. Es werden die Intensitätsschwerpunkte der Objekte berechnet und deren relative radiale Position anhand der Koordinaten des Schwerpunktes aus dem kartierten Zellkern ermittelt. Eine relative radiale Position der Objekte von 0% entspricht, sowohl für die schwerpunktbasierte, als auch für die randbasierte Methode, dem radial zentralen Bereich des Zellkernes, während eine radial periphere Position im Zellkern 100% entspricht. Die randbasierten, relativen radialen Positionen wurden normiert und invertiert, sodass die randbasierte und schwerpunktbasierte Methode verglichen werden können (siehe Kapitel 5.3.2 und 5.3.3). Für die folgenden Experimente wurden Bildstapel der Chromosomenterritorien 18 und 19 verwendet, auf welche der globale Isodata-Algorithmus angewendet wurde und deren Chromosomenterritorien segmentiert waren.

Im ersten Experiment wurde die schwerpunktbasierte und randbasierte (euklidische DT) relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblasten miteinander verglichen. Fibroblasten sind flache Zellkerne und weisen eine große Abweichung von einer Kugelform auf, weshalb an diesen die Unterschiede zwischen den beiden Methoden ideal aufgezeigt werden können. Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den beiden Methoden vorhanden sind und diese zu unterschiedlichen biologischen Modellen und Interpretationen führen.

Im zweiten Experiment wurde zunächst die Voxelgröße der Bildstapel mit dem Khorosprogramm *rescale* reskaliert, da die Chamfering DT nur auf isotrope Gitter angewendet werden kann. Es wurden die anisotropen Voxelgrößen von 65 nm lateral und 284 nm axial auf eine Voxelgröße von 100 nm in alle Raumrichtungen angepaßt. Die reskalierten Zellkerne wurden kartiert und die absoluten Distanzen der Intensitätsschwerpunkte der Chromosomenterritorien 18 und 19 vom Zellkernrand verglichen, welche aus der Kartierung des Zellkernes mit der Chamfering DT und der euklidischen DT resultieren. Der Grund für diesen Vergleich ist die unterschiedliche Laufzeit der beiden Algorithmen, die Chamfering DT kartiert einen dreidimensionalen Bildstapel nach einem Vorwärts- und Rückwärtsscan, die euklidische DT hingegen minimiert alle Distanzen iterativ durch mehrmaliges Abrastern des Bildstapels, bis die stabile Lösung erreicht ist. Das Erreichen der stabilen Lösung des euklidischen DT benötigt, bei einer typischen axialen Bildstapelgröße von 50-70 Schnitten, zwischen 30 und 50 Abrasterungen, während der Chamfering Algorithmus nur zwei Abrasterungen braucht. Der Nachteil des Chamfering DT ist dessen Überschätzung der Distanzen, welche anhand der euklidischen Distanz (Gleichung 5.25) und der Montanari Metrik (Gleichung 5.21) hergeleitet werden kann [5]. Diese Ungenauigkeit der Chamfering DT wurde im zweiten Experiment anhand der absoluten Distanzen der Schwerpunkte der Chromosomenterritorien 18 und 19 vom Zellkernrand bestimmt, sodass zwischen einer Tolerierung der Ungenauigkeit und der Laufzeit abgewogen werden kann.

Experiment 1

Die Mittelwerte μ_{18} und μ_{19} und die Standardabweichungen σ_{18} und σ_{19} der relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19, welche sich aus der schwerpunkt-basierten und randbasierten Kartierung der Zellkerne ergaben, sind in Tabelle 7.2 zu sehen. Die Mittelwerte der Chromosomenterritorien 18 ($n=56$) liegen bei 52% (randbasiert) und 49% (schwerpunkt-basiert) mit Standardabweichungen von 20% bzw. 17%. Die Mittelwerte der Chromosomenterritorien 19 ($n=68$) liegen bei 58% (randbasiert) und 61% (schwerpunkt-basiert) und die Standardabweichungen bei 18% bzw. 16%. Die Differenz der randbasierten und schwerpunkt-basierten Mittelwerte der relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 entspricht 3%.

Das Diagramm, welches die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen zeigt, ist in Abbildung 7.4 zu sehen. Die gestrichelten Kurven entsprechen den Verteilungen der schwerpunkt-basierten, die durchgezogenen Kurven den Verteilungen der randbasierten Meßwerte. Die Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 sind blau, die der Chromosomenterritorien 19 rot gekennzeichnet. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen wurden anhand des zweiseitigen KS-Tests verglichen, welcher die maximale vertikale Distanz $dist_{max}$ zwischen den Verteilungen mit einem Parameter D vergleicht, welcher von der Stichprobenanzahl und der Irrtumswahrscheinlichkeit abhängt [106] [120]. Die Nullhypothese H_0 lautete hierbei, beide Stichproben wurden der gleichen Grundgesamtheit entnommen, und die Alternativhypothese H_1 , beide Stichproben wurden unterschiedlichen Grundgesamtheiten entnommen. Die Nullhypothese wird angenommen, wenn $dist_{max} < D$ und verworfen, d.h. die Alternativhypothese angenommen, wenn $dist_{max} > D$ gilt. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Positionen des Chromosomenterritoriums 18, die randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Positionen des Chromosomenterritoriums 19 und die randbasierten bzw. schwerpunkt-basierten, relativen radialen Positionen des Chromosomenterritoriums 18 gegen 19 auf statistisch signifikanten Unterschiede untersucht. Die Ergebnisse der ersten beiden Vergleiche sind im Diagramm **b** in Abbildung 7.4 zu sehen, die des letzten Vergleichs im Diagramm **c** in Abbildung 7.4.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunkt-basierten Messungen zeigen, dass 57% der Chromosomenterritorien 18 (blau gestrichelt) eine relative radiale Position $<50\%$ und 44% eine Position $>50\%$ einnehmen. Für die randbasierten Messung gilt bzgl. des Chromosomenterritoriums 18 (blau durchgezogen), dass 43% eine Position $<50\%$ und 57% eine Position $>50\%$ einnehmen. Die schwerpunkt-basierte Verteilung der Meßwerte der Chromosomenterritorien 19 (rot gestrichelt) zeigt auf, dass 37% eine Position $<50\%$ und 63% eine Position $>50\%$ einnehmen.

Methode	Einheit	Randb.	Schwerpb.
μ_{18}	[%]	52	49
σ_{18}	[%]	± 20	± 17
μ_{19}	[%]	58	61
σ_{19}	[%]	± 18	± 16
Zellkerne		62	62

Tabelle 7.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunkt-basierten und randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 ($n=56$) und 19 ($n=68$). Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% dem radial zentralen und 100% dem radial peripheren Bereich entspricht.

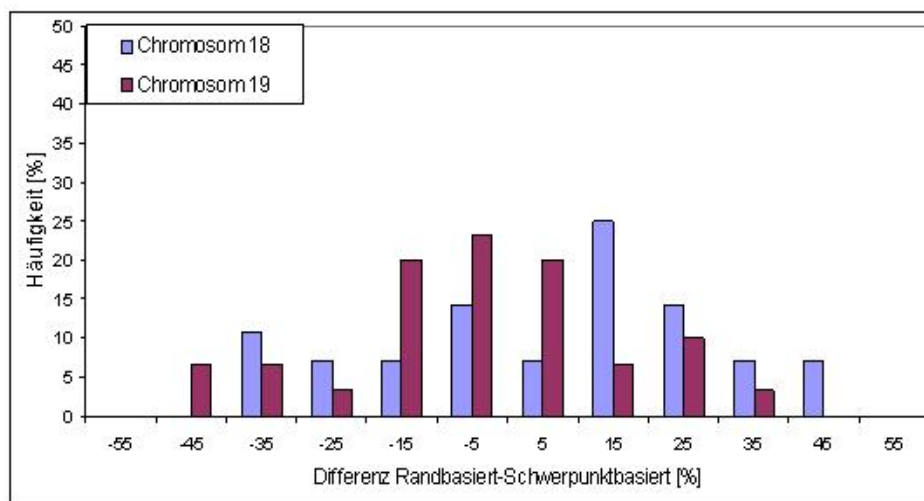


Abbildung 7.3: Das Diagramm zeigt die prozentuale Häufigkeit der Differenz zwischen den randbasierten und schwerpunktbasieren, relativen radialen Positionen des gleichen Chromosomenterritoriums. Es wurden die schwerpunktbasierete, relative radiale Position von der randbasierten, relativen radialen Position des gleichen Chromosomenterritoriums subtrahiert und die prozentualen Häufigkeiten der Differenzen aufgetragen. Auf der Abszisse sind Differenzen der relativen radialen Positionen aufgetragen, wobei die Mittelwerte der Häufigkeitklassen $\Delta 10\%$ zu sehen sind. Die Ordinate entspricht der Häufigkeit in %.

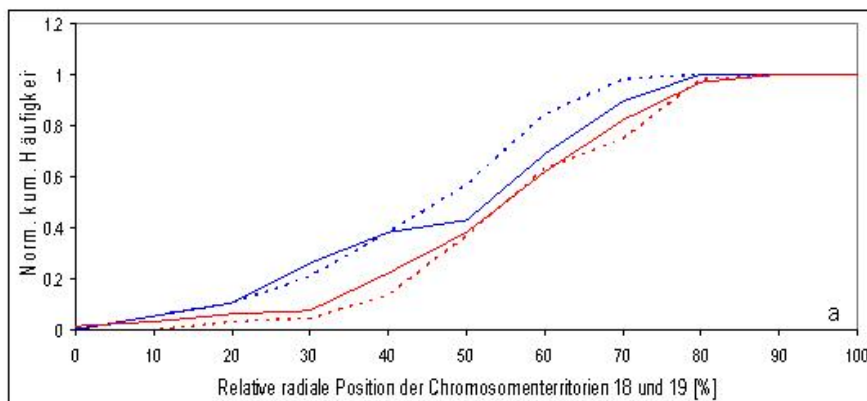
Für die randbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 19 (rot durchgezogen) gilt die gleiche Aussage. Die KS-Test weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen den randbasierten Positionen der Chromosomenterritorien 18 bzw. 19 der beiden Meßmethoden nach. Werden allerdings die schwerpunktbasieren Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 miteinander verglichen, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$, welcher bei einer randbasierten Messung nicht gefunden wird. Die biologische Aussage, welche sich für die schwerpunktbasierete, relative radiale Position ergibt, ist, dass das Chromosomenterritorium 18 radial weiter innen liegt, als das Chromosomenterritorium 19. Die biologische Aussage, welche aus der randbasierten Messungen hingegen resultiert ist, dass keine Unterschiede zwischen den relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 nachgewiesen werden kann.

Der signifikanten Unterschied ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ nicht hochsignifikant, dennoch weist dieser auf die aus den Ergebnissen der beiden Methoden resultierenden unterschiedlichen Modelle und Aussagen hin. Im Diagramm der Abbildung 7.3 sind die prozentualen Häufigkeiten der Differenzen zwischen den aus einer Messung der randbasierten und schwerpunktbasieren, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 resultierenden Meßwerte aufgetragen. Es wurden die schwerpunktbasieren Meßwerte von den randbasierten Meßwerten des gleichen Chromosomenterritorium subtrahiert und die prozentuale Häufigkeit der Abweichung berechnet. Der Anteil an Meßwerten des Chromosomenterritoriums 18, für welche die aus den beiden Methoden resultierenden relative radiale Positione in einem Bereich von $\pm 10\%$ übereinstimmen, beträgt 21%. Der Anteil an Meßwerten, bei welchen die randbasierte Messung um mehr als 10% größere relative radiale Positionen ergab, beträgt 54% und der Anteil an Meßwerten, bei welchen die schwerpunktbasierete Messung um mehr als 10% größere relative radiale Positionen ergab, beträgt 25%. Der Anteil an Meßwerten, deren Unterschied bei $\geq 20\%$, also größer als die Standardabweichungen der beiden Methoden ist, liegt bei 46%. Der Anteil an Meßwerten des Chromosomenterritoriums

19 deren relativen radialen Positionen sich um $\pm 10\%$ unterscheidet beträgt 43%, der Anteil an Meßwerten, bei welchen die randbasierte Messung größere relative radiale Positionen von $>10\%$ ergab, beträgt 20% und der Anteil an Meßwerten, bei welchen die schwerpunktbasierte Messung relative radiale Positionen von $>10\%$ ergab, beträgt 37%. Der Anteil an Meßwerten, der Unterschied von $\geq 20\%$, also größer als die Standardabweichungen der beiden Methoden, liegt bei 30%. Der signifikante Unterschied, welcher bei dem Vergleich der relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 19 ergibt, kann somit anhand des hohen Anteils (30%) an radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 19 erklärt werden. Der nicht vorhandene Unterschied zwischen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 ergibt sich aus den radial peripherer liegenden Chromosomenterritorien 18 und den radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 19. Der hohe prozentuale Anteil an unterschiedlichen Meßwerten belegt, dass die biologische Fragestellung und die damit verbundene Meßmethode sehr genau definiert werden muß. Die guten Übereinstimmungen der Mittelwerte der beiden Methoden zur relativen radialen Positionierung ergeben sich, wie die Verteilungen der Differenzen verdeutlichen, da die Abweichungen sich, aufgrund der Mittelung, wieder gegenseitig aufheben.

Zusammenfassung der Ergebnisse des 1. Experimentes

1. Der Vergleich der schwerpunktbasierten relativen radialen Positionierung der Chromosomenterritorien 18 und 19 ergibt einen signifikanten Unterschied mit $p < 0.05$. Aufgrund der Resultate wird dem Chromosomenterritorium 19 eine radial peripherere und dem Chromosomenterritorium 18 eine radial zentralere Position zugeordnet.
2. Der Vergleich der euklidischen randbasierten, relativen radialen Positionierung zwischen den Chromosomenterritorien 18 und 19 ergibt keinen signifikanten Unterschied. Aufgrund der Resultate wird beiden Chromosomenterritorien die gleiche relative radiale Position zugeordnet.
3. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen resultiert aus den beiden unterschiedlichen Methoden.



b

	Schwerp. 18	Schwerpb. 19
Randb. 18		x
Randb. 19	x	

c

	Randb. 19	Schwerpb. 19
Randb. 18		x
Schwerpb. 18	x	

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.4: Das Diagramm **a** zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunkt-basierten und randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblasten. Die Auftragung der Abszisse entspricht der relativen radialen Position in % und die Ordinate der normiert kumulierten Häufigkeit. Die Verteilungen der randbasierten Meßwerte werden von den durchgezogenen Linien und die der schwerpunkt-basierten Meßwerte von den gestrichelten Kurven repräsentiert. Die blauen Kurven geben die Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 und die roten die Meßwerte der Chromosomenterritorien 19 wieder. Die Abbildungen **b** zeigt die Ergebnisse der KS-Tests, bei welchen die schwerpunkt-basierte mit der randbasierten Position von Chromosomenterritorium 18 bzw. 19 miteinander verglichen wurden. Die Abbildungen **c** zeigt die Ergebnisse der KS-Tests, bei welchen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 innerhalb der gleichen Methode miteinander verglichen werden. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < \alpha$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten entnommen wurden (Alternativhypothese).

Experiment 2

Der Vergleich zwischen den beiden randbasierten Algorithmen, d.h. Chamfering DT und euklidische DT, erfolgt anhand der Unterschiede zwischen den absoluten Distanzen der Intensitätsschwerpunkte der Chromosomenterritorien 18 und 19 zum Zellkernrand. Die Mittelwerte μ_{18} und μ_{19} und die Standardabweichungen σ_{18} und σ_{19} der absoluten Distanzen der Chromosomenterritorien 18 und 19 zum Zellkernrand, welche sich aus der schwerpunktbasierter und randbasierter Kartierung der Zellkerne ergeben, sind in Tabelle 7.3 zu sehen. Die Differenz

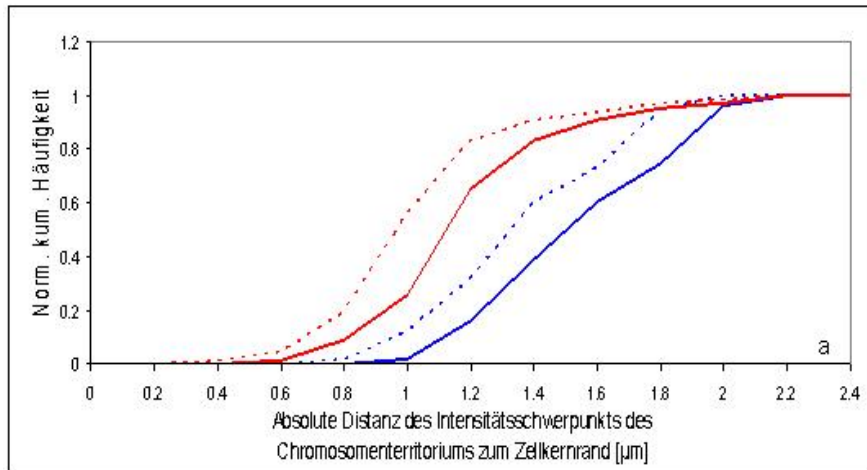
Experiment	Einheit	Chamf. DT	euklid. DT
μ_{18}	$[\mu m]$	1.52	1.35
σ_{18}	$[\mu m]$	± 0.29	± 0.27
μ_{19}	$[\mu m]$	1.18	1.02
σ_{19}	$[\mu m]$	± 0.30	± 0.29
Zellkerne		62	62

Tabelle 7.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten Distanzen der Chromosomenterritorien 18 (n=56) und 19 (n=68) vom Zellkernrand, welche sich aus der randbasierten Kartierung des Zellkernes mittels Chamfering DT und euklidischer DT ergeben. Die Werte sind in μm angegeben.

der Mittelwerte der absoluten Distanzen liegt für das Chromosomenterritorium 18 (n=56) bei $0.17 \mu m$ und für das Chromosomenterritorium 19 (n=68) bei $0.16 \mu m$, was ungefähr 1.5 Voxelgrößen entspricht. Der prozentuale Fehler liegt, in Bezug auf die absolute gemessene Distanz in einem Bereich von 10%- 15%. Zusätzlich wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten Distanzen zum Zellkernrand, welche im Diagramm **a** der Abbildung 7.5 zu sehen sind mittels KS-Test miteinander verglichen. Die blauen Kurven entsprechen den Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18, die roten Kurven den Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 19. Die gestrichelten Kurven geben die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der euklidischen DT, die durchgezogenen Kurven die der Chamfering DT wieder. Die absoluten Distanzen konnten für das Chromosomenterritorium 19 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ unterschieden werden (Diagramm **b** in Abbildung 7.5).

Zusammenfassung der Ergebnisse des 2. Experimentes

1. Der Vergleich der Chamfering DT und der euklidischen DT ergibt eine Differenz von $0.16-0.17 \mu m$, d.h. die Chamfering DT überschätzt die absoluten Distanzen zum Zellkernrand um diese Differenz.
2. Es können die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Chromosomenterritorien 19 unterschieden werden.
3. Der Chamfering DT wird für alle weiteren Anwendung innerhalb dieser Arbeit nicht mehr verwendet, d.h. randbasierte relative radiale Positionen werden immer mit der euklidischen DT berechnet.



b

	Euklidische DT 18	Euklidische DT 19
Chamfering DT 18		x
Chamfering DT 19	x	

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.5: Das Diagramm a zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten Distanzen der Intensitätsschwerpunkte der Chromosomenterritorien 18 und 19 vom Zellkernrand, welche aus der Chamfering DT und der euklidischen DT resultieren. Die Auftragung der Abszisse entspricht der absoluten Distanz der Intensitätsschwerpunkte vom Zellkernrand in μm und die Ordinate der normiert kumulierten Häufigkeit. Die euklidische DT Verteilungen werden von den gestrichelten und die Chamfering DT Verteilungen von den durchgezogenen Kurven repräsentiert. Die blauen Kurven entsprechen den Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 und die roten den der Chromosomenterritorien 19. Die Abbildung b zeigt die Ergebnisse der KS-Tests, bei welchen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten Distanzen der Chamfering DT und euklidischen DT verglichen werden. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten entnommen wurden (Alternativhypothese).

7.1.3 Ellipsoidanpassung

Die Anpassung eines Ellipsoid an die Fibroblastenzellkerne erfolgte mit dem im Kapitel 5.2 vorgestellten Algorithmus. Die Zellkerne wurden, um eine axiale Verzerrung zu vermeiden, reskaliert, anschließend an alle Fibroblastenzellkerne ein Ellipsoid angepaßt, die Anpassungseffizienz berechnet und die randbasierte relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in den Ellipsoiden mit der in Zellkernen verglichen. Es gibt zwei Gründe für dieses Experiment, der erste ist die Untersuchung, ob die relative radiale Position von Objekten in Ellipsoiden, welche für simulierte Chromosomenterritorien verwendet werden, mit der in experimentellen Zellkernen übereinstimmt bzw. wie verzerrt die Ergebnisse sind. Der zweite Grund ist die Überprüfung, mit welcher Effizienz sich Ellipsoide an Zellkerne anpassen lassen, sodass in diesen anschließend z.B. Chromosomenterritorien simuliert werden könnten. Die Mittelwerte μ_{18} und μ_{19} und die Standardabweichungen σ_{18} und σ_{19} der relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19, welche sich innerhalb der Ellipsoid und Zellkerne ergeben sind in Tabelle 7.4 zu sehen. Die randbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 ($n=56$) entspricht in den Ellipsoiden 40%, die der Chromosomenterritorien 19 ($n=68$) 59%. Die Standardabweichungen liegen bei 19% (Chromosomenterritorium 18 und Chromosomenterritorium 19). Die randbasierte relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 in Ellipsoiden ist um 2% und für die Chromosomenterritorien um 9% nach radial außen verschoben.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen sind im Diagramm **a** der Abbildung 7.6 zu sehen. Die blauen Kurven entsprechen den Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 und die roten Kurven den Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 19. Die randbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien sind durch gestrichelte Kurven und die innerhalb der Fibroblastenzellkernen durch durchgezogene Kurven repräsentiert. 79% der Chromosomenterritorien 18 liegen innerhalb der Ellipsoide bei einer radialen Position von $\leq 50\%$ und 21% bei einer radialen Position von $>50\%$. Für die Chromosomenterritorien 19 gilt, dass 38% bei einer radialen Position von $\leq 50\%$ liegen und 62% bei einer radialen Position von $>50\%$. Für die radialen Positionen innerhalb der Zellkerne gilt, dass 91% der Chromosomenterritorien 18 und 60% der Chromosomenterritorien 19 eine radiale Position von $\leq 50\%$ einnehmen. Die relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 ist in Ellipsoiden, im Vergleich zu Fibroblasten Zellkernen nach außen verschoben, wie aus den normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen hervorgeht. Der statistische Vergleich der Verteilungen erfolgte mit dem KS-Test, mit welchem für die Verteilungen der Chromosomenterritorien 19 ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ nachgewiesen werden kann (Diagramm **c** in Abbildung 7.6).

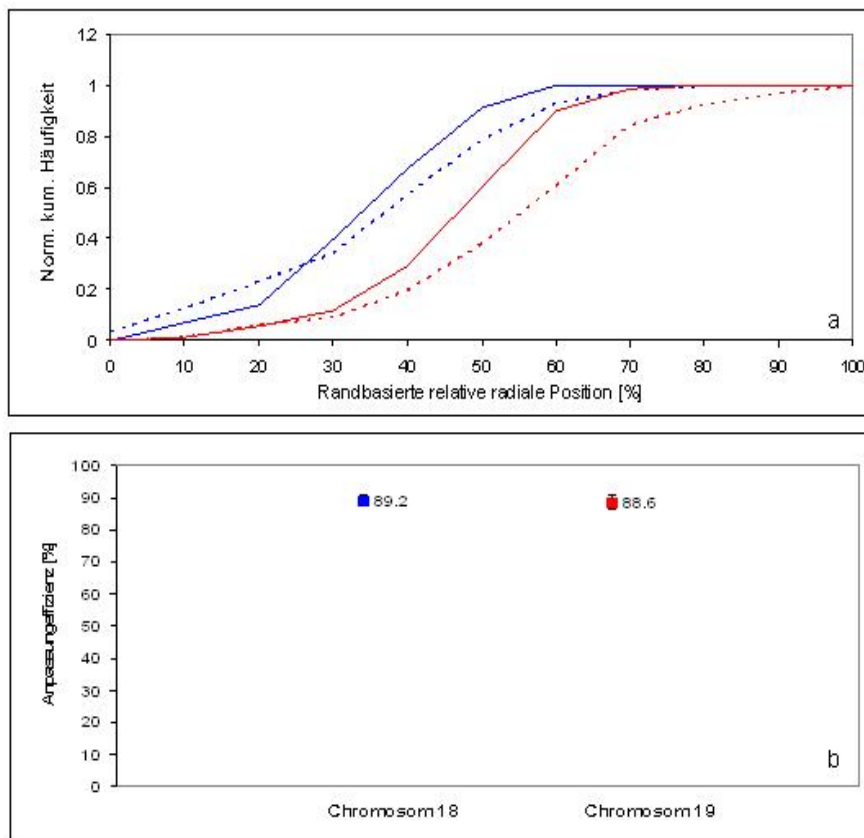
Experiment	Einheit	Ellipsoid	Zellkern
μ_{18}	[%]	40	38
σ_{18}	[%]	± 19	± 13
μ_{19}	[%]	59	50
σ_{19}	[%]	± 19	± 14
Zellkerne		62	62

Tabelle 7.4: Mittelwerte und Standardabweichungen relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblasten-Zellkernen und Ellipsoiden. Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% dem radial zentralen und 100% dem radial peripheren Bereich entspricht.

Die Anpassungseffizienzen sind im Diagramm **b)** der Abbildung 7.6 zu sehen. Für die Fibroblastenkerne der Chromosomenterritorien 18 ergibt sich eine mittlere Anpassungseffizienz von 89.2% und für die Fibroblastenkerne der Chromosomenterritorien 19 von 88.6%.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 in Ellipsoiden stimmen mit denen in Fibroblasten-Zellkernen überein, die der Chromosomenterritorien 19 weisen einen statistisch signifikanten Unterschied auf.
2. Ursache für den signifikanten Unterschied ist die Verschiebung der radialen Positionen innerhalb der Ellipsoide nach radial außen.
3. Es kann nicht entschieden werden, ob die radiale Verschiebung aufgrund des Ellipsoids oder der mangelhaften Anpassung erfolgt.
4. Es kann mit dem vorliegenden Algorithmus eine Anpassungseffizienz von 88.6% bzw. 89.2% erreicht werden.



c

	Zellkern 18	Zellkern 19
Ellipsoid 18	x	x
Ellipsoid 19	x	x

x	=	nicht getestet
x	=	nicht signifikant
x	=	signifikant $p < 0.05$
x	=	signifikant $p < 0.001$
x	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.6: Das Diagramm a zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in angepaßten Ellipsoiden und Fibroblastenzellkernen. Die Auftragung der Abszisse entspricht der relativen radialen Position in % und die Ordinate der normiert kumulierten Häufigkeit. Die Verteilung der Meßwerte in den angepaßten Ellipsoide werden von den gestrichelten und die Verteilung der Meßwerte in den Zellkernen von den durchgezogenen Kurven repräsentiert. Die Kurven geben die Verteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 (blau) und der Chromosomenterritorien 19 (rot) wieder. Das Diagramm b zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anpassungseffizienz der Ellipsoide an die Zellkerne der Chromosomenterritorien 18 und 19. Die Ordinate zeigt die Anpassungseffizienz in % an. Das Diagramm c in Abbildung zeigt die Ergebnisse der KS-Tests, bei welchen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Ellipsoiden und Zellkernen miteinander verglichen werden. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < \alpha$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten entnommen wurden (Alternativhypothese).

7.1.4 Messung der MF der Chromosomenterritorien 18 und 19

Die Messung der MF erfolgte an den Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen, auf welche der Isodata-Algorithmus angewendet wurde und deren Voxelgröße isotrop auf 100 nm reskaliert war. Ziel dieses Experiments war es, die morphologische Struktur der experimentellen Chromosomenterritorien 18 und 19 gegenüber zu stellen. Auf Chromosom 18 befinden sich 438 Gene, bei einer DNA-Länge von 76 MBp, und auf Chromosom 19 1624 Gene, bei einer DNA-Länge von 63 MBp. Die beiden Chromosomen bilden somit ein optimales biologisches Modell, um die Morphologie mit der Fragestellung der Kondensation, Dekondensation und Aktivität zu verknüpfen. Die Messung der MF erfolgte mit dem im Kapitel 5.6.2 vorgestellten Algorithmus und ergab die folgenden Parameter: das normierte Volumen, die spezifische Oberflächendichte, die spezifische integrierte mittlere und totale Krümmung und die Eulerzahl. Die Parameter werden nicht als absolute Werte angegeben, sondern es werden, da Unterschiede zwischen den Chromosomenterritorien 18 und 19 untersucht werden, die Verhältnisse $\frac{\text{Chromosomenterritorien19}}{\text{Chromosomenterritorien18}}$ angegeben. Das theoretische Verhältnis ergibt sich aus dem Verhältnis der MBp von Chromosomenterritorium 19 zu 18 und entspricht einer homogenen Struktur mit einem Wert von 0.83. Die Verhältnisse werden in Bezug auf diesen theoretischen Werte analysiert.

Die Verhältnisse der Mittelwerte $\mu(\frac{19}{18})$ und deren Standardabweichungen $\sigma(\frac{19}{18})$ der Parameter normiertes Volumen \hat{V} , spezifischen Oberflächendichten \hat{S} , spezifische integrierte mittlere Krümmung \hat{M} , spezifische integrierte totale Krümmung \hat{K} und Eulerzahl $\hat{\chi}$ sind in Tabelle 7.5 zu sehen. Der Vergleich der Chromosomenterritorien 18 (n=56) und 19 (n=68) ergibt für das Verhältnis $\frac{\text{Chromosomenterritorien19}}{\text{Chromosomenterritorien18}}$ der normierten Volumina \hat{V} einen Wert von 0.74. Dieser Wert liegt unter dem theoretischen Wert von 0.83 (blaue gestrichelte Linie), sodass das Chromosomenterritorium 18 ein größeres Volumen als das Chromosomenterritorium 19 aufweist. Innerhalb der Fehlergrenzen, stimmt dieser Wert jedoch mit dem theoretischen überein (Diagramm **a** Abbildung 7.7). Die analogen Schlussfolgerungen gelten für die Parameter \hat{S} (0.80), \hat{M} (0.73) und \hat{K} (0.88). Eine Übereinstimmung der Verhältnisse innerhalb ihrer Fehlergrenzen bzgl. der MF \hat{V} , \hat{S} , \hat{M} und \hat{K} mit dem theoretischen Wert ist gleichbedeutend mit **keinem** morphologischen Unterschied der Strukturen. Das Verhältnis der Eulerzahl $\hat{\chi}$ liegt deutlich oberhalb des theoretischen Wertes (siehe Diagramm **b** Abbildung 7.7), dieses Resultat wird von der Verzerrung der Eulerzahl, aufgrund der Abhängigkeit von der Meßrichtung, hervorgerufen. Der visuell sichtbare Strukturunterschied zwischen den Chromosomenterritorien 18 und 19 ist somit ein von der Meßrichtung abhängiger Unterschied, welcher bei Korrektur, d.h. bei Anwendung der spezifischen integrierten totalen Krümmung, verschwindet.

Parameter	\hat{V}	\hat{S}	\hat{M}	$\hat{\chi}$	\hat{K}
$\mu(\frac{19}{18})$	0.74	0.80	0.73	6.54	0.88
$\sigma(\frac{19}{18})$	± 0.13	± 0.10	± 0.14	± 1.41	± 0.42
Zellkerne	62	62	62	62	62

Tabelle 7.5: Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisse $\frac{\text{Chromosomenterritorien19}}{\text{Chromosomenterritorien18}}$, welche aus den MF normiertes Volumen \hat{V} , spezifischen Oberflächendichten \hat{S} , spezifische integrierte mittlere Krümmung \hat{M} , spezifische integrierte totale Krümmung \hat{K} und Eulerzahl $\hat{\chi}$ resultieren.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die experimentellen Chromosomenterritorien 18 und 19 unterscheiden sich bzgl. der MF \hat{V} , \hat{S} , \hat{M} und \hat{K} nicht, da innerhalb der Fehlergrenzen keine Abweichung vom theoretischen Wert, welcher sich aus dem Verhältnis der MBp 19 zu 18 ergibt, nachgewiesen werden können. Es existieren also keine morphologischen Strukturunterschiede.
2. Der aus dem Verhältnis der Mittelwerte der Eulerzahl $\hat{\chi}$ resultierende Unterschied ist somit eine Resultat der Verzerrung durch die Meßrichtung.

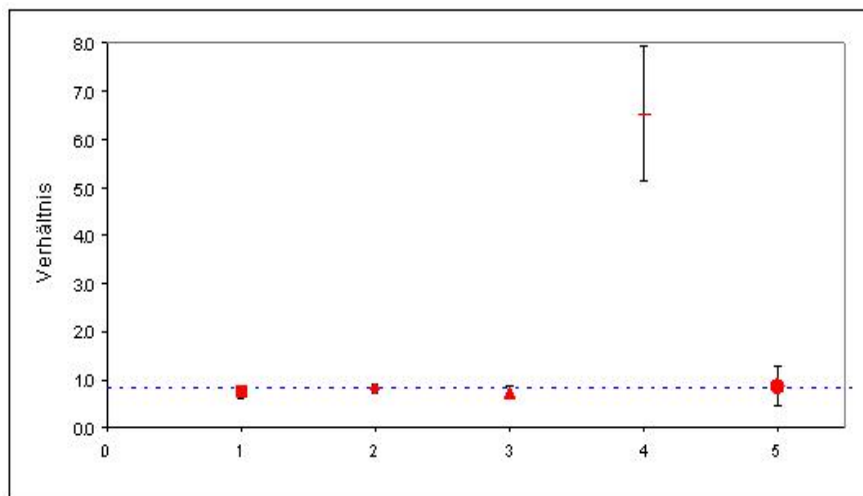


Abbildung 7.7: Das Diagramm a zeigt die Verhältnisse der Mittelwerte der MF der Chromosomenterritorien 19 zu 18 mit Standardabweichungen. Die Verhältnisse entsprechen dem normierten Volumen \hat{V} (1), der spezifischen Oberflächendichte \hat{S} (2), der spezifischen integrierten mittleren Krümmung \hat{M} (3), der Eulerzahl $\hat{\chi}$ (4) und der spezifischen integrierten totalen Krümmung \hat{K} . Die blaue gestrichelte Linie entspricht dem Verhältnis der MBp von Chromosomenterritorium 19 zu 18. Die Ordinate gibt das Verhältnis der Mittelwerte.

7.2 Untersuchung der Topologie des BCL2 Gens und des Chromosom 18 in Cervix-Gewebe

Das BCL2 Gen ist ein anti-apoptose Gen, welches auf Chromsom 18 liegt, und in die Entwicklung des Cervix-Karzinoms involviert ist. Alle bisherigen Untersuchungen im medizinischen Bereich beschränken sich auf Expressionanalysen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit die Topologie des BCL2 Gens und des Chromosom 18 in normalem Basal-, Intermediär-, Apikal-Cervix-Gewebe und in Cervix-Karzinomgewebe untersucht wurde. Die Cervix ist der untere Teil des Uterus (Gebärmutter). Das Cervix-Gewebe wurde dem vaginalen Teil der Cervix, der sogenannten Portio entnommen, welche aus einem mehrschichtigen Plattenepithel besteht. Das verwendete Gewebe, in welchem das BCL2 Gen und das Chromosom 18 mittels FISH markiert wurden, war Formalin fixiert und in Paraffinwachs eingebettet [116]. Die Aufnahmen erfolgte an einem Apotome (Axioplan2, Carl Zeiss, Jena), welches mit einem PlanApo 63x/NA 1.4 Ölobjektiv bestückt war, und die Detektion der Fluoreszenzsignale mit einer CCD-Kamera. Die laterale Voxelgröße betrug 102 nm und es wurden zweidimensionale 8 Bit Tiff-Bilder mit einer axialen Schrittweite von 325 nm aufgenommen. Die detektierten Zellkerne wurden interaktiv aus der entsprechenden Gewebeschicht (apikal, intermediär oder basal) und Gewebeart (Karzinomgewebe oder kein Karzinomgewebe) selektiert und zugeordnet. Die digitalen Bilder wurden in das KDF-Format konvertiert und die Signale der Zellkerne bzw. Chromosomenterritorien mit einem 3x1x1 und 1x3x1 bzw. 5x1x1 und 1x5x1 Binomialfilter verstärkt. Die chromatische Verschiebung konnte, aufgrund der nicht vorhandenen Kalibrationsobjekte (Beads), nicht korrigiert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass in laterale und axiale Richtung eine Ungenauigkeit von ca. einem Voxel vorliegt. Auf die Zellkerne und die Chromosomenterritorien wurden das Isodataverfahren angewendet und die Objekte anschließend mit dem Khorosprogramm *Label_obj_3D* segmentiert. Die Segmentierung der BCL2 Gene erfolgte mit dem Tophatfilter (siehe Kapitel 5.1.5). Der vollständige Datensatz wurde visuell kontrolliert, woraus sich die folgende Anzahl an auszuwertenden Chromosomen- und Genmarkierungen ergab:

- 46 Chromosomenterritorien 18 und 74 BCL2 Gene im apikalen Gewebe.
- 36 Chromosomenterritorien 18 und 78 BCL2 Gene im intermediären Gewebe.
- 72 Chromosomenterritorien 18 und 90 BCL2 Gene im basalem Gewebe.
- 80 Chromosomenterritorien 18 und 88 BCL2 Gene im Karzinomgewebe.

Der Tophatfilter selektierte und segmentierte, mit einer Einstellung von $r=0.5$, in 165 Zellkernen von 189 Zellkernen beide BCL2 Signale, in 16 Zellkernen nur ein BCL2 Signal und in 7 Zellkernen >2 BCL2 Signale. Die hieraus resultierende Effizienz, unter Ausschluß der Zellkerne mit >2 BCL2 Signalen, entspricht 91%.

Anhand der segmentierten Bilddaten wurde die Distanz des BCL2 Gens relativ zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 (Kapitel 7.2.1) und die schwerpunktbasierte und randbasierte relative radiale Position beider Regionen innerhalb des Zellkerns berechnet (Kapitel 7.2.2). Zusätzlich wurden die absoluten und normierten Distanzen, sowie die Schwerpunktswinkel zwischen den beiden Regionen gemessen (Kapitel 7.2.3). Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit zwei verschiedenen Tests, welche sich aus zwei verschiedenen Fragestellungen ergaben: Einerseits sollten Unterschiede zwischen der Topologie des BCL2

Gens und des Chromosom 18 in den verschiedenen Gewebeschichten und andererseits die Unterschiede zwischen den zwei Chromosomenterritorien und Genen innerhalb einer Zellkerngruppe der gleichen Gewebeschicht untersucht werden. Zur Untersuchung der Unterschiede innerhalb der gleichen Gewebeschicht wurden die Verteilungen der gesamten Meßwerte, die sich für die Distanz der Gene von der Oberfläche der Chromosomenterritorien und die schwerpunkt-basierten und randbasierten, relativen radialen Positionen ergaben, in zwei Gruppen unterteilt (für jeden Zellkern ergeben sich zwei Meßwerte, da je zwei Chromosomenterritorien und Gene vorhanden sind). Die Unterteilung der Meßwerte in zwei Gruppen erfolgte, indem der kleinere und größere Meßwerte jedes Zellkerns in eine eigene Verteilung sortiert wurden. Der Vergleich zwischen diesen beiden Verteilungen erfolgte, indem die Mittelwerte der Verteilung mit den kleineren Meßwerten μ_{in} vom Mittelwert der Verteilung mit den größeren Meßwerten μ_{out} subtrahiert $\Delta\mu = \mu_{out} - \mu_{in}$ und der resultierende Wert μ mit der skalierten Standardabweichung der gesamten Verteilung $\sigma = 1.13\sigma_{ges}$ verglichen wurde. War der Abstand der Mittelwerte größer als die skalierte Standardabweichung der gesamten Verteilung, galt also $\Delta\mu > \sigma$, so wurden die aufgeteilten Verteilungen als signifikant unterschiedlich angesehen. Ergab sich umgekehrt $\Delta\mu < \sigma$ so waren die beiden Verteilungen nicht signifikant unterschiedlich [93]. Der Vergleich basiert auf der Sortierung zweier Gruppen von Meßwerten aus einer annähernd normalverteilten Messung. Die Differenz der Mittelwerte einer zufälligen Sortierung der Meßwerte, welche durch die skalierte Standardabweichung gegeben ist, wird mit der Differenz der Mittelwerte einer nicht zufällig sortierten Verteilungen verglichen. Eine Signifikanz zwischen den beiden Verteilungen ergibt sich dann aus oben genanntem Kriterium. Die statistische Untersuchung der Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebeschichten erfolgte anhand des KS-Test [120] [106]. Der KS-Test basiert auf dem Vergleich der maximalen vertikalen Distanz d_{vert} zwischen zwei normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen mit einem von der Stichprobenzahl und der Irrtumswahrscheinlichkeit p abhängigen Parameter D . Die Nullhypothese, H_0 =Beide Stichproben wurden der gleichen Grundgesamtheit entnommen, wird hierbei angenommen, wenn $d_{vert} < D$ gilt, d.h. die beiden Verteilungen waren signifikant nicht zu unterscheiden. Ein signifikanter Unterschied $d_{vert} > D$ bedeutet, dass die Alternativhypothese, H_1 =Beide Stichproben wurden nicht der gleichen Grundgesamtheit entnommen, angenommen wird und die beiden Verteilungen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $< p$ unterschieden werden können. Der KS-Test wurde sowohl auf die normiert kumulierte Verteilung der gesamten Meßwerte, als auch auf die sortierten aufgeteilten Verteilungen angewendet, welche im folgenden als zentral-zentral und peripher-peripher bezeichnet werden.

Anhand der Messungen und statistischen Auswertungen wurde ein topologisches Modell des BCL2 Gens und des Chromosom 18 in normalem Cervixgewebe und Cervixkarzinomgewebe entwickelt, welches in Kapitel 7.2.3 vorgestellt wird.

7.2.1 Lage des BCL2 Gens relativ zum Chromosomenterritorium 18

Die Lage des BCL2 Gens in Bezug auf das Chromosomenterritorium 18 wurde anhand der absoluten Distanz des Intensitätsschwerpunktes des BCL2 Gens zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 ermittelt. Die Distanzen wurden mit dem randbezogenen euklidischen DT Algorithmus vermessen (siehe Kapitel 5.3.3), wobei 0 einer Lage des Gens auf der Oberfläche, negative Distanzen einer Lage des Gens innerhalb des Chromosomenterritoriums und eine positive Distanz einer Lage außerhalb des Chromosomenterritoriums entspricht. Die Mittelwerte μ_{ges} , μ_{in} und μ_{out} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{in} und σ_{out} , die Distanz der Mittelwerte $\Delta\mu$, die skalierte absolute Standardabweichung σ und das Testergebnis des Vergleichs der aufgeteilten Verteilungen ist in Tabelle 7.6 zu sehen. Die Mittelwerte μ der gesamten Verteilung

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ_{ges}	[nm]	-102	-98	-108	-64
σ_{ges}	[nm]	± 329	± 189	± 226	± 155
μ_{in}	[nm]	-231	-187	-213	-157
σ_{in}	[nm]	± 156	± 154	± 179	± 108
μ_{out}	[nm]	28	-12	-4	29
σ_{out}	[nm]	± 401	± 190	± 217	± 140
$\Delta\mu$	[nm]	259	175	208	186
σ	[nm]	371	264	256	176
Testergebnis		negativ	negativ	negativ	positiv

Tabelle 7.6: Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten Distanz des BCL2 Gens von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Cervix-Gewebeschicht und in Cervix-Karzinomgewebe. Die Werte sind in nm angegeben, wobei negative Werte einer Position innerhalb und positive Werte einer Position außerhalb entsprechen. Die Zeile Testergebnis gibt das Resultat des Vergleichs zwischen den aufgeteilten Verteilungen wieder.

sind in allen Gewebeschichten negativ und liegen zwischen -64 und -108 nm. Die Mittelwerte der sortierten aufgeteilten Verteilungen liegen für die Verteilung mit den kleineren Distanzen bei -231 bis -157 nm, die der größeren Meßwerte zwischen -4 und 29 nm. Die Standardabweichungen der gesamten Verteilung, liegen zwischen 155 und 329 nm, die der Verteilung der kleineren Meßwerte zwischen 140 und 401 nm und die der Verteilung der kleineren Meßwerte zwischen 108 und 179 nm. Die Differenz der Mittelwerte $\Delta\mu$ der sortierten Verteilungen liegt im Karzinomgewebe bei 186 nm und ist somit signifikant 10 nm größer als die skalierte Standardabweichung σ von 176 nm. Dieser signifikante Unterschied von 10 nm wird allerdings, aufgrund der nicht vorgenommenen Korrektur der chromatischen Verschiebung, nicht als signifikant angenommen.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen, welche die sortierten und gesamten Verteilungen jeder Gewebeschicht, und die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung bzw. Häufigkeitsverteilung, welche alle Gewebeschichten gegenüberstellen, sind in den Diagrammen der Abbildung 7.8 und 7.9 zu sehen. Die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung der kleineren Meßwerte ist durch eine durchgezogenen schwarzen Linie gekennzeichnet, die der größeren Meßwerte durch die gestrichelten Linie und die der gesamten Meßwerte entspricht der roten durchgezogenen Linie. In den Diagrammen, welche die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung und die Häufigkeitsverteilung in allen Gewebeschichten zeigen (Diagramme **a** und **b** in Abbildung 7.9), sind die Meßwerte der apikalen Schicht hellblau, die der intermediären türkis,

die der basalen dunkelblau und die der Karzinomschicht rot gekennzeichnet (Dies gilt für alle weiteren gezeigten Diagramme).

Die Häufigkeitsverteilungen aller Gewebeschichten (Diagramm **b** in Abbildung 7.9) zeigen, dass die Meßwerte alle in einem Bereich von -700 bis 1500 nm streuen und die Maxima aller Gewebeschichten in der Häufigkeitsklasse -100 nm liegen. Die Verteilungen haben alle die gleiche Form und aus der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung (Diagramm **a** in Abbildung 7.9) wird ersichtlich, dass >80% aller BCL2 Gene in allen Gewebeschichten innerhalb des Chromosomenterritoriums 18 liegen und <20% der Meßwerte außerhalb. Der anhand des Vergleichs der sortierten Verteilungen gezeigte statistische Unterschied für das Karzinomgewebe wird nicht deutlich und die Verteilungen des Karzinomgewebes unterscheiden sich nicht deutlich von denen der anderen Gewebeschichten. Aus den normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Gewebeschichten ist abzulesen, dass, wenn die Häufigkeitsverteilungen in die Betrachtung mit einbezogen werden, in allen Gewebeschichten in >80% aller Zellen beide BCL2 Gene innerhalb und peripher liegen und in <20% der Zellen eines der BCL2 Gene außerhalb und eines innerhalb liegt.

Die Ergebnisse der KS-Tests sind in Abbildung 7.10 zu sehen. Hierbei wurden die Gesamtverteilungen und die zwei aufgeteilten Verteilungen untereinander (zentral-zentral und peripher-peripher) verglichen, wobei kein signifikanter Unterschied ersichtlich wurde.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das BCL2 Gen ist in allen Gewebeschichten zwischen -64 und -108 nm (Mittelwerte der gesamten Verteilungen) von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 entfernt und liegt im inneren des Chromosomenterritoriums.
2. Die Signifikanz, welche sich aus dem Aufteilen der Verteilungen für das Karzinomgewebe ergibt, kann vom KS-Test nicht bestätigt werden, da die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen des apikalen, intermediären und basalen Gewebes weder für die aufgeteilten noch für die gesamten Verteilungen von denen des Karzinomgewebes unterschieden werden konnten.
3. Die Maxima der Häufigkeitsverteilungen liegen für alle Gewebeschichten innerhalb der Distanzklasse -100 nm.
4. Aufgrund von Punkt 3 und da die Differenz, aus welcher sich die Signifikanz im Karzinomgewebe ergibt, nur 10 nm beträgt und diese Differenz eine kleine Abweichung von einer zufälligen Sortierung entspricht, wird die Lage des BCL2 Gens relativ zum Chromosomenterritorium 18 in allen Gewebeschichten als gleich angesehen.

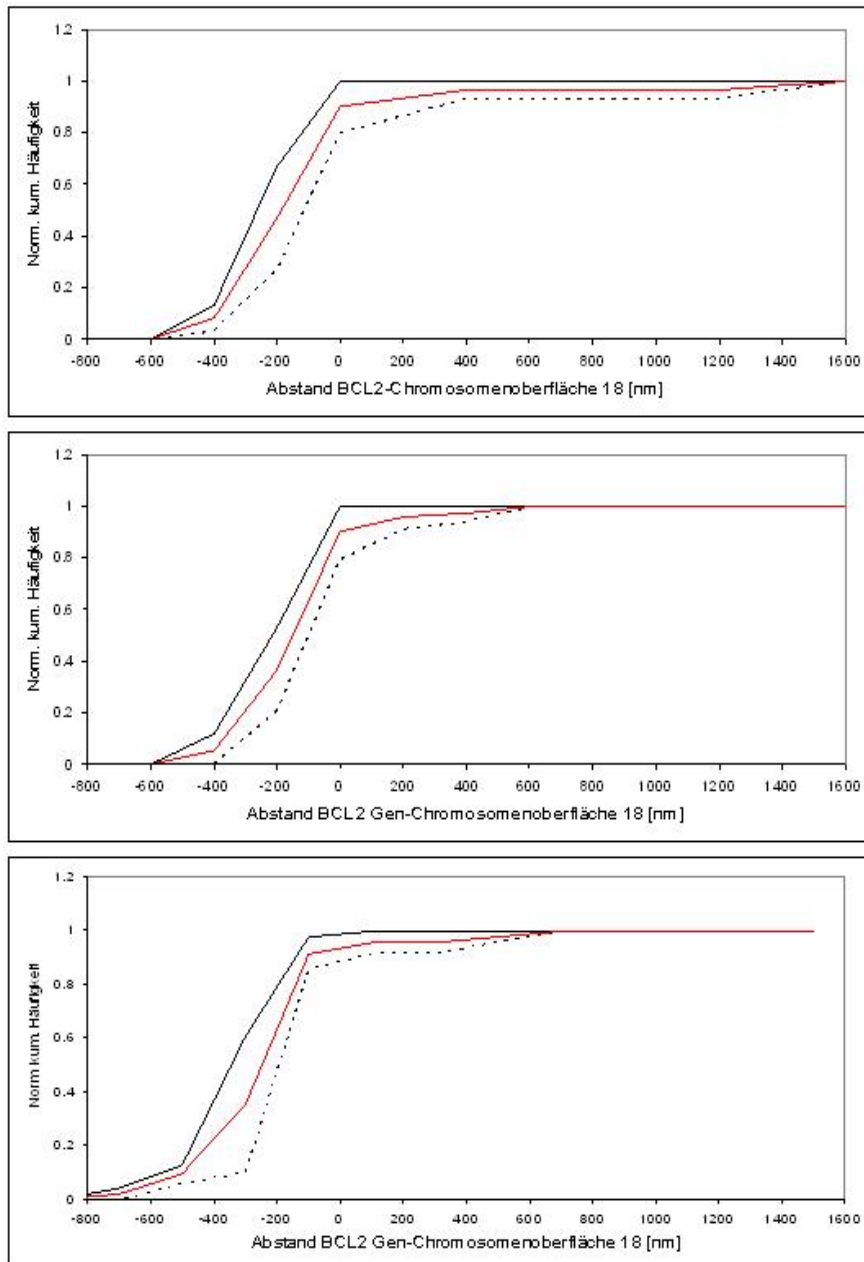


Abbildung 7.8: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten und aufgeteilten Meßwerte der absoluten Distanz der BCL2 Gene von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschicht. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte mit der kleineren Distanz, die schwarze gestrichelte der Verteilung der Meßwerte mit der größeren Distanz von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Abszisse entspricht der absoluten Distanz des BCL2 Gens von der Oberfläche des Chromosom 18 in nm und die Ordinate der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

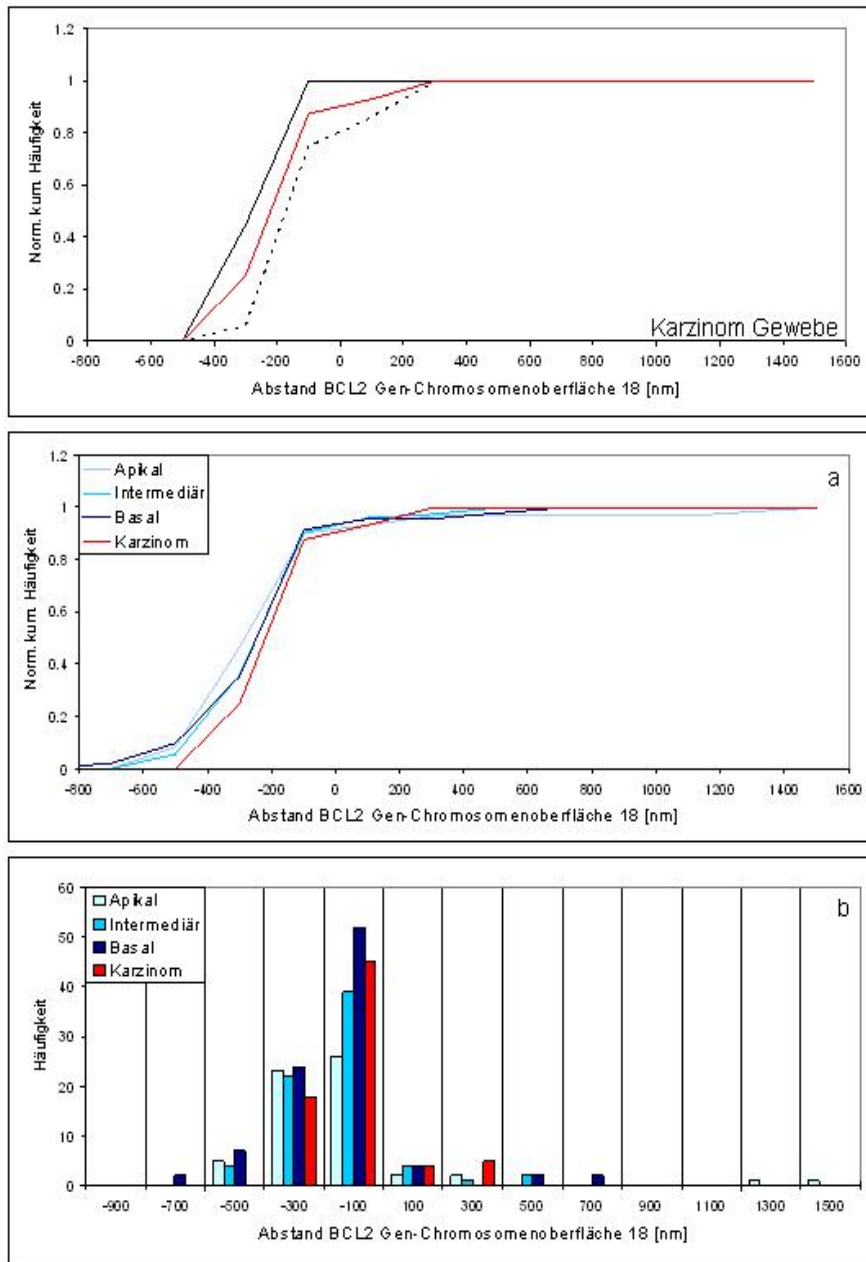


Abbildung 7.9: Das obere Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten und aufgeteilten Meßwerte der absoluten Distanz der BCL2 Gene von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte mit der kleineren Distanz, die schwarze gestrichelte der Verteilung der Meßwerte mit der größeren Distanz von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18. Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und der Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm a entspricht dem absoluten Abstand des BCL2 Gens von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 in nm und die Ordinate der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung. Die Auftragung der Abszisse in Diagramm b entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, welche eine Breite von $\Delta 200$ nm haben.

Gesamte Verteilungen v. Gesamte Verteilungen

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Zentral v. Zentral

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Peripher v. Peripher

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.10: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der absoluten Distanz der BCL2 Gene von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Tests. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte und der aufgeteilten Meßwerte untereinander verglichen (zentral-zentral, peripher-peripher). Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten entnommen wurden (Alternativhypothese).

7.2.2 Relative radiale Position des BCL2 Gens und des Chromosomenterritoriums 18

Die relative radiale Position der BCL2 Gene und der Chromosomenterritorien 18 wurde anhand der Intensitätsschwerpunkte innerhalb des Zellkernes schwerpunkt-basiert und randbasiert vermessen. Die Auftragung und Aufteilung der Verteilungen wurden, analog zu der im vorigen Kapitel vorgenommen und die gesamten Meßwerte in radial zentral und radial peripher liegende Chromsomenterritorien und Gene eingeteilt. Die Meßwerte der relativen radialen Position sind in % angegeben, wobei 0% einer radial zentralen Position im Zellkerninneren und 100% einer radial peripheren Position am Zellkernrand entspricht. Die Mittelwerte μ_{ges} , μ_{in} und μ_{out} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{in} und σ_{out} , die Distanz der Mittelwerte $\Delta\mu$, die skalierte absolute Standardabweichung σ und das Testergebnis des Vergleichs der aufgeteilten Verteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 sind in Tabelle 7.7, die der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position in Tabelle 7.8 zu sehen.

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ_{ges}	[%]	59	64	66	69
σ_{ges}	[%]	± 15	± 15	± 20	± 20
μ_{in}	[%]	51	56	56	62
σ_{in}	[%]	± 14	± 15	± 18	± 20
μ_{out}	[%]	67	73	76	76
σ_{out}	[%]	± 12	± 10	± 16	± 16
$\Delta\mu$	[%]	16	17	20	14
σ	[%]	17	17	22	22
Testergebnis		negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 7.7: Mittelwerte und Standardabweichungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und im Karzinomgewebe. Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% einer radial zentralen Position im Zellkerninneren und 100% einer radial peripheren Position an der Zellkernoberfläche entsprechen. Die Zeile Testergebnis gibt das Resultat des Vergleichs zwischen den aufgeteilten Verteilungen wieder.

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ_{ges}	[%]	58	64	62	65
σ_{ges}	[%]	± 17	± 16	± 18	± 16
μ_{in}	[%]	49	55	51	55
σ_{in}	[%]	± 14	± 17	± 16	± 15
μ_{out}	[%]	67	73	72	75
σ_{out}	[%]	± 16	± 9	± 13	± 10
$\Delta\mu$	[%]	18	18	21	21
σ	[%]	20	18	20	18
Testergebnis		negativ	negativ	positiv	positiv

Tabelle 7.8: Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunkt-basierten relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und in Karzinomgewebe. Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% einer radial zentralen Position im Zellkerninneren und 100% einer radial peripheren Position an der Zellkernoberfläche entsprechen. Die Zeile Testergebnis gibt das Resultat des Vergleichs zwischen den aufgeteilten Verteilungen wieder.

Die Mittelwerte der gesamten Verteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 liegen zwischen 59% (apikal) und 69% (Karzinom). Die Mittelwerte der Verteilung der kleineren Meßwerte liegen zwischen 51% (apikal) und 62% (Karzinom) und die Mittelwerte der Verteilung der größeren Meßwerte zwischen 67% (apikal) und 76% (Karzinom). Keine der aufgeteilten Verteilungen kann signifikant unterschieden werden. Die Standardabweichungen aller Verteilungen liegen in einem Bereich von 12% und 20%.

Die Mittelwerte der gesamten Verteilungen der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position liegen zwischen 58% und 65%, die der aufgeteilten Verteilungen zwischen 49% und 55% (kleinere Meßwerte) und 67% und 75% (größere Meßwerte). Die aufgeteilten Verteilungen des Basal- und Karzinomgewebes können mit einer Differenz 1% bzw. 3% unterschieden werden. Die Standardabweichungen aller Verteilungen liegen in einem Bereich von 9% und 18%.

Die Diagramme in den Abbildungen 7.11 und 7.12 zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 (Farben und Aufteilungen entsprechen den im vorigen Kapitel angegebenen). Die Verteilungen der schwerpunkt-basierten relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 sind in den Diagrammen der Abbildungen 7.14 und 7.15 zu sehen.

Die Meßwerte der randbasierten und schwerpunkt-basierten Messung liegen, wie aus den Häufigkeitsverteilungen zu entnehmen ist (Diagramm **b** der Abbildung 7.12 und 7.15), zwischen 0% und 100%.

Die Häufigkeitsverteilung der schwerpunkt-basierten Messung weist von der Basalschicht in Richtung Intermediär- und Apikalschicht eine Tendenz der Chromosomenterritorien 18 nach radial zentral auf (siehe Mittelwerte), während die radiale Position im Karzinomgewebe deutlich peripher ist. Zusätzlich ist eine nicht signifikante Tendenz der Basalschicht hin zu zwei Maxima, eines bei 45%, der andere bei 65% zu erkennen. Die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung (Diagramm **a** Abbildung 7.15), aller Gewebeschichten zeigt, dass über 80% der Meßwerte in allen Gewebeschichten in einem Bereich $>40\%$ liegen. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der aufgeteilten Meßwerte der Basal- und Karzinomschicht zeigt, dass 81% bzw. 90% der größeren Meßwerte (gestrichelte schwarze Linie) eine radiale Position $>60\%$ und 78% bzw. 75% der kleineren Meßwerte (durchgezogene schwarze Linie) eine radiale Position $<70\%$ einnehmen (Diagramme in den Abbildung 7.14 und 7.15).

Die Häufigkeitsverteilungen der randbasierten (Diagramm **b** in Abbildung 7.12) Messungen weisen die gleichen Tendenzen wie die schwerpunkt-basierten Meßwerte auf. Unterschiede finden sich in Bezug auf die Verteilung der Intermediärschicht, welche 10% radial zentraler liegt und in Bezug auf die Basalschicht, deren zwei Maxima nicht ganz so deutlich sichtbar sind. Die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen (Diagramm **a** Abbildung 7.12) zeigen, dass analog der schwerpunkt-basierten Messung, über 80% der Meßwerte in allen Gewebeschichten in einem Bereich zwischen $>40\%$ liegen. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Gewebeschichten zeigen (Diagramme in Abbildung 7.11 und 7.12), dass beide Meßmethoden ähnliche Verteilungen aufweisen, wobei nur die schwerpunkt-basierten aufgeteilten Verteilungen signifikant unterschiedlich sind.

Die Resultate der KS-Tests der randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position des Chromosom 18 sind in Abbildung 7.13 und 7.16 zu sehen. Alle KS-Tests der schwerpunktsbezogenen Messungen sind nicht signifikant unterschiedlich, während die gesamten ($p < 0.001$) und aufgeteilten (zentral-zentral, $p < 0.01$) Verteilungen der randbasierten Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 in der Apikal- und Karzinomschicht signifikant unterschieden werden können. Die visuell sichtbare Tendenz, dass Chromosom 18 in der Apikal-

schicht deutlich radial zentraler liegt, kann nur mittels der randbasierten Methode bestätigt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der relativen radialen Position von Chromosom 18

1. Die Mittelwerte der randbasierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 liegen bei 59 % (apikales Gewebe), 64% (intermediäres Gewebe), 66% (basales Gewebe) und 69 % (Karzinomgewebe).
2. Die Mittelwerte der schwerpunktbasierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 liegen bei 58 % (apikales Gewebe), 64% (intermediäres Gewebe), 62% (basales Gewebe) und 65 % (Karzinomgewebe).
3. Die Verteilungen der aufgeteilten, schwerpunktsbasierten Meßwerte des Karzinomgewebes und Basalgewebes kann für Chromosom 18 unterschieden werden. Der prozentuale Unterschied zwischen der skalierten Standardabweichung und der Differenz der Mittelwerte beträgt 1% (Basalgewebe) und 3% (Karzinomgewebe).
4. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunktbasierten relativen radialen Position (zentral-zentral, peripher-peripher und Gesamtverteilungen) anhand des KS-Tests gefunden werden.
5. Die aufgeteilten, randbezogenen Meßwerte können für keine Gewebeschicht unterschieden werden.
6. Die randbasierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 in der Apikal- und Karzinomschicht kann anhand des KS-Tests unterschieden werden (zentral-zentral und Gesamtverteilungen).
7. Diese Resultate ergeben ein Bild, in welchem die schwerpunktbasierte relative radiale Position des einen Chromosomenterritoriums 18 bei 51% (Basalgewebe) und 55% (Karzinomgewebe) und die des anderen bei 71% (Basalgewebe) und 75% (Karzinomgewebe) liegt. Da für das Chromosom 18 in der Apikal- und Intermediärschicht keine Unterschiede gefunden werden können und alle KS-Tests negativ ausfallen, gelten für diese die Mittelwerte der gesamten Verteilung.
8. Die randbezogenen Meßwerte ergeben hingegen ein Bild, in welchem die Positionen der beiden Chromosomenterritorien in keiner der Gewebeschichten unterschieden werden können, weshalb für beiden Chromosomenterritorien die Mittelwerte der gesamten Meßwerte verwendet werden. Ein Unterschied zwischen den Gewebeschichten konnte für die Position im Apikal- und Karzinomgewebe nachgewiesen werden, weshalb beide Chromosomenterritorien im Karzinomgewebe radial peripherer liegen, als im Apikalgewebe.

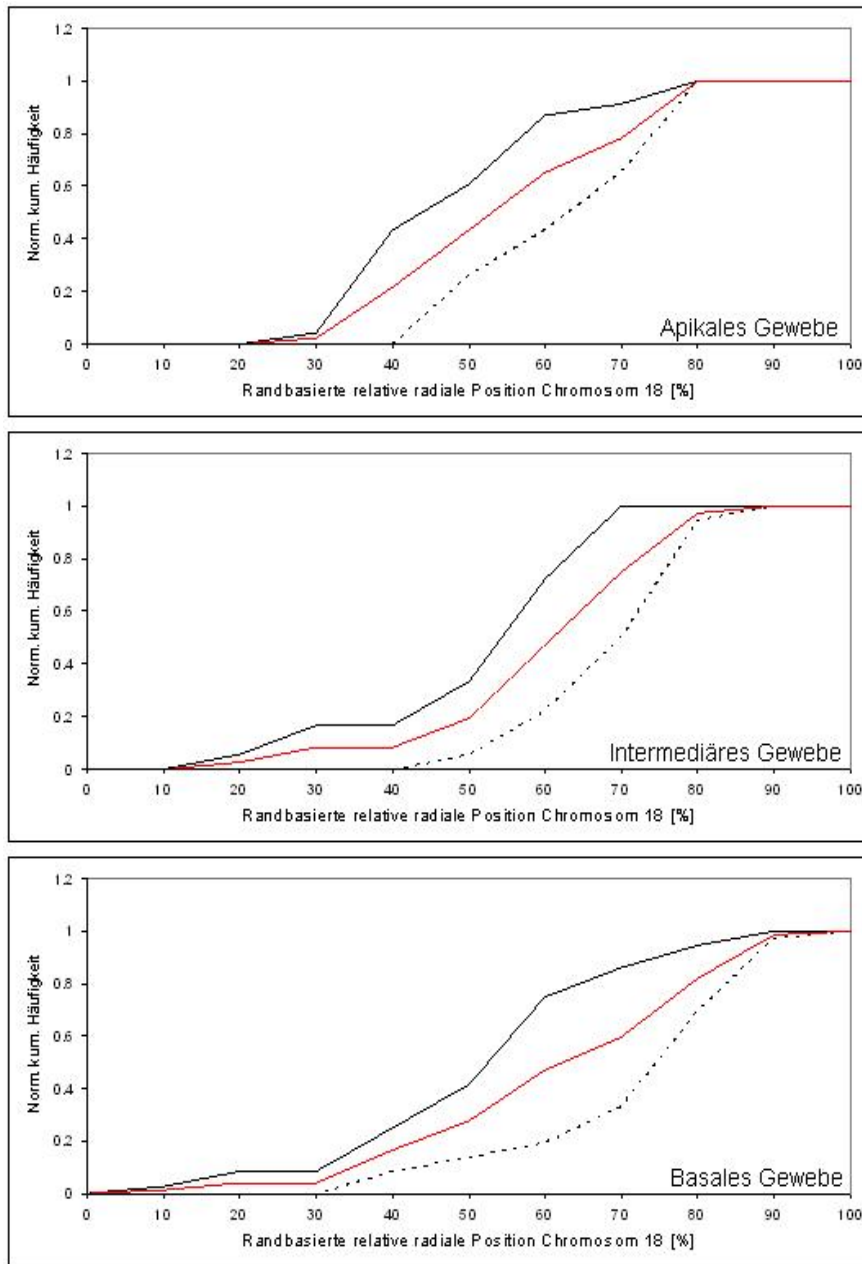


Abbildung 7.11: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebesicht. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 18, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden Chromosomenterritorien 18. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Auftragung der Abszisse gibt den invertierten relativen radialen Abstand der Chromosomenterritorien 18 zum Zellkernrand in % an. 0% entsprechen einer radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position im Zellkern. Die Ordinate entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

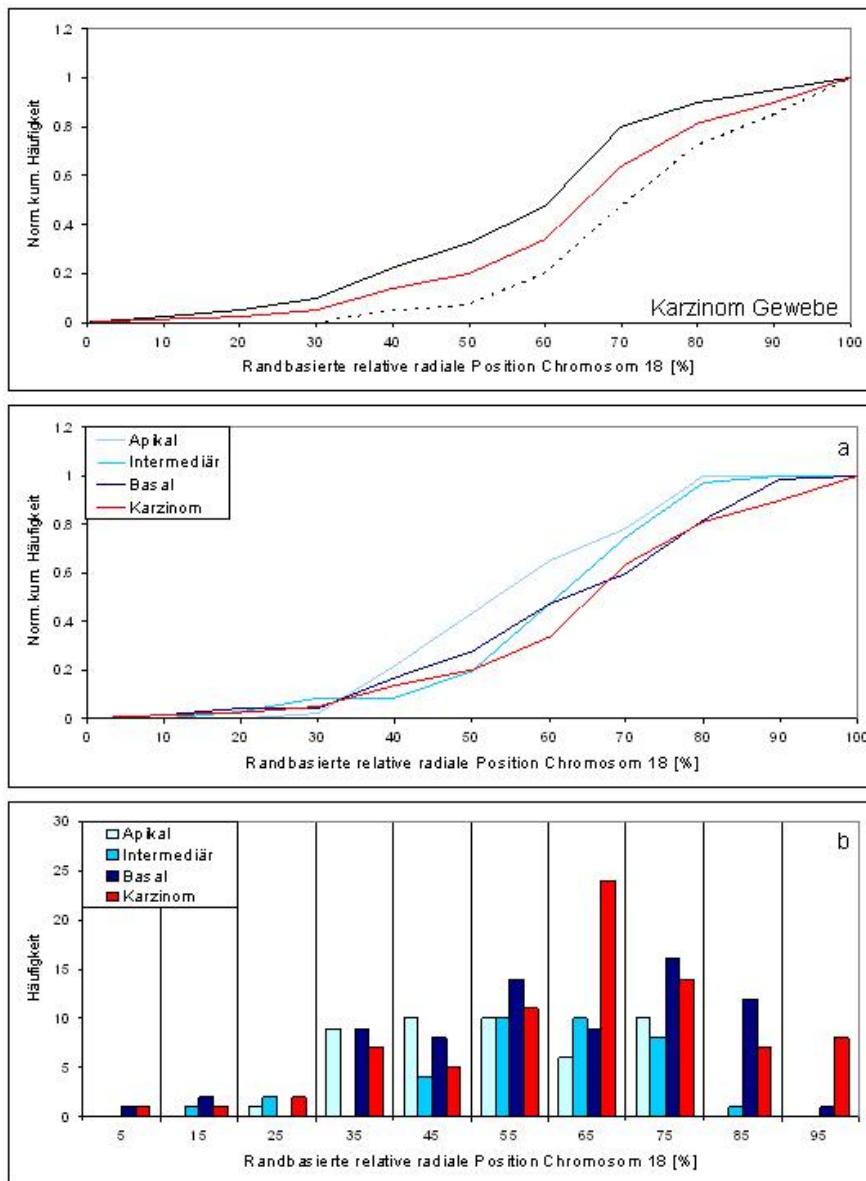


Abbildung 7.12: Das obere Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 18, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden Chromosomenterritorien 18. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Diagramme **a** und **b** zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen aller untersuchten Cervix-Gewebeschichten. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm **a** gibt den invertierten relativen radialen Abstand der Chromosomenterritorien 18 zum Zellkernrand in % an, wobei 0% einer im Zellkern radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position entsprechen. Die Auftragung der Abszisse in Diagramm **b** entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, welche eine Breite von $\Delta 10\%$ haben.

Gesamte Verteilungen v. Gesamte Verteilungen

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Zentral v. Zentral

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Peripher v. Peripher

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.13: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte und der aufgeteilten Meßwerte untereinander verglichen (zentral-zentral, peripher-peripher). Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

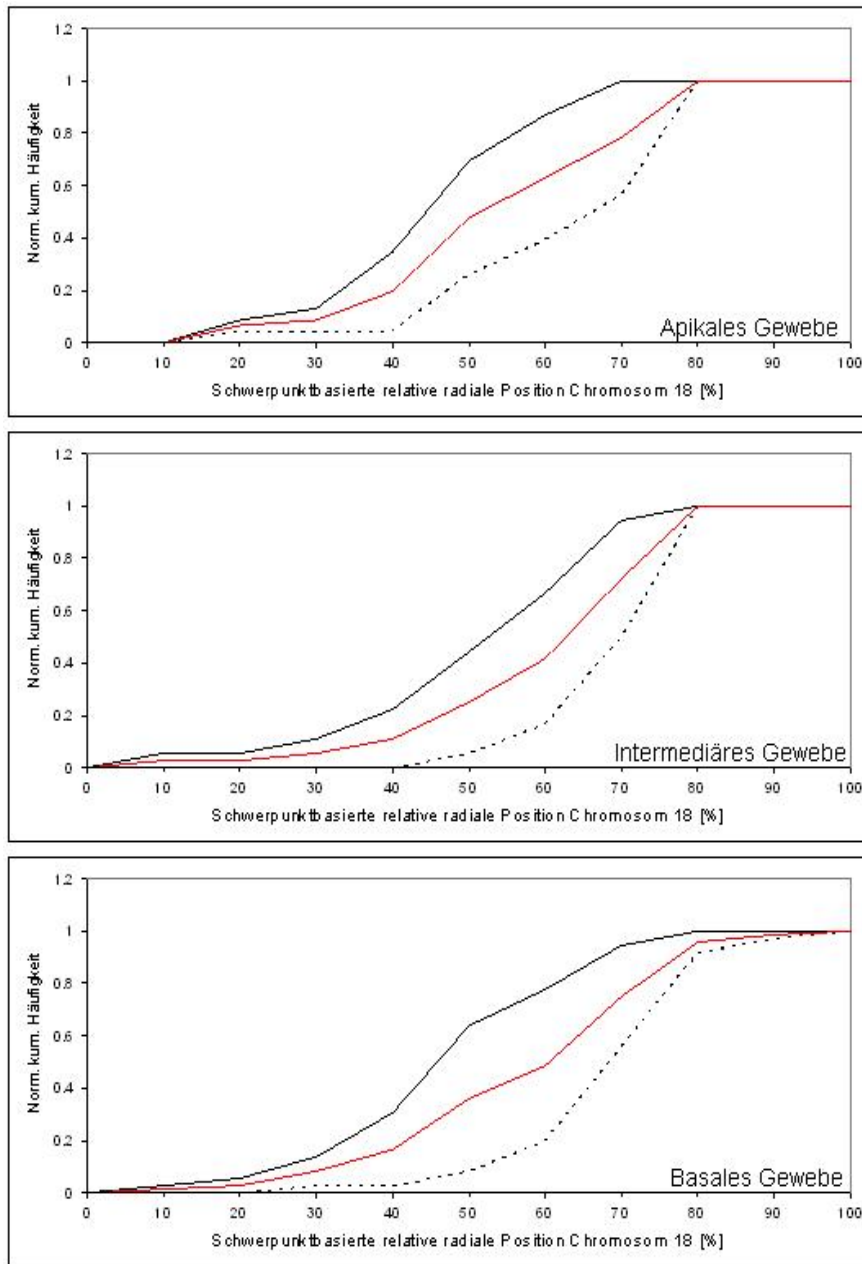


Abbildung 7.14: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschicht. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 18, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden Chromosomenterritorien 18. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Auftragung der Abszisse gibt den relativen radialen Abstand der Chromosomenterritorien 18 vom Schwerpunkt des Zellkerns in % an. 0% entsprechen einer radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position im Zellkern. Die Ordinate entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

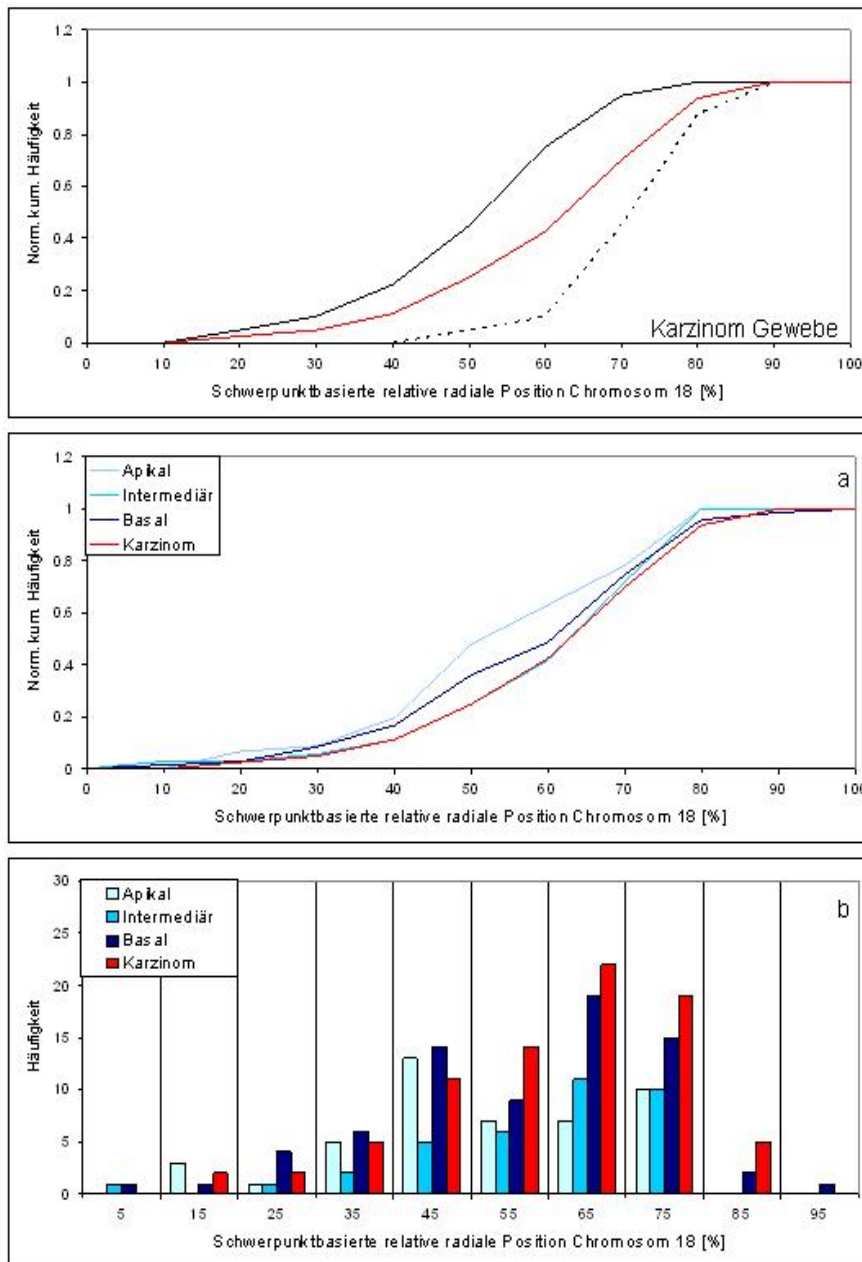


Abbildung 7.15: Das obere Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden Chromosomenterritorien 18, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden Chromosomenterritorien 18. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen aller untersuchten Cervix-Gewebeschichten. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm a gibt den relativen radialen Abstand der Chromosomenterritorien 18 vom Schwerpunkt des Zellkerns in % an, wobei 0% einer im Zellkern radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position entsprechen. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm b entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, welche eine Breite von $\Delta 10\%$ haben.

Gesamte Verteilungen v. Gesamte Verteilungen

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Zentral v. Zentral

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Peripher v. Peripher

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.16: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der schwerpunktbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte und der aufgeteilten Meßwerte untereinander verglichen (zentral-zentral, peripher-peripher). Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

Die Mittelwerte μ_{ges} , μ_{in} und μ_{out} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{in} und σ_{out} , die Distanz der Mittelwerte $\Delta\mu$, die skalierte absolute Standardabweichung σ und das Testergebnis des Vergleichs der aufgeteilten Verteilungen der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens sind in Tabelle 7.9 die der schwerpunktbasierten relativen radialen Position in Tabelle 7.10 zu sehen. Die Mittelwerte der gesamten Verteilungen der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens liegen zwischen 59% (Apikal) und 69% (Karzinom), die der Verteilungen der kleineren Meßwerte liegen zwischen 48% (Apikal) und 60% (Karzinom) und die Mittelwerte der Verteilung der größeren Meßwerte zwischen 69% (apikal) und 78% (Karzinom). Die Verteilung der aufgeteilten Meßwerte der Basalschicht kann signifikant von einer zufälligen Sortierung mit einer Differenz der Mittelwerte von 3% unterschieden werden. Die Standardabweichungen aller Verteilungen liegen in einem Bereich von 14% und 22%. Die Mittelwerte der gesamten Verteilungen der schwerpunktbasierten, relativen radialen Position liegen zwischen 59% und 61%, die der aufgeteilten Verteilungen zwischen 48% und 56% (kleinere Meßwerte) und 66% und 72% (größere Meßwerte).

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ_{ges}	[%]	59	65	63	69
σ_{ges}	[%]	± 21	± 19	± 21	± 22
μ_{in}	[%]	48	55	50	60
σ_{in}	[%]	± 18	± 18	± 18	± 22
μ_{out}	[%]	69	74	77	78
σ_{out}	[%]	± 19	± 15	± 14	± 18
$\Delta\mu$	[%]	21	19	27	18
σ	[%]	24	21	24	25
Testergebnis		negativ	negativ	positiv	negativ

Tabelle 7.9: Mittelwerte und Standardabweichungen der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und im Karzinomgewebe. Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% einer radial zentralen im Zellkerninneren und 100% einer radial peripheren Position an der Zellkernoberfläche entspricht. Die Zeile Testergebnis gibt das Resultat des Vergleichs zwischen den aufgeteilten Verteilungen wieder.

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ_{ges}	[%]	59	60	60	61
σ_{ges}	[%]	± 18	± 17	± 19	± 17
μ_{in}	[%]	56	51	48	50
σ_{in}	[%]	± 19	± 14	± 18	± 14
μ_{out}	[%]	66	69	71	72
σ_{out}	[%]	± 15	± 15	± 13	± 10
$\Delta\mu$	[%]	10	18	23	22
σ	[%]	20	19	22	19
Testergebnis		negativ	negativ	positiv	positiv

Tabelle 7.10: Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunktbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und im Karzinomgewebe. Die Werte sind in % angegeben, wobei 0% einer Position im Zellkerninneren und 100% der Zellkernoberfläche entspricht. Die Zeile Testergebnis gibt das Resultat des Vergleichs zwischen den aufgeteilten Verteilungen wieder.

Die Mittelwert der aufgeteilten Meßwerte des Basal- und Karzinomgewebes können mit einer Differenz 1% und 3% unterschieden werden. Die Standardabweichungen aller Verteilungen liegen in einem Bereich von 10% und 19%.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und die Häufigkeitsverteilung der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens sind in den Diagrammen der Abbildungen 7.18 und 7.19 zu sehen (Farben und Aufteilungen entsprechen den im vorigen Kapitel angegebenen). Die Verteilungen der schwerpunktbasierten, relativen radialen Positionen des BCL2 Gens sind in den Diagrammen der Abbildungen 7.21 und 7.22 zu sehen.

Die Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens sind über einen Bereich von 0% bis 100% verteilt, wie aus der Häufigkeitsverteilung ersichtlich ist (Diagramm **b** in Abbildung 7.19). Die Form der Verteilung des BCL2 Gens in der Basal- und Karzinomschicht ist ähnlich und die Maxima beider Verteilungen liegen bei einer Position von 70%. Die Tendenz, einer Verschiebung hin zu einer zentraleren radialen Position in der Intermediär- und Apikalschicht, ist deutlich zu sehen. Aus den normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen aller Gewebeschichten (Diagramm **a** in Abbildung 7.19) ergibt sich, dass mehr als 80% der Meßwerte im Intermediär-, Basal-, Karzinomgewebe und im Apikalgewebe 70% der Meßwerte >40% sind. Die aufgeteilten Meßwerte des Basalgewebes weisen deutlich den gefundenen signifikanten Unterschied auf, 87% der größeren Meßwerte (gestrichelte schwarze Linie) liegen bei einer relativen radialen Position >60% und 77% der Meßwerte der kleineren Meßwerte (durchgezogene schwarze Linie) liegen bei einer relativen Position <60% (Diagramm in Abbildung 7.18).

Die Häufigkeitsverteilungen der schwerpunktbasierten, relativen radialen Position haben für alle Verteilungen die Form einer bimodalen Verteilung mit einem Maximum bei 50% und 70% (Diagramm **b** in Abbildung 7.22). Die beiden Maxima konnten anhand der aufgeteilten Meßwerte für die Basal- und Karzinomschicht signifikant unterschieden werden. Mehr als 80% der Meßwerte in allen Gewebeschichten liegen bei einer radialen Position >30% und die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen haben einen fast vollständig gleichen Verlauf (Diagramm **a** in Abbildung 7.22). Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Basalschicht zeigen, dass 73% der größeren Meßwerte (gestrichelte schwarze Linie) eine radiale Position >60% und 82% der kleineren Meßwerte (durchgezogene schwarze Linie) eine radiale Position <70% einnehmen (Diagramm in Abbildung 7.21). In der Karzinomschicht gilt gleiches für 80% bzw. 82% der Meßwerte (Diagramm in Abbildung 7.22).

Die Resultate der KS-Tests der randbasierten und schwerpunktbasierten, relativen radialen Positionierung sind in den Diagrammen der Abbildung 7.20 und 7.23 dargestellt. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunktbasierten Positionierung konnten in keiner Gewebeschicht weder für die gesamten, noch für die sortierten Verteilungen unterschieden werden. Der KS-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der randbezogenen, relativen radialen Position der BCL2 Gene der gesamten und aufgeteilten Meßwerten (zentral-zentral, peripher-peripher) der Apikal- und Karzinomschicht, zwischen den kleineren Meßwerten der Basal- und Karzinomschicht (zentral-zentral) und zwischen den größeren Meßwerten der Basal- und Apikalschicht (peripher-peripher) auf.

Im Diagramm der Abbildung 7.17 sind die prozentualen Häufigkeiten der Differenzen zwischen den aus einer Messung der randbasierten und schwerpunktbasierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und den BCL2 Gene resultierenden Meßwerte aufgetragen. Es wurden die schwerpunktbasierten Meßwerte von den randbasierten Meßwerten des gleichen Chromosomenterritoriums subtrahiert und die prozentuale Häufigkeit berechnet.

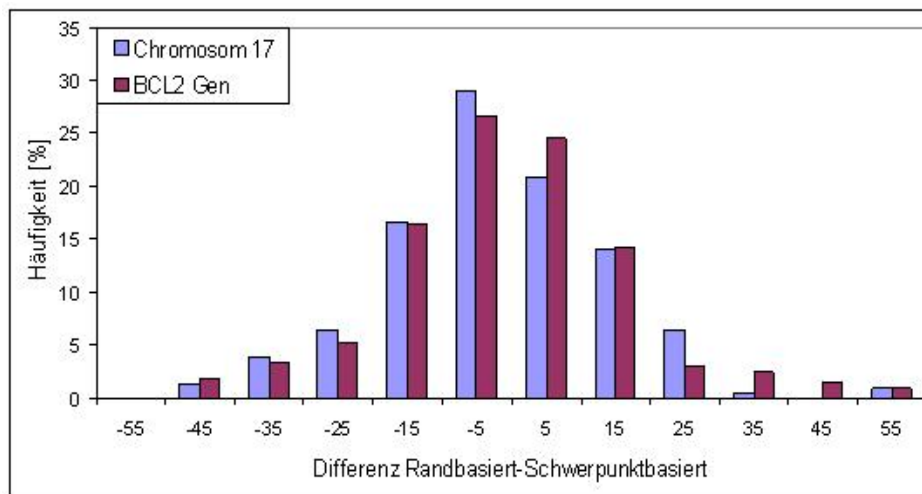


Abbildung 7.17: Das Diagramm zeigt die prozentuale Häufigkeit der Differenz zwischen der randbasierten und schwerpunktbasierenden, relativen radialen Position des gleichen Chromosomenterritoriums 18 und des gleichen BCL2 Gens. Es wurden die schwerpunktbasierenden Meßwerte von den randbasierten Meßwerten des gleichen Chromosomenterritoriums bzw. Gens subtrahiert und die prozentuale Häufigkeit berechnet. Die Abszisse zeigt die Mittelwerte der Häufigkeitsklassen der Differenz der relativen radialen Positionen in %, welche einem Intervall von $\Delta 10\%$ entsprechen, und die Ordinate die Häufigkeit in %.

Der prozentuale Anteil an Meßwerten des Chromosomenterritoriums 18 bzw. BCL2 Gens, welche eine Differenz $<10\%$ zwischen den beiden Methoden ergibt, beträgt 50% bzw. 51% . Der Anteil an Meßwerten, welchen die randbasierte Messung relative radiale Positionen $<10\%$ ergibt, beträgt 28% (Chromosom 18) und 27% (BCL2) und der Anteil an Meßwerten, bei welchen die schwerpunktbasierende Messung größere relative radiale Positionen ergab, beträgt 22% (Chromosom 18) und 22% (BCL2). Insgesamt stimmen 50% der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 und 49% der Meßwerte der BCL2 Gene nicht überein. Dieser Anteil an Meßwerten mit hoher Differenz zwischen den Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Genen des gleichen Zellkernes, bei gleichen Randbedingungen, zeigt auf, weshalb sich unterschiedlich signifikante relative radiale Positionen ergeben.

Zusammenfassung der Ergebnisse der relativen radialen Position des BCL2 Gens

1. Die Mittelwerte der randbasierten, relativen radialen Positionen des BCL2 Gens lag bei 59% (apikales Gewebe), 65% (intermediäres Gewebe), 63% (basales Gewebe) und 69% (Karzinomgewebe).
2. Die Mittelwerte der schwerpunktbasierten relativen radialen Positionen des BCL2 Gens lagen bei 59% (apikales Gewebe), 60% (intermediäres Gewebe), 60% (basales Gewebe) und 61% (Karzinomgewebe).
3. Die aufgeteilten Meßwerte der randbezogenen Positionierung des BCL2 Gens in Basalgewebe sind unterschiedlich. Die radialen Positionen der beiden BCL2 Gene in Basalgewebe liegen somit bei 50% und 77% .
4. Die aufgeteilten Meßwerte der schwerpunktbasierten Positionierung des BCL2 Gens in Basal- und Karzinomgewebe sind unterschiedlich. Die radialen Positionen der beiden BCL2 Gene liegen somit bei 48% bzw. 50% und 71% und 72% .

5. Die KS-Tests der randbezogenen Positionierung zeigten Unterschiede zwischen Apikal- und Basalschicht (peripher-peripher), Apikal- und Karzinomschicht (alle Verteilungen) und Basal- und Karzinomschicht (zentral-zentral). Demnach liegen beide BCL2 Gene im apikalen Gewebe radial weiter innen als die des Karzinomgewebes, das radial äußere BCL2 Gen der Basalschicht signifikant radial weiter außen als das Apikale und das radial innere BCL2 Gen der Basalschicht weiter innen als das des Karzinomgewebes.
6. Die radiale Position nimmt bei beiden Meßmethoden vom Apikalgewebe, über das Intermediäregewebe hin zum Basalgewebe zu. Im Karzinomgewebe ist die radiale Position am größten.

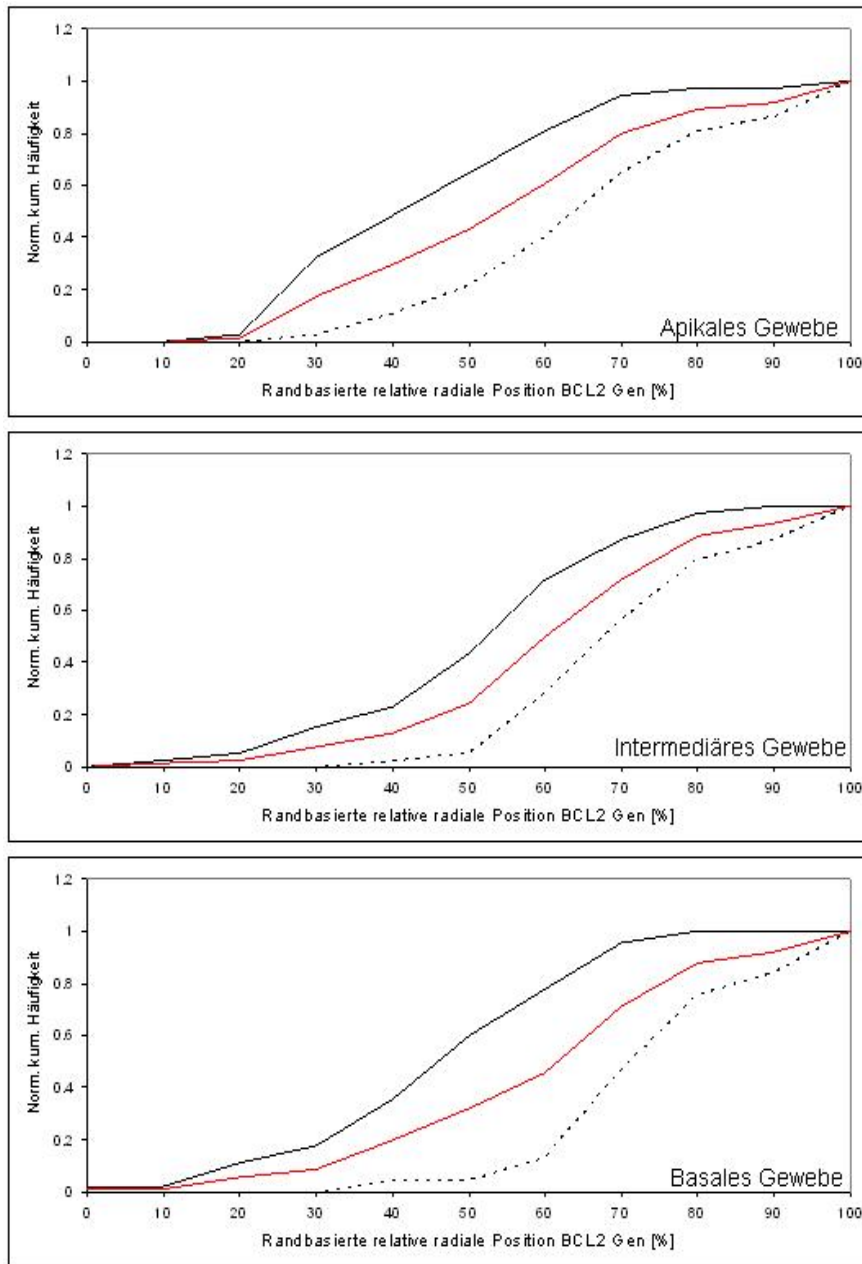


Abbildung 7.18: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden BCL2 Gene, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden BCL2 Gene. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Auftragung der Abszisse gibt den invertierten relativen radialen Abstand der BCL2 Gene zum Zellkernrand in % an. 0% entsprechen einer radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position im Zellkern. Die Ordinate entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

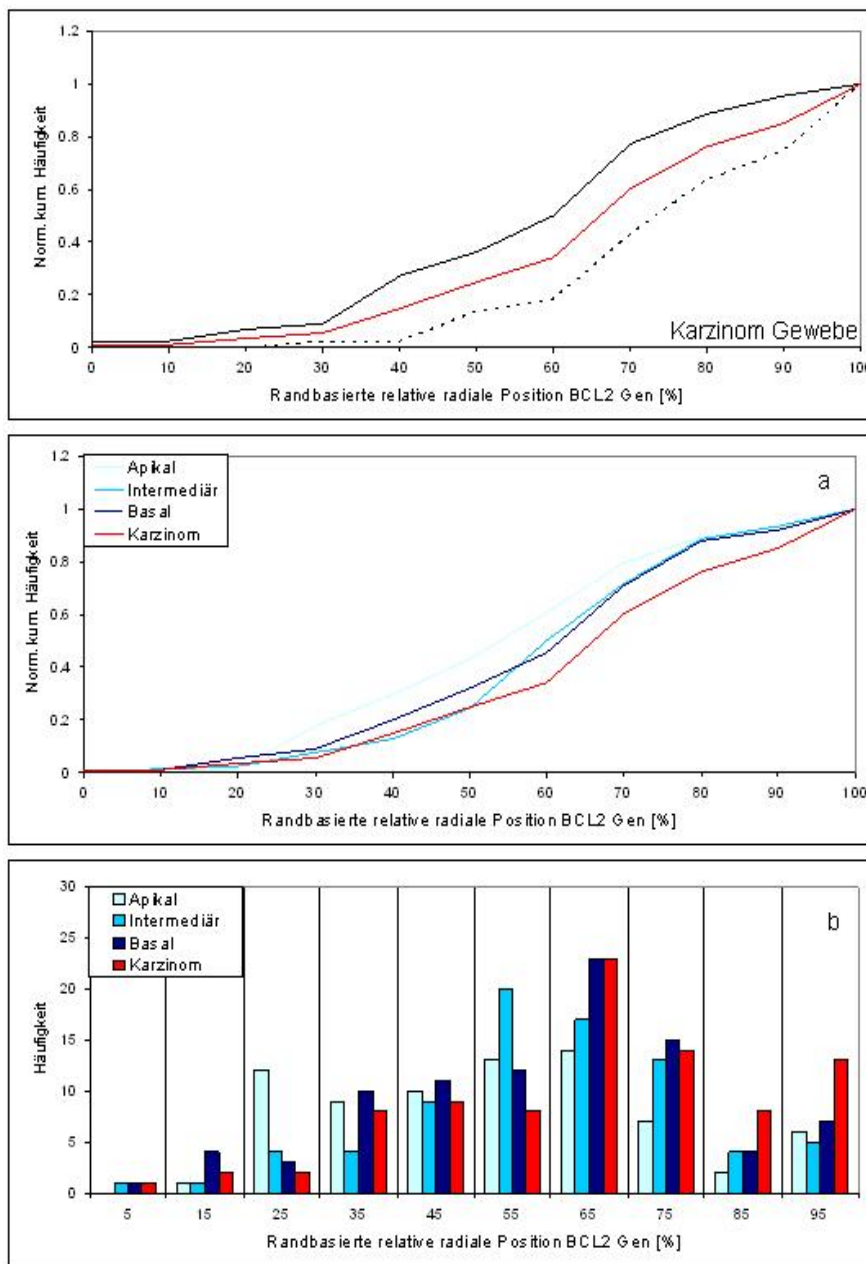


Abbildung 7.19: Das obere Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden BCL2 Gene, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden BCL2 Gene. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen aller untersuchten Cervix-Gewebeschnitten. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm a gibt den invertierten relativen radialen Abstand der BCL2 Gene zum Zellkernrand in % an, wobei 0% einer im Zellkern radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position entsprechen. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm b entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, welche eine Breite von $\Delta 10\%$ haben.

Gesamte Verteilungen v. Gesamte Verteilungen

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Zentral v. Zentral

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Peripher v. Peripher

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.0001$

Abbildung 7.20: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte und der aufgeteilten Meßwerte untereinander verglichen (zentral-zentral, peripher-peripher). Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

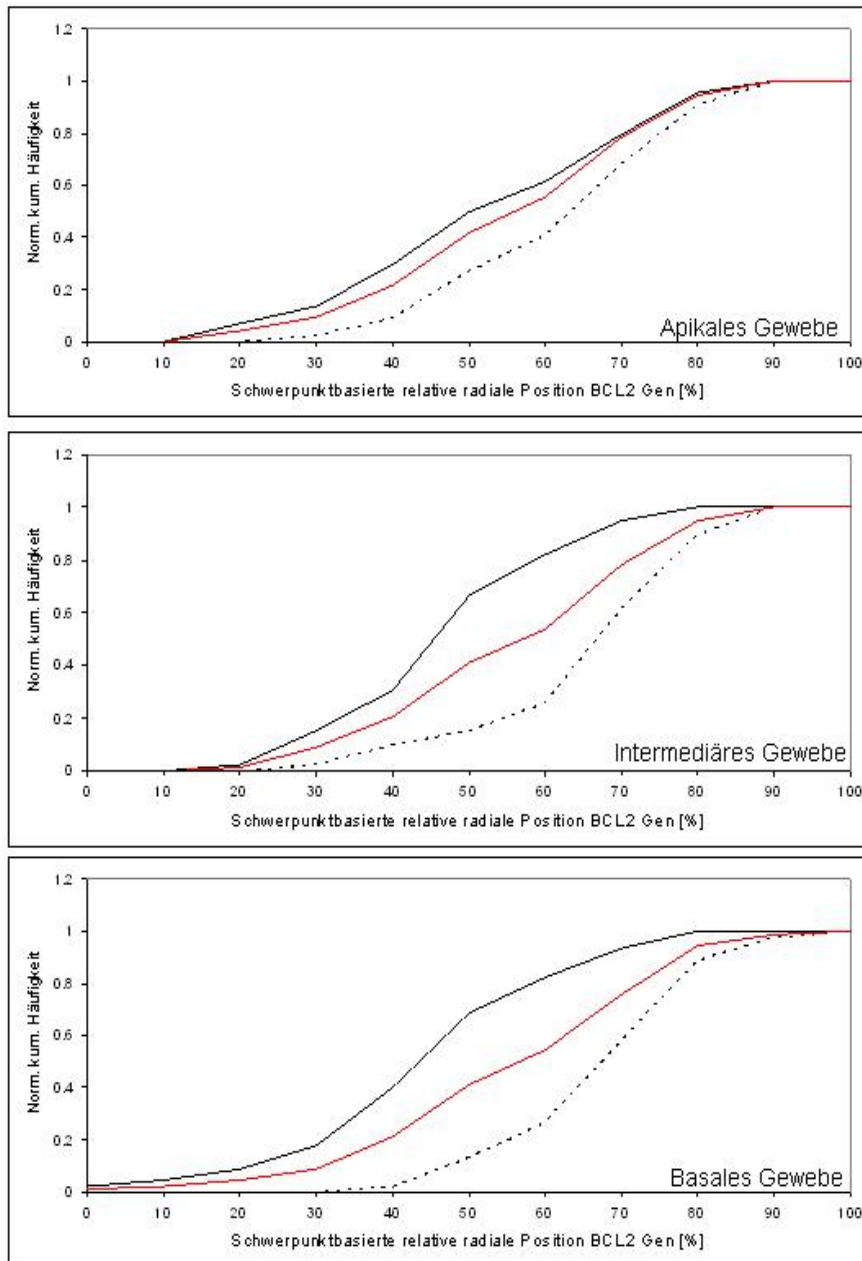


Abbildung 7.21: Die Diagramme zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden BCL2 Gene, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden BCL2 Gene. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Auftragung der Abszisse gibt den relativen radialen Abstand der BCL2 Gene vom Schwerpunkt des Zellkerns in % an. 0% entsprechen einer radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position im Zellkern. Die Ordinate entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung.

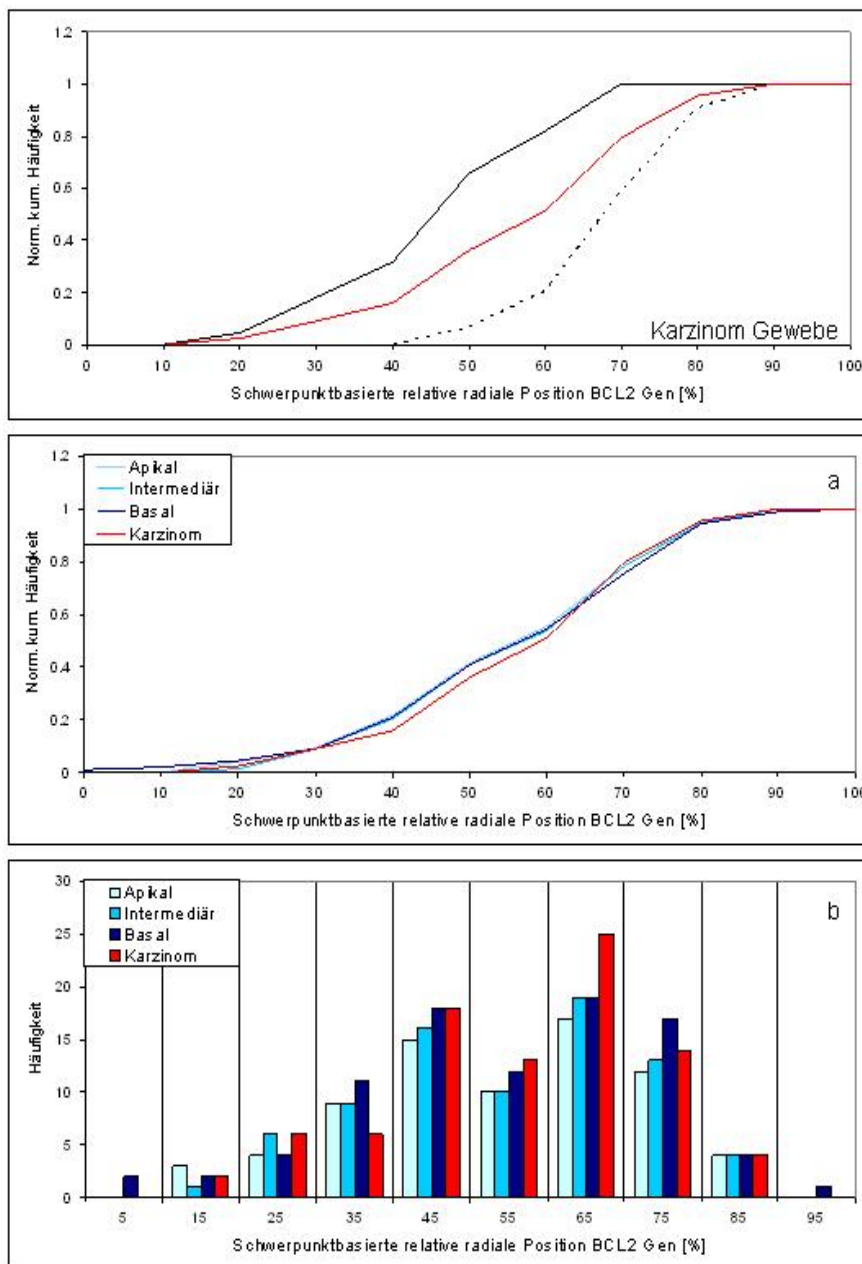


Abbildung 7.22: Das obere Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes. Die durchgezogene schwarze Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial zentraler liegenden BCL2 Gene, die schwarze gestrichelte Linie der Verteilung der Meßwerte der im Zellkern radial peripherer liegenden BCL2 Gene. Die rote Linie entspricht der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der gesamten Meßwerte. Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen aller untersuchten Cervix-Gewebeschnitten. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm a gibt den relativen radialen Abstand der BCL2 Gene vom Schwerpunkt des Zellkerns in % an, wobei 0% einer im Zellkern radial zentralen Position und 100% einer radial peripheren Position entsprechen. Die Auftragung der Abszisse von Diagramm b entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, welche eine Breite von $\Delta 10\%$ haben.

Gesamte Verteilungen v. Gesamte Verteilungen

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Zentral v. Zentral

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Peripher v. Peripher

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.23: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der schwerpunktbasier-ten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte und der aufgeteilten Meßwerte untereinander verglichen (zentral-zentral, peripher-peripher). Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

7.2.3 Absolute und normierte Distanzen und Schwerpunktwinkel zwischen den BCL2 Genen und den Chromosomenterritorien 18

Die absoluten und normierten Distanzen wurden mit dem in Kapitel 5 beschriebenen Algorithmus vermessen. Die absoluten Distanzen ergeben sich aus der euklidischen Distanz der Intensitätsschwerpunkte und sind in nm angegeben. Die normierten Distanzen entsprechen den Distanzen innerhalb einer Einheitskugel mit dem Radius $R = 1$ und sind in Einheitskugelradien angegeben. Die angegebenen Schwerpunktwinkel entsprechen den Schwerpunktwinkeln und sind in Grad angegeben. Die Mittelwerte μ und Standardabweichungen σ der Distanzen und Schwerpunktwinkel zwischen den BCL2 Genen und zwischen den Chromosomenterritorien 18 sind in den Tabelle 7.11 und 7.12 angegeben. Die Mittelwerte der absoluten Distanzen zwischen den BCL2 Genen liegen alle in einem Bereich von 3.27 bis 3.89 μm , die Standardabweichungen zwischen 1.51 und 1.79 μm . Die Mittelwerte der normierten Distanzen liegen zwischen 0.83 und 1 Einheitskugelradien mit Standardabweichungen von 0.32 bis 0.37 Einheitskugelradien. Die Schwerpunktwinkel weisen einen Mittelwert zwischen 84° und 110° auf, mit Standardabweichungen von 43° bis 47°.

Für die absoluten Distanzen zwischen den Chromosomenterritorien 18 ergeben sich Mittelwerte von 3.77 bis 4.27 μm und Standardabweichungen von 1.20 bis 1.49 μm . Die Mittelwerte

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ abs. Dist.	[μm]	3.65	3.27	3.82	3.89
σ abs. Dist.	[μm]	± 1.79	± 1.62	± 1.58	± 1.51
μ norm. Dist.	[Einheitskugelradien]	0.88	0.83	1	0.97
σ norm. Dist.	[Einheitskugelradien]	± 0.37	± 0.36	± 0.33	± 0.32
μ Schwerp.-winkel	[°]	97	84	110	100
σ Schwerp.-winkel	[°]	± 43	± 47	± 45	± 44

Tabelle 7.11: Mittelwerte und Standardabweichungen der normierten und absoluten Distanzen und der Schwerpunktwinkel zwischen den BCL2 Genen in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und in Karzinomgewebe. Die absoluten Distanzen sind in μm , die normierten Distanzen in Einheitskugelradien und die Schwerpunktwinkel in Grad angegeben.

Gewebe	Einheit	Apikal	Intermed.	Basal	Karzinom
μ abs. Dist.	[μm]	3.89	3.77	3.99	4.27
σ abs. Dist.	[μm]	± 1.37	± 1.20	± 1.42	± 1.49
μ norm. Dist.	[Einheitskugelradien]	0.95	0.95	1.05	1.06
σ norm. Dist.	[Einheitskugelradien]	± 0.31	± 0.28	± 0.33	± 0.31
μ Schwerp.-winkel	[°]	102	94	113	109
σ Schwerp.-winkel	[°]	± 35	± 42	± 42	± 42

Tabelle 7.12: Mittelwerte und Standardabweichungen der normierten und absoluten Distanzen und der Schwerpunktwinkel zwischen den Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, basalen und intermediären Gewebeschicht und in Karzinomgewebe. Die absoluten Distanzen sind in μm , die normierten Distanzen in Einheitskugelradien und die Schwerpunktwinkel in Grad angegeben.

der normierten Distanzen liegen in einem Bereich von 0.95 bis 1.06 Einheitskugelradien mit Standardabweichungen von 0.28 bis 0.33 Einheitskugelradien. Die Mittelwerte der Schwerpunktswinkel liegen zwischen 94° und 113° und Standardabweichungen von 35° bis 42° . Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der Chromosomenterritorien 18 in den Diagrammen der Abbildung 7.24, die der BCL2 Gene sind in der Abbildung 7.25 zu sehen. Aus der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung der absoluten Distanzen zwischen den BCL2 Genen ergibt sich, dass diese in einem Bereich von 1.00 bis $9.00 \mu m$ streuen. In 75-80% der Zellkernen liegt die absolute Distanz zwischen den beiden BCL2 Genen zwischen $3.00 \mu m$ und $8.00 \mu m$ und der Verlauf in allen Gewebeschichten ähnlich ist. Die Meßwerte der normierten Distanzen liegen in allen Gewebeschichten in einem Bereich von 0.20 bis 1.80 Einheitskugelradien und 81-91% der Meßwerte befindet sich in einem Bereich von 0.60 bis 1.40 Einheitskugelradien. Die Schwerpunktswinkel zeigen einen annähernd linearen Verlauf in einem Bereich von 0 bis 180° , wobei sich 100% der Meßwerte aller Gewebeschichten zwischen 36° und 180° befinden. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Parameter zeigen bzgl. der Chromosomenterritorien 18 ein analoges Verhalten. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der absoluten, normierten Distanzen und der Schwerpunktswinkel der Chromosomenterritorien 18 und der BCL2 Gene sind in Zellkernen der Apikal- und Intermediärschichten nicht signifikant zu kleineren Werten hin verschoben. Die KS-Tests wurden, da alle keine signifikanten Unterschiede aufweisen in Abbildung 7.26 zusammengefaßt. Weder die absoluten und normierten Distanzen, noch die Schwerpunktswinkel zwischen den BCL2 Genen und den Chromosomenterritorien 18 können unterschieden werden.

Zusammenfassung der Resultate

1. Die Mittelwerte werden wie in den obigen Tabellen angenommen.
2. Es konnten für alle Parameter keine Unterschiede zwischen den normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der unterschiedlichen Gewebeschichten nachgewiesen werden.

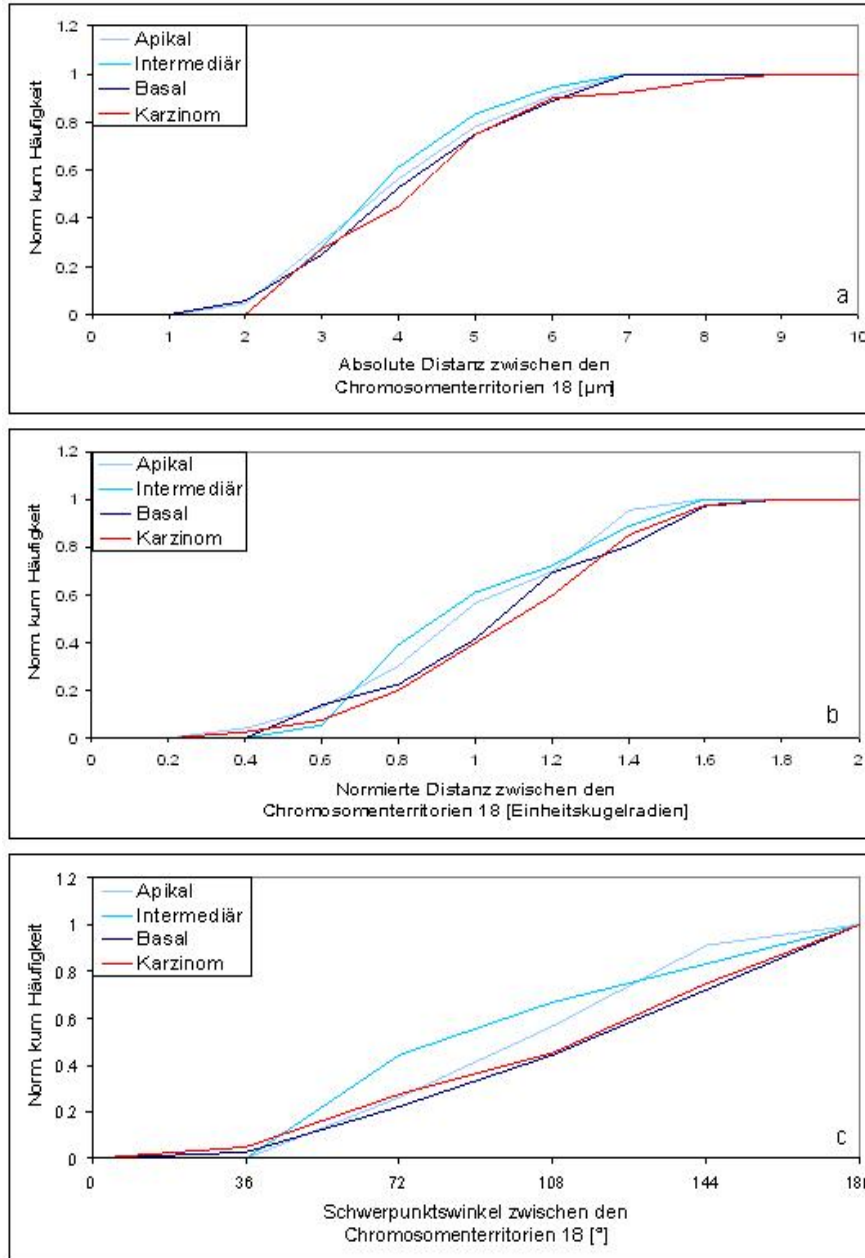


Abbildung 7.24: Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten und normierten Distanzen zwischen den Chromosomenterritorien 18 in Apikal-, Intermediär-, Basal- und Karzinomgewebe. Das Diagramm c zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Schwerpunktswinkel zwischen den Chromosomenterritorien in den gleichen Gewebeschichten. Die Ordinate entspricht in allen Diagrammen der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung. Die Abszisse in a gibt die absoluten Distanzen (in μm), in b die normierten Distanzen innerhalb einer Einheitskugel (in Einheitskugelradien) und in c die Schwerpunktswinkel (in Grad) wieder.

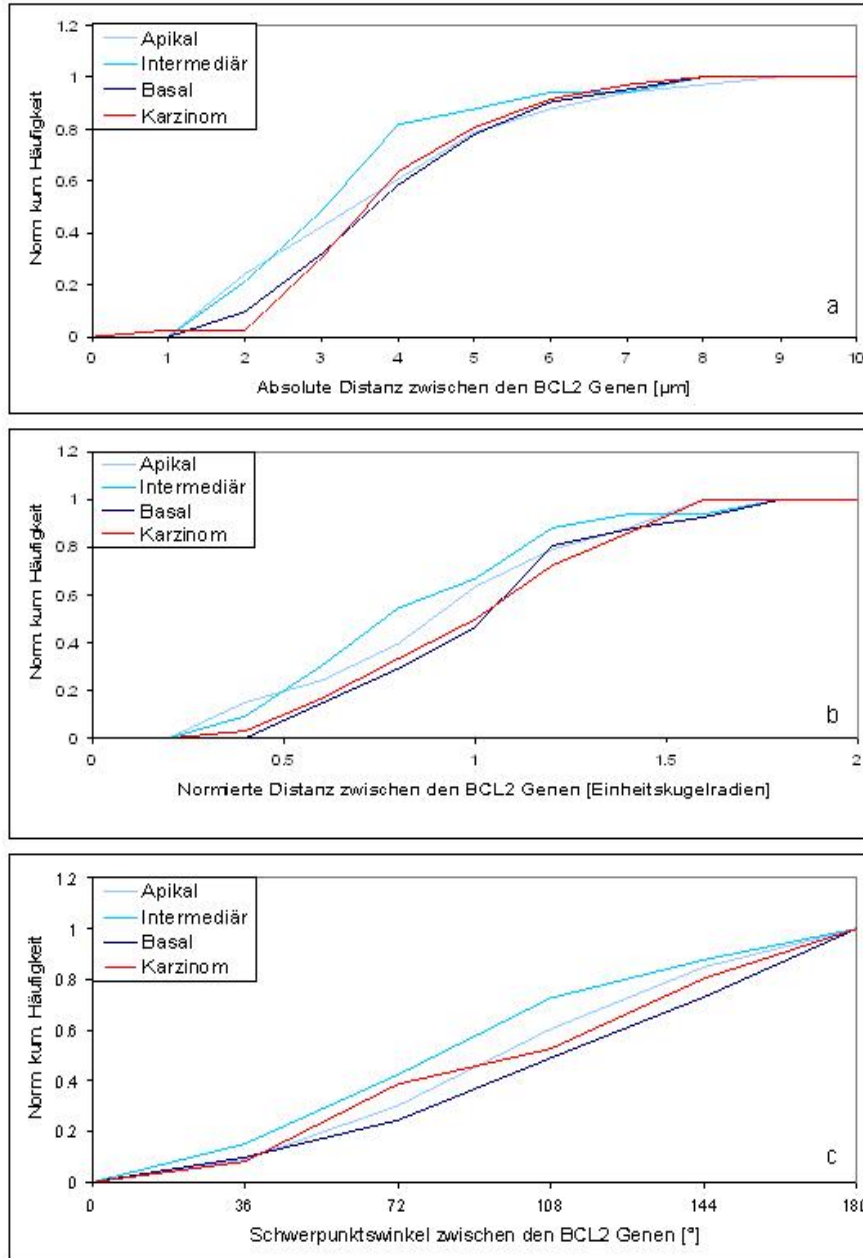


Abbildung 7.25: Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der absoluten und normierten Distanzen zwischen den beiden BCL2 Genen in Apikal-, Intermediär-, Basal- und Karzinomgewebe. Das Diagramm c zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Schwerpunktswinkel zwischen den BCL2 Genen in den gleichen Gewebeschnitten. Die Ordinate entspricht in allen Diagrammen der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung. Die Abszisse in a gibt die absoluten Distanzen (in μm), in b die normierten Distanzen innerhalb einer Einheitskugel (in Einheitskugelradien) und in c die Schwerpunktswinkel (in Grad) wieder.

Absolute Distanzen der Chromosomterritorien 18 und BCL2 Gene

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Normierte Distanzen der Chromosomterritorien 18 und BCL2 Gene

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Winkel der Chromosomterritorien 18 und BCL2 Gene

Gewebeschicht	Apikal	Intermediär	Basal	Karzinom
Apikal	x			
Intermed.		x		
Basal			x	
Karzinom				x

Signifikanzniveau

x	=	nicht getestet
	=	nicht signifikant
	=	signifikant $p < 0.05$
	=	signifikant $p < 0.001$
	=	signifikant $p < 0.00001$

Abbildung 7.26: Die Tabellen zeigen die Resultate der statistischen Untersuchung der absoluten und normierten Distanzen und der Schwerpunktswinkel zwischen den BCL2 Genen und zwischen den Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test. Es wurden die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der gesamten Meßwerte aller Gewebeschichten miteinander verglichen. Die Signifikanzniveaus sind in der unteren Tabelle zu sehen. Kein signifikanter Unterschied bedeutet, dass die beiden Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen (Nullhypothese), ein signifikanter Unterschied, dass die beiden Stichproben mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p <$ aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen (Alternativhypothese).

7.2.4 Topologisches Modell

Die biologische Interpretation der Meßwerte und statistischen Ergebnisse resultiert in zwei topologischen Modellen für die BCL2 Gene und Chromosomenterritorien 18 im Cervix-Gewebe. Ein Modell ergibt sich aus der Messung der randbasierten und eines aus der Messung der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene und der Chromosomenterritorien 18.

Das schwerpunkt-basierte Modell ist in Abbildung 7.27 zu sehen. Die Position der homologen Chromosomenterritorien 18 bzw. der beiden BCL2 Gene sind in Basal- und Karzinomgewebe unterschiedlich lokalisiert, relativ radial zwischen 51-55% bzw. 48-50% und 72-75% bzw. 71-72%, die Schwerpunktswinkel und normierten Distanzen liegen bei ca. 109-113° bzw. 100-110° und 1.05-1.06 bzw. 0.97-1.00 Einheitkugelradien. Im Apikal- und Intermediärgewebe liegen beide Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene bei 58% und 62% bzw. 59% und 60%, die Schwerpunktswinkel zwischen den Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Genen bei 94° und 102° bzw. 84° und 97° und die normierten Distanzen 0.95 bzw. 0.83-0.88 Einheitkugelradien. In 75-80% der Fälle liegen beiden BCL2 Gene in allen Gewebeschichten an der Peripherie des Chromosomenterritoriums 18, die Intensitätsschwerpunkte jedoch innerhalb. Da Cervix-Gewebe ein Plattenepithel ist und die vorliegenden Gewebeschichten den Differenzierungsweg der Epithelzellen vom Basalgewebe über das Intermediärgewebe ins Apikalgewebe beschreiben, ist das Modell in diesem Zusammenhang zu deuten. Im Basalgewebe ist die relative radiale Position der Chromosomenterritorien auf zwei radiale Positionen aufgeteilt, eine radial zentral, eine radial peripher. Während der Differenzierung gleicht sich die relative radiale Position der beiden Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene an und beide nehmen eine gleiche radiale Position ein, ohne dass sich die Distanzen und Schwerpunktswinkel ändern. Im Cervix-Karzinomgewebe gleicht sich die Topologie wieder der des Basalgewebes an.

Die randbasierte relative radiale Positionierung, welche eine Verfeinerung der schwerpunkt-basierten Methode ist, wurde entwickelt, wie aus der Einleitung deutlich wird, um auf flache und unförmige Zellkerne angewendet zu werden. Anhand von Abbildung 7.28 wird deutlich, dass die Zellkernformen im apikalen und basalen Gewebe flach und ellipsoid und im Karzinomgewebe unförmig sind.

Das zweite Modell, welches Unterschiede zum ersten Modell aufzeigt, gibt die Topologie in Bezug auf den Zellkernrand wieder. Die relative radiale Position der beiden Chromosomenterritorien 18 entspricht in Basalgewebe 66% und in Intermediär- und Apikalgewebe 64 bzw. 59%. Die beiden BCL2 Gene liegen im Basalgewebe bei 50% und 77% und ändern ihre radiale Position, während der Differenzierung, sodass beide BCL2 Gene und die homologen Chromosomenterritorien 18 im Intermediärgewebe radial bei 65% und im Apikalgewebe bei 59% liegen, wobei im Apikalgewebe die zentralste relative radiale Position eingenommen werden. Im Karzinomgewebe ändert sich die relative radiale Position der beiden Chromosomenterritorien 18 und der beiden BCL2 Gene zu einer radialen Position von 69%. Die Schwerpunktswinkel und normierten Distanzen stimmen mit denen des ersten Modells überein. Ein Schema dieses Modells ist in Abbildung 7.29 zu sehen. Die Lage der BCL2 Gene relativ zur Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 wird, unabhängig von transkriptioneller Aktivität, Differenzierungsstadium und Gewebeschicht, als peripher relativ zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 beschrieben. Nur in 25% der untersuchten Zellkern im Karzinomgewebe und in 20% der Zellkern in den anderen drei Gewebeschichten befand sich eines der beiden BCL2 Gene peripher und außerhalb.

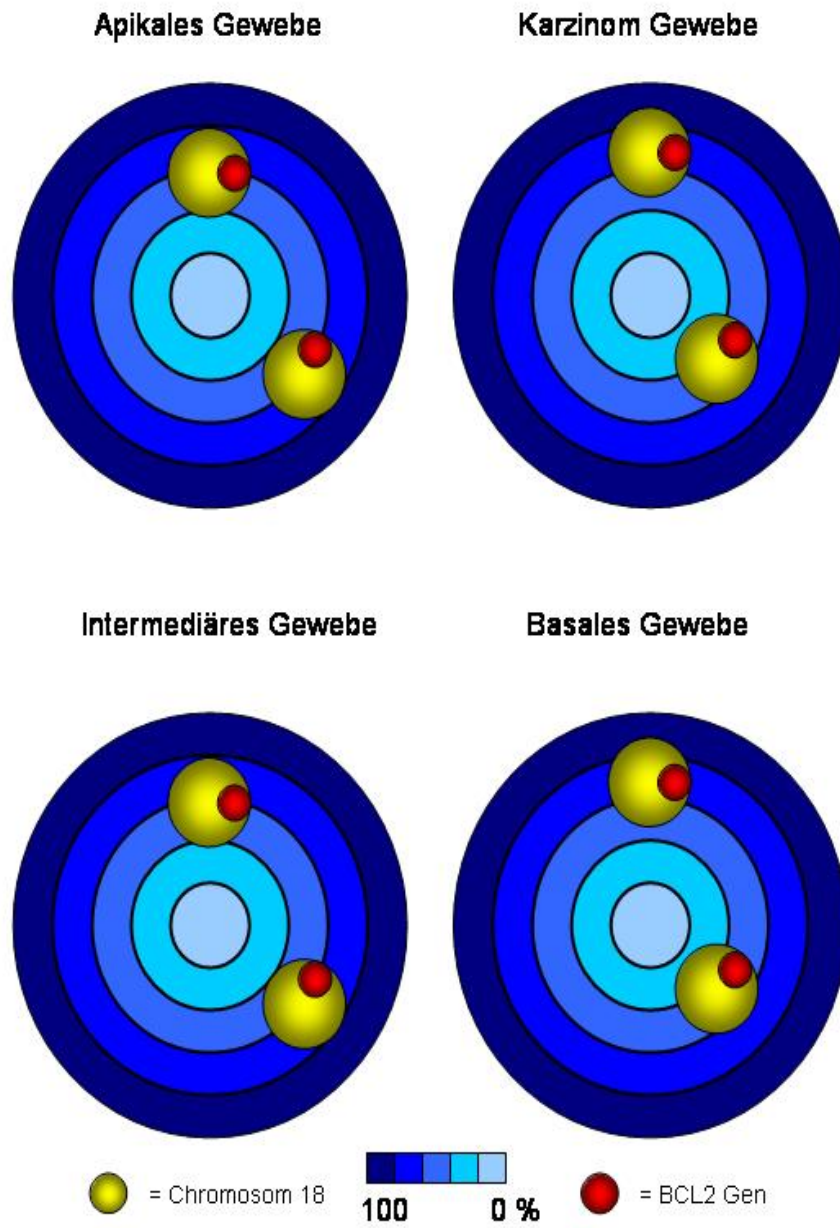


Abbildung 7.27: Die Abbildung zeigt ein vollständiges topologisches Modell der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene in Zellkernen des normalen Cervix-Gewebe und Cervix-Karzinom-Gewebe, auf der Basis der schwerpunktbasierten relativen radialen Positionierung.

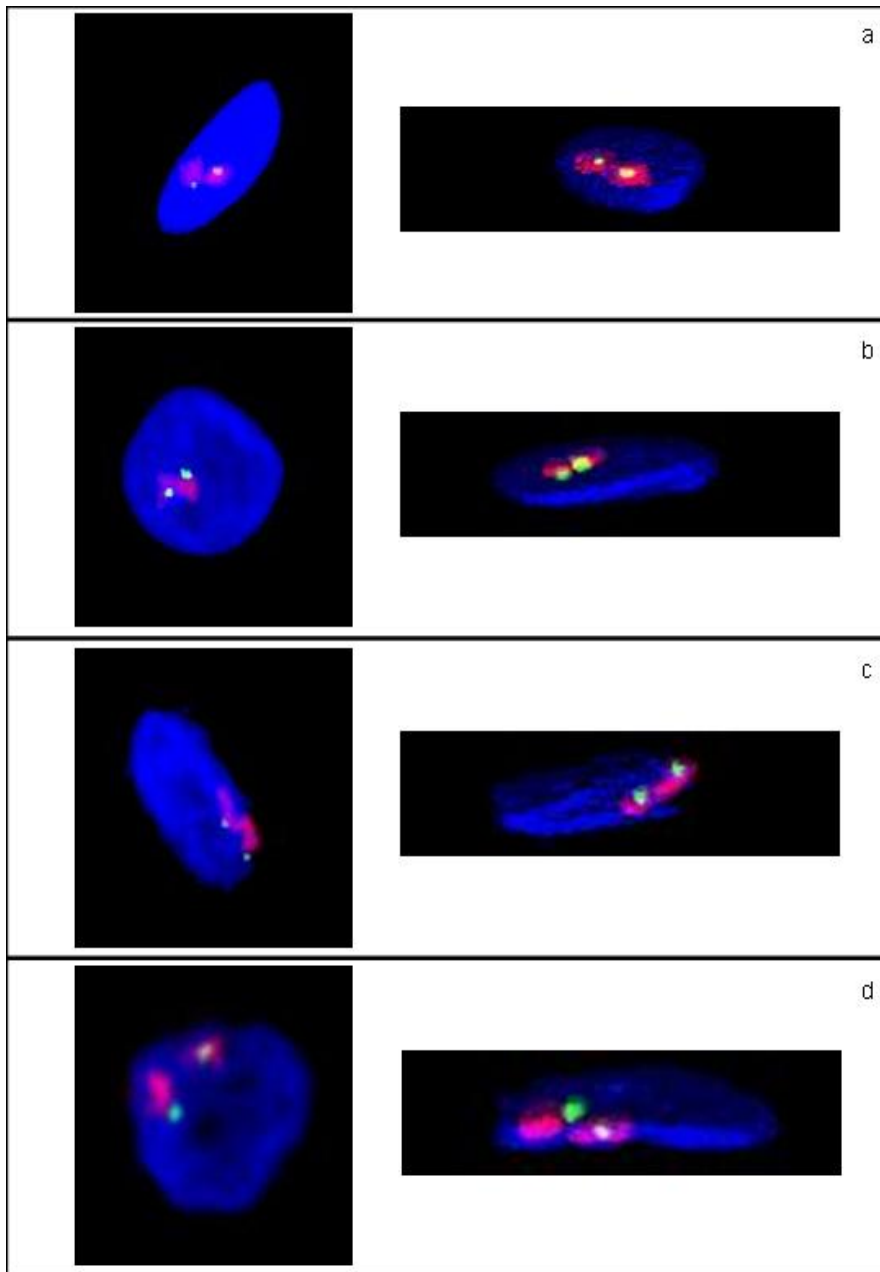


Abbildung 7.28: 2D Projektionen (links) und 3D Rekonstruktionen (rechts) von Zellkernen, Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Genen des Cervix-Gewebes. Abbildung a zeigt einen Zellkern der Apikalschicht, Abbildung b der Intermedärschicht, Abbildung c der Basalschicht und Abbildung d des Cervix-Karzinoms. Zum Vergleich siehe auch Abbildung 8.1

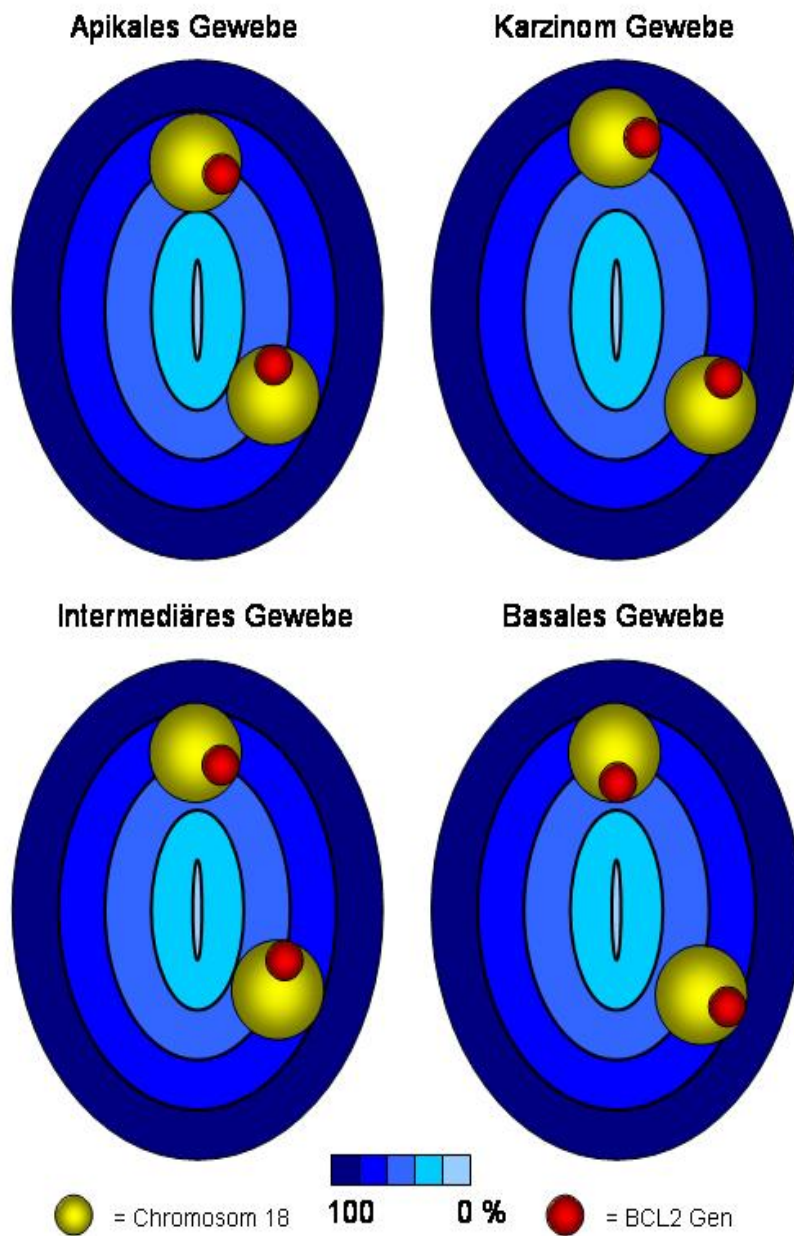


Abbildung 7.29: Die Abbildung zeigt ein vollständiges topologisches Modell der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene in Zellkernen des normalen Cervix-Gewebes und Cervix-Karzinom-Gewebes, auf der Basis der randbasierten, relativen radialen Positionierung.

7.3 Quantitative Bildanalyse des SNRPN-Gens

Die in den Kapiteln 4.4 und 5.4 vorgestellte Methode der Volumenmessung der Fluorophorverteilung von mittels FISH markierten Chromatinregionen in der Größenordnung der Auflösungsgrenze wurde in zwei Experimenten auf das SNRPN-Gen angewendet. Das SNRPN Gen liegt in der Prader-Willi-Syndrom-Region (=PWSR), in welcher eines der Gene (paternal) exprimiert und das andere Gen (maternal) nicht exprimiert wird, sodass, sollten Kondensationsunterschiede in der untersuchten Größenordnung vorhanden sein, diese zugeordnet werden können.

Die verwendeten Zellen sind primäre T-Lymphozyten (erstes Experiment), in welchen das paternale und maternale Gen nicht anhand einer Fluoreszenzmarkierung unterschieden wurde, und Lymphoblastoiden LB-5 Zellen (zweites Experiment), in welchen das paternale und maternale Gen unterschieden wurde. In beiden Experimenten wurde die Zellen Paraformaldehyd (=PFA) fixiert sind und deren Gene mittels Standard-FISH markiert. Die im ersten Experiment verwendete DNA-Sonde ist eine kommerzielle SNRPN-Probe (Qbiogen) von 200 kBp Länge und einem Farbstoff mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Im zweiten Experiment wurde eine 159 kBp lange DNA-BAC-Sonde (AC009696) verwendet, welche an das SNRPN Gen bindet, und mit einem FITC-Fluoreszenzfarbstoff markiert war². Die Aufnahmen des ersten Experiments (Leica TCS NT SP1, Universität Heidelberg) erfolgten mit einem PlanApo 63x/NA 1.4 Ölobjektiv, 0.77 Pinhole und einer Voxelgröße von 78 nm lateral und 203 nm axial. Es wurden dreidimensionale Bildstapel mit einer Bildtiefe von 8 Bit mit einer laterale Bildgröße von 512x512 Pixeln aufgenommen. Die Anregungswellenlänge entsprach 488 nm (Argon Krypton Laser), das emittierte Fluoreszenzlicht wurde mit einem Blockfilter in einem Bereich von 530 ± 15 selektiert und einem Photomultiplier detektiert. Die Aufnahmen des zweiten Experiments erfolgten ebenfalls an einem CLSM (Zeiss LSM 410, LMU) mit einem PlanApo100x/NA 1.4 Ölobjektiv, 1.0 Pinhole und einer Voxelgröße von 36 nm (lateral) und 284 nm axial. Die laterale Bildgröße entsprach 512x512 Pixeln, wobei dreidimensionale Bildstapel mit einer Bildtiefe von 8 Bit aufgenommen wurden. Die Anregungswellenlänge entsprach 488 nm (Argon Krypton Laser), die Emissionswellenlänge 520 nm, welche mit einem Blockfilter selektiert und Photomultiplier detektiert wurde.

Die Halbwertsbreiten PSF wurden anhand von 100 nm Beads (Anregungswellenlänge 488 nm) berechnet, welche in Vectashield eingebettet auf den Objektträger präpariert waren. Die Detektion der Beads erfolgte mit den gleichen Parametern, mit welchen die SNRPN Genregion detektiert wurde.

Zur quantitativen Bildanalyse wurden die dreidimensionalen Bildstapel in das KDF-Format konvertiert und die Signale mit einem Binomialfilter verstärkt. Die Zellkerne wurden mit einem 3x1x1 und 1x3x1 und die SNRPN Signale mit einem 5x1x1 und 1x5x1 Binomialfilter bearbeitet. Auf die Zellkernen wurden das Isodataverfahren angewendet, um Hintergrund und Rauschen zu reduzieren. Die Signale der Gene und Beads wurden mit dem entwickelten Tophatfilter selektiert und segmentiert (siehe Kapitel 5.1.5). Die Halbwertsbreite der PSF und die Ellipsoid- und Kugelvolumina und die Kompaktierung der SNRPN Gene wurde anhand der in den Kapiteln 4.4 und 5.4 beschriebenen Algorithmen und Methoden berechnet. Die Anpassung der zweidimensionalen Gaußfunktion erfolgte an die **Rohdaten**, wobei die Startkonfiguration anhand der mittels Tophatfilter segmentierten Regionen erfolgte. Die Berechnung

²Der biologischen Teil, d.h. die Präparation und die FISH, sowie die Aufnahmen wurden von Y.Weiland (Universität Heidelberg) und K.Teller (LMU München) ausgeführt und die Aufnahmen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

der randbasierten, relativen radialen Positionen erfolgt mit dem in den Kapitel 5.3 beschriebenen Methoden.

Die beiden Experimente, an welchen die quantitative Bildanalyse des SNRPN Gens durchgeführt wurde, können wie folgt charakterisiert werden:

1.Experiment

1. Die laterale und axiale PSF des CLSM wurde an 311 Beads mit einer Größe von 100 nm gemessen.
2. Die verwendete DNA-Sonde ist 200 kBp lang.
3. Das paternale und maternale Gen konnten nicht unterschieden werden.
4. Es wurden 102 Gene in 51 Zellen untersucht.
5. Es wurde das Ellipsoidvolumen, das Kugelvolumen und die Kompaktierung gemessen.
6. Es wurde die randbasierte relativen radialen Positionen gemessen.
7. Die Meßwerte wurden, analog der im Kapitel 7.2 erklärten Methoden, sortiert und statistisch untersucht.

2.Experiment

1. Da keine PSF-Messung vorlagen, wurde die axiale und laterale PSF des ersten Experiments verwendet.
2. Die verwendete DNA-Sonde ist 159 kBp lang.
3. Das paternale und maternale Gen konnten unterschieden werden.
4. Es wurden 36 Gene in 18 Zellen untersucht.
5. Es wurde das Ellipsoidvolumen, das Kugelvolumen und die Kompaktierung gemessen.
6. Es wurde das Volumen vermessen, nachdem ein interaktiver Schwellwert festgelegt worden war³

Die Ergebnisse des ersten Experiments, die PSF-, Kugelvolumen-, Ellipsoidvolumen- und Kompaktierungsmessung, werden im Kapitel 7.3.1 und, die schwerpunktbasierten und randbasierten, relativen radialen Positionierungsmessungen, im Kapitel 7.3.2 vorgestellt. Die Resultate des zweiten Experiments werden im Kapitel 7.3.3 dargelegt. Eine Vergleich der beiden Experimente erfolgt im Kapitel 7.3.4.

³Schwellwerte von K.Teller festgelegt

7.3.1 Messung des Volumens und der Kompaktierung des SNRPN Gens(1. Experiment)

Die Messung der lateralen und axialen PSF erfolgte an Beads, welche eine Größe von 100 nm haben, und in Vectashield (Vector Labs, USA) eingebettet auf den Objektträger präpariert wurden. Die Detektion und Segmentierung der Beads erfolgte mit dem Tophatfilter-Algorithmus. Es konnten 311 von 319 Beads mit einer Einstellung von $r=0.5$ detektiert und segmentiert werden, sodass sich eine Effizienz von 97.5% ergibt. An die detektierten Beads wurden anschließend in x-y-Richtung, x-z-Richtung und y-z-Richtung eine zweidimensionale Gaußfunktion angepaßt, aus deren Standardabweichung die PSF-Halbwertsbreite der jeweiligen Raumrichtung berechnet wurde (siehe Kapitel 4.4 und 3.3.2). Es wurde die PSF-Halbwertsbreite von 311 Beads vermessen und die Mittelwerte der jeweiligen Raumrichtung gebildet. Die verwendete laterale und axiale PSF ergab sich aus den Mittelwerten der Messungen in alle Raumrichtungen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der lateralen (x- und y-Richtung) und axialen (z-Richtung) Halbwertsbreite der PSF in die einzelnen Raumrichtungen sind in Tabelle 7.13 zu sehen. Die Mittelwerte der lateralen PSF-Halbwertsbreiten liegen in einem Bereich von 214 bis 264 nm, die der axialen in einem Bereich von 581 bis 582 nm. Die Standardabweichungen der lateralen PSF-Halbwertsbreiten liegen in einem Bereich von 20 bis 51 nm, die Standardabweichungen der axialen PSF-Halbwertsbreiten zwischen 42 und 51 nm. Auffallend ist die zwischen 40-50 nm größere PSF-Halbwertsbreite in x-Richtung, welche sich aus einer Asymmetrie der Lochblende des CLSM ergibt⁴. Die Standardabweichungen der Messungen der lateralen PSF-Halbwertsbreite in x-z- und y-z-Richtung sind 20-30 nm größer als die Standardabweichungen der Messung in x-y-Richtung, da die Anisotropie der Auflösung des CLSM mit in die Anpassung der zweidimensionalen Gaußfunktion einfließt. Die Halbwertsbreiten der verwendeten PSF wurden aus der Mittelung der Meßwerte über alle lateralen und axialen Richtungen ermittelt und sind in Tabelle 7.14 zu sehen.

Meßrichtung	Richtung	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung
x-y	x	[nm]	255	±33
x-y	y	[nm]	214	±20
x-z	x	[nm]	264	±43
y-z	y	[nm]	222	±26
x-z	z	[nm]	581	±51
y-z	z	[nm]	582	±42

Tabelle 7.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der PSF-Halbwertsbreiten, welche sich aus den Halbwertsbreiten bei Messung in die angegebenen Raumrichtungen ergeben. Die Einheit der Meßwerte ist nm.

PSF	Einheit	Mittelwert	Standardabweichung
Lateral	[nm]	239	±38
Axial	[nm]	581	±46

Tabelle 7.14: Mittelwerte und Standardabweichungen der PSF-Halbwertsbreiten, welche sich aus der Mittelung aller Halbwertsbreiten in laterale und axiale Richtung ergeben. Die Einheit der Meßwerte ist nm.

⁴Die Halbwertsbreite der PSF in die beiden laterale Richtung sollte gleich groß sein, da die laterale PSF eine symmetrische Funktion ist

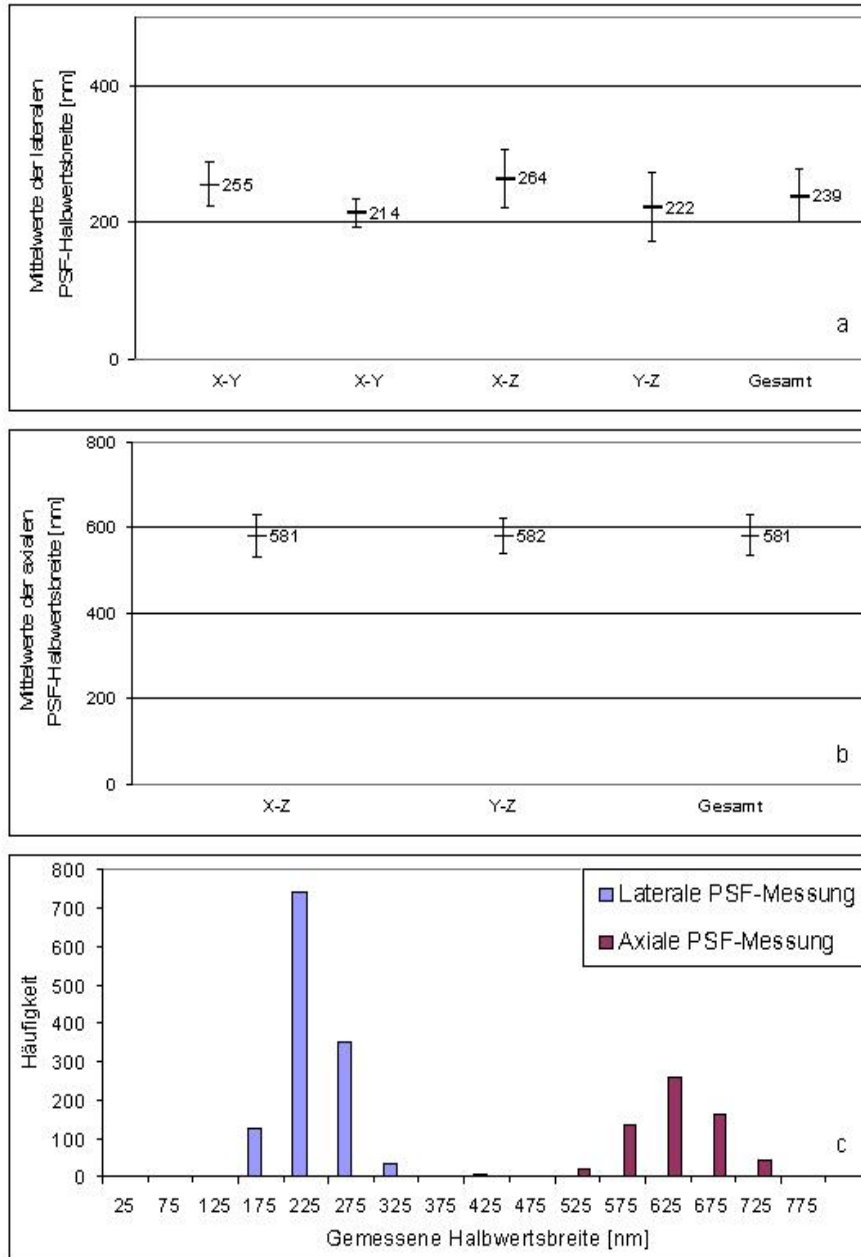


Abbildung 7.30: Die Diagramme a und b zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der lateralen bzw. axialen PSF-Messungen, welche sich aus den Messungen in die unterschiedlichen Raumrichtungen und bei Mittelung aller Meßwerte ergeben. Die Einheiten der Ordinate entsprechen nm. Diagramm c zeigt die Häufigkeitsverteilung der lateralen und axialen PSF-Messung. Die Abszisse entspricht den Mittelwerten der Häufigkeitsklassen, wobei die Breite der Klassen $\Delta 50$ nm entspricht, und die Ordinate der Häufigkeit.

In Abbildung 7.30 sind die gemessenen lateralen (Diagramm **a**) und axialen (Diagramm **b**) PSF-Halbwertsbreiten und die Häufigkeitsverteilung (Diagramm **c**) der Messungen zu sehen. Die Meßwerte der lateralen Messung streuen in einem Bereich von 200 bis 550 nm, die axialen Meßwerte in einem Bereich von 450 bis 750 nm. Der Tophatfilter erkannte, mit einer Einstellung von $r=0.5$, in 51 von 59 möglichen Zellkernen beide Gensignale vollständig, in 5 der 59 Zellkerne nur ein Gensignal und in 3 Zellkernen >2 Gensignale. Die resultierende Effizienz entspricht somit 89.9%, unter Vernachlässigung der Zellkerne mit >2 Gensignalen.

Mit den berechneten PSF-Halbwertsbreiten wurden die Halbwertsbreiten der SNRPN Gene mit dem in Kapitel 5.4 vorgestellten und entwickelten Algorithmus berechnet und aus diesen die Ellipsoid- und Kugelvolumina und, mit der Länge der DNA-Sonde von 200 kBp, die Kompaktierung berechnet. Aus den resultierenden Meßwerten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Verteilungen berechnet. Zusätzlich wurden die resultierenden Meßwerte in zwei Verteilungen sortiert, eine mit den größeren Volumina bzw. kleineren Kompaktierungen, die anderen mit den kleineren Volumina bzw. größeren Kompaktierungen. Die Distanz der Mittelwerte $\Delta\mu$ der aufgeteilten Verteilungen wurde mit der skalierten Standardabweichung der gesamten Verteilung σ , also der Distanz der Mittelwerte einer zufälligen Verteilung verglichen (siehe Kapitel 7.2). Die Mittelwerte der gesamten und aufgeteilten Verteilungen μ_{ges} , μ_{in} und μ_{out} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{in} und σ_{out} und Testergebnisse des Vergleichs der aufgeteilten Verteilungen der Ellipsoid- und Kugelvolumina und Kompaktierungen sind in Tabelle 7.15 zu sehen. Der Mittelwert der gesamten Verteilung der Ellipsoidvolumina liegt bei $0.070 \mu m^3$ und der Kugelvolumina bei $0.026 \mu m^3$. Die mittlere Kompaktierung der DNA, welche aus dem Ellipsoidvolumen resultiert, liegt bei $3.7 \frac{MBp}{\mu m^3}$, die Kompaktierung der DNA im Kugelvolumen liegt bei $10.8 \frac{MBp}{\mu m^3}$. Die Standardabweichungen aller Meßwerte haben eine Größenordnung von $>40\%$ des Mittelwertes, d.h. diese sind auffällig groß. Die aufgeteilten Verteilungen können nicht von denen einer zufälligen Sortierung unterschieden werden.

Der Mittelwert der gesamten Verteilung der Ellipsoidvolumina ist um einen Faktor 2.7, der Mittelwert der kleineren Ellipsoidvolumina um einen Faktor 3.1 und der Mittelwert der größeren Ellipsoidvolumina um einen Faktor 2.6 größer als die Kugelvolumina.

Parameter	$V_{Ellipsoid}$ [μm^3]	V_{Kugel} [μm^3]	Komp·Ellipsoid [$\frac{MBp}{\mu m^3}$]	Komp·Kugel [$\frac{MBp}{\mu m^3}$]
μ_{ges}	0.070	0.026	3.7	10.8
σ_{ges}	± 0.050	± 0.018	± 1.7	± 6.1
μ_{in}	0.055	0.018	2.9	7.9
σ_{in}	± 0.035	± 0.010	± 1.1	± 3.6
μ_{out}	0.085	0.033	4.3	13.2
σ_{out}	± 0.058	± 0.021	± 1.6	± 5.6
$\Delta\mu$	0.030	0.015	1.4	5.3
σ	0.057	0.020	1.9	6.9
Testergebnis	negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 7.15: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung der gesamten und aufgeteilten Meßwerte der Volumen und Kompaktierungsmessungen und die Ergebnisse des Vergleichs der aufgeteilten Meßwerte mit dem Ergebnis einer zufälligen Verteilung. Die Ellipsoid- und Kugelvolumina sind in μm^3 angegeben, die Kompaktierung in $\frac{MBp}{\mu m^3}$.

Dieser Faktor resultiert aus der in die Berechnung des Ellipsoidvolumens mit einbezogene axialen PSF und gibt das Verhältnis der axialen zur lateralen PSF wieder. Eine analoge Aussage kann für die Kompaktierung gemacht werden, da in diese die Volumina reziprok mit einfließen. Auffallend ist die gute Übereinstimmung der Kompaktierung der DNA innerhalb einer Kugel mit der Kompaktierung einer homogenen DNA-Verteilung von $11 \frac{MBp}{\mu m^3}$ in einem Zellkern mit $10 \mu m$ Durchmesser.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Ellipsoid- und Kugelvolumina und die Mittelwerte mit Standardabweichungen der gesamten und aufgeteilten Meßwerte sind in den Diagrammen **a** und **b** der Abbildung 7.31 zu sehen. 77% der Meßwerte der Ellipsoidvolumina befinden sich in einem Bereich von 0.040 bis $0.160 \mu m^3$ und 85% der Meßwerte der Kugelvolumina in einem Bereich von 0.010 bis $0.050 \mu m^3$. Auffallend sind in Diagramm **c** der Abbildung 7.31 die großen Standardabweichungen. Die Ursache für die großen Standardabweichungen könnte die unterschiedliche Lage der Gene im Zellkern sein. Für einen bestimmten prozentualen Anteil an Meßwerten der Stichprobe wird ein Strukturunterschied der SNRPN Gene in laterale Richtung gemessen, da sich diese in einer Lage in lateralen Position befinden. Die restlichen Meßwerte der Stichprobe weisen diesen Unterschied, aufgrund einer Lage in axiale Richtung, nicht auf.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kompaktierung des SNRPN Gens innerhalb eines Ellipsoid- bzw. Kugelvolumens und die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten und aufgeteilten Meßwerte sind in Diagrammen der Abbildung 7.32 zu sehen. 85% der Meßwerte der Kompaktierung innerhalb eines Ellipsoidvolumens befinden sich in einem Kompaktierungsbereich von 1 bis $6 \frac{MBp}{\mu m^3}$ und 88% der Meßwerte der Kompaktierung innerhalb eines Kugelvolumens in einem Bereich von 4 bis $20 \frac{MBp}{\mu m^3}$. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der Kompaktierung und dem Volumen ergeben sich für die Kompaktierungen ebenfalls große Standardabweichungen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die laterale Halbwertsbreite der PSF des CLSM (Leica TCS NT) kann mit 239 ± 38 nm, die axiale Halbwertsbreite der PSF 581 ± 46 nm angegeben werden. Die Beads, welche zur Messung verwendet wurden, waren in Vectashield eingebettet und auf den Objektträger präpariert.
2. Die Halbwertsbreiten der PSF in die beiden lateralen Richtungen weisen einen Unterschied von 30-40 nm auf, was von einem mechanischen Drift des Objektträgertisches am Mikroskop verursacht wird.
3. Das Ellipsoidvolumen und die Kompaktierung der 200 kBp langen DNA-Sequenz innerhalb eines Ellipsoidvolumens des SNRPN Gens liegen bei $0.070 \pm 0.050 \mu m^3$ bzw. $3.7 \pm 1.7 \frac{MBp}{\mu m^3}$.
4. Das Kugelvolumen und die Kompaktierung der 200 kBp langen DNA-Sequenz innerhalb eines Kugelvolumens liegen bei $0.026 \pm 0.018 \mu m^3$ bzw. $10.8 \pm 6.1 \frac{MBp}{\mu m^3}$.
5. Keine der aufgeteilten Verteilungen konnte von einer zufälligen Sortierung unterschieden werden.

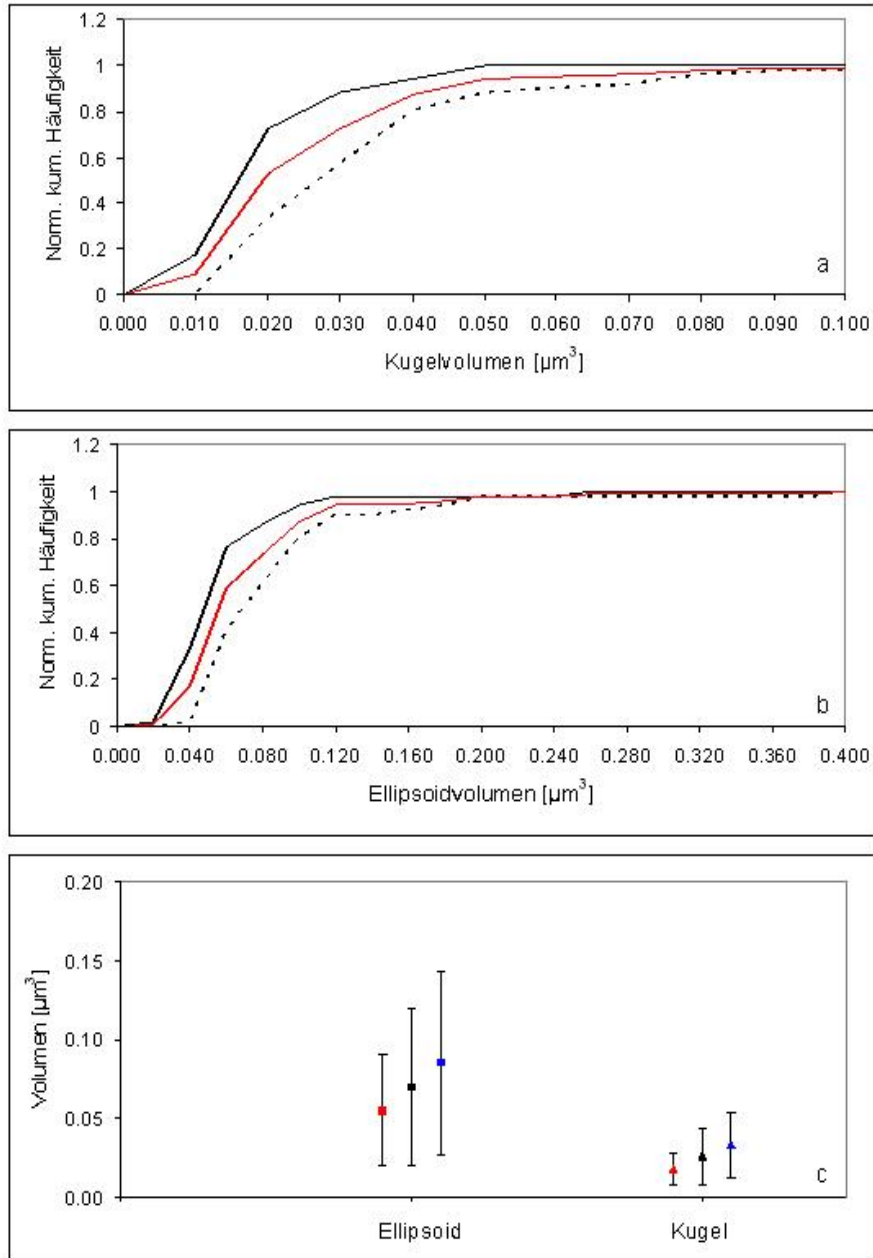


Abbildung 7.31: Die Diagramme **a** und **b** zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kugel- bzw. Ellipsoidvolumina. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung mit der größeren Meßwerten, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung mit der kleineren Meßwerten und die rote Linie der Verteilung der gesamten Meßwerte. Auf der Abszisse ist das Volumen in μm^3 und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Das Diagramm **c** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte der gesamten und aufgeteilten Verteilungen der Ellipsoid- und Kugelvolumina. Der blaue Punkt entspricht dem Mittelwert der größeren Meßwerte, der roten dem Mittelwert der kleinere Meßwerte und der schwarze Punkt dem Mittelwert der gesamten Meßwerte. Hier zeigt die Ordinate das Volumen in μm^3 an.

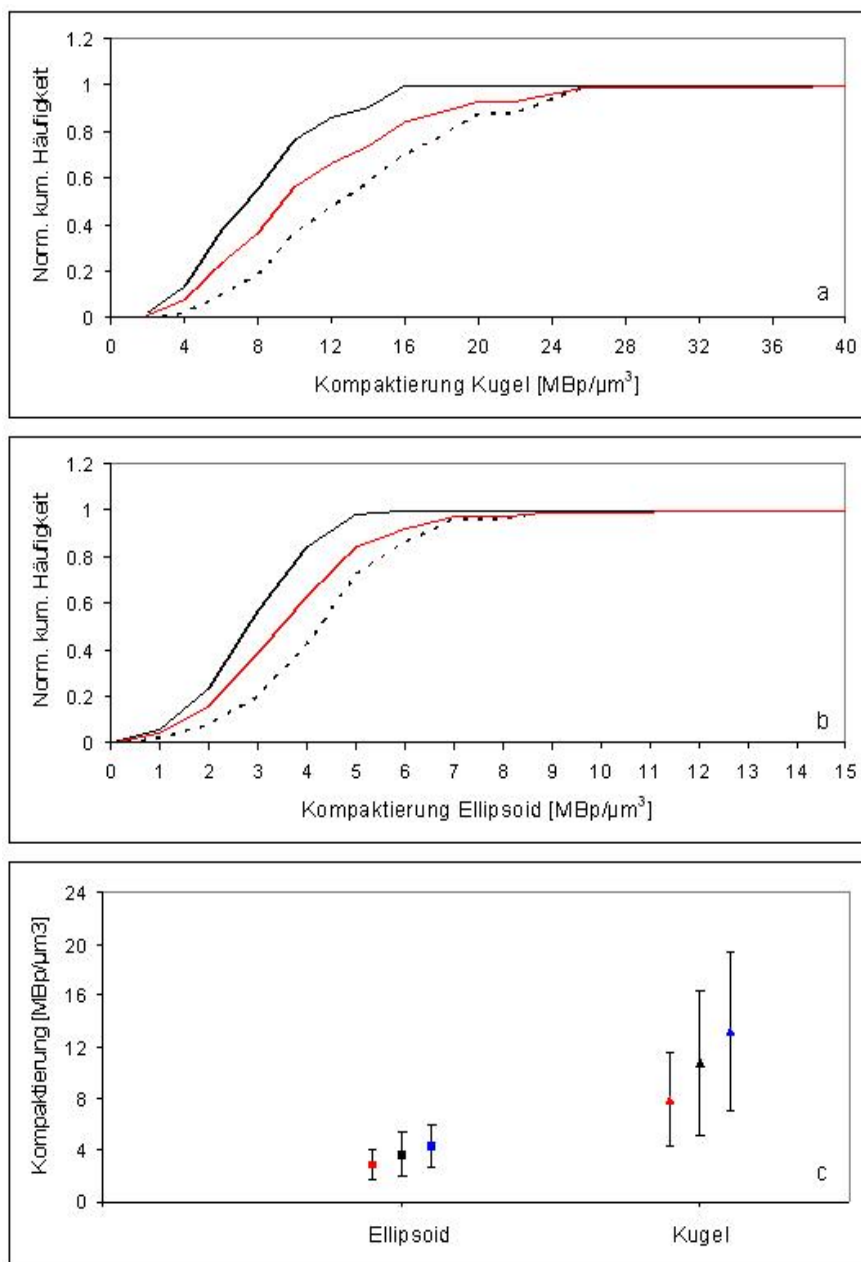


Abbildung 7.32: Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kompaktierung des SNRPN Gens innerhalb eines Ellipsoid- und Kugelvolumens. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung mit den größeren Meßwerten, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung mit den kleineren Meßwerten und die rote Linie der gesamten Verteilung. Auf der Abszisse ist die Kompaktierung in $\frac{MBp}{\mu m^3}$ und auf der Ordinate die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen aufgetragen. Das Diagramm c zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten und aufgeteilten Verteilungen der Kompaktierung. Hier zeigt die Ordinate die Kompaktierung in $\frac{MBp}{\mu m^3}$ an. Der blaue Punkt entspricht dem Mittelwert der Verteilung der größeren Meßwerte, der roten Punkt dem Mittelwert der Verteilung der kleinere Meßwerte und der schwarze Punkt dem Mittelwert der Verteilung der gesamten Meßwerte.

7.3.2 Messung der relativen radialen Position des SNRPN Gens (1. Experiment)

Die relative radiale Position der SNRPN Gene wurde randbasiert mit den bereits vorgestellten Algorithmen vermessen. Die resultierenden Verteilungen wurden in zwei Verteilungen sortiert, welche aus den radial zentraleren und radial periphereren liegenden Meßwerte bestanden. Die Mittelwerte randbezogenen relativen radialen Position der gesamten und aufgeteilten Verteilungen μ_{ges} , μ_{in} und μ_{out} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{in} und σ_{out} und Testergebnisse des Vergleichs der aufgeteilten Verteilungen sind in Tabelle 7.15 zu sehen. Der Mittelwert der randbasierten, relativen radialen Position liegt bei 59% und weist eine Standardabweichung von 21% auf. Anhand der randbasierten Methode konnte ein signifikanter Unterschied von 1% zwischen den Mittelwerten der aufgeteilten Meßwerte nachgewiesen werden. Das radial zentraler liegende SNRPN Gen weist einen Mittelwert von 47%, das radial peripherer liegende Gen einen Mittelwert von 70% auf, mit Standardabweichungen von 19% bzw. 14%.

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position der SNRPN Gene ist im Diagramm **a** der Abbildungen 7.33 zu sehen. Die Verteilung der radial weiter außen liegenden Meßwerte ist schwarz gestrichelt, die Verteilung der radial weiter innen liegenden Meßwerte schwarz durchgezogen und die Verteilung der gesamten Meßwerte rot gekennzeichnet. Von den randbezogenen Meßwerte liegen 76% der radial zentraleren Meßwerte bei einer radialen Position $<70\%$ und 91% der radial peripheren Meßwerte bei einer radialen Position $>60\%$. Der signifikante Unterschied, der anhand der aufgeteilten Verteilungen nachgewiesen werden kann, wird aus dem Anteil an Meßwerte nochmals deutlich.

Aufgrund des aus der Aufteilung der Meßwerte resultierenden signifikanten Unterschiedes und der daraus resultierenden unterschiedlichen radialen Positionen der SNRPN Gene, die mit beiden Meßmethoden nachgewiesen werden konnte, wurden die unterschiedlichen radialen Positionen mit den Volumina korreliert. Es kann mit der randbezogenen Positionierung aufgezeigt werden, das in 71% der Zellkerne das SNRPN Gen mit einem kleineren Kugelvolumen eine radiale zentrale Position mit einem Mittelwert von 47% und das zweite Gen mit einem größeren Kugelvolumen eine radial peripher liegende Position von 70% einnimmt.

Parameter	Einheit	Randbasierte rel. rad. Position
μ_{ges}	[%]	59
σ_{ges}	[%]	± 21
μ_{in}	[%]	47
σ_{in}	[%]	± 19
μ_{out}	[%]	70
σ_{out}	[%]	± 14
$\Delta\mu$	[%]	24
σ	[%]	23
Testergebnis		positiv

Tabelle 7.16: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung der gesamten und aufgeteilten Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position und die Ergebnisse des Vergleichs der aufgeteilten Meßwerte mit dem Ergebnis einer zufälligen Verteilung. Die relativen radialen Positionen sind in % angegeben.

Für das Ellipsoidvolumen konnte diese Korrelation in 65% der Zellkern nachgewiesen werden. Die prozentualen Korrelationswerte sind im Diagramm **b** der Abbildung 7.33 für die randbasierte Methode aufgetragen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die randbasierte relative radiale Position der beiden SNRPN Gene sind signifikant unterschiedlich. Eines der Gene nimmt eine radiale Position von 47% mit einer Standardabweichung von 19% ein, das andere eine radiale Position von 70% mit einer Standardabweichung von 14%.
2. Die randbezogene relative radiale Position des kleineren Kugelvolumen korreliert in 71% der Zellkerne mit einer radialen zentralen Position, während das größere Kugelvolumen eine radial periphere Position einnimmt. Gleiches gilt in 65% der Zellkerne für die Ellipsoidvolumina (siehe Diagramm **b** in Abbildung 7.33).

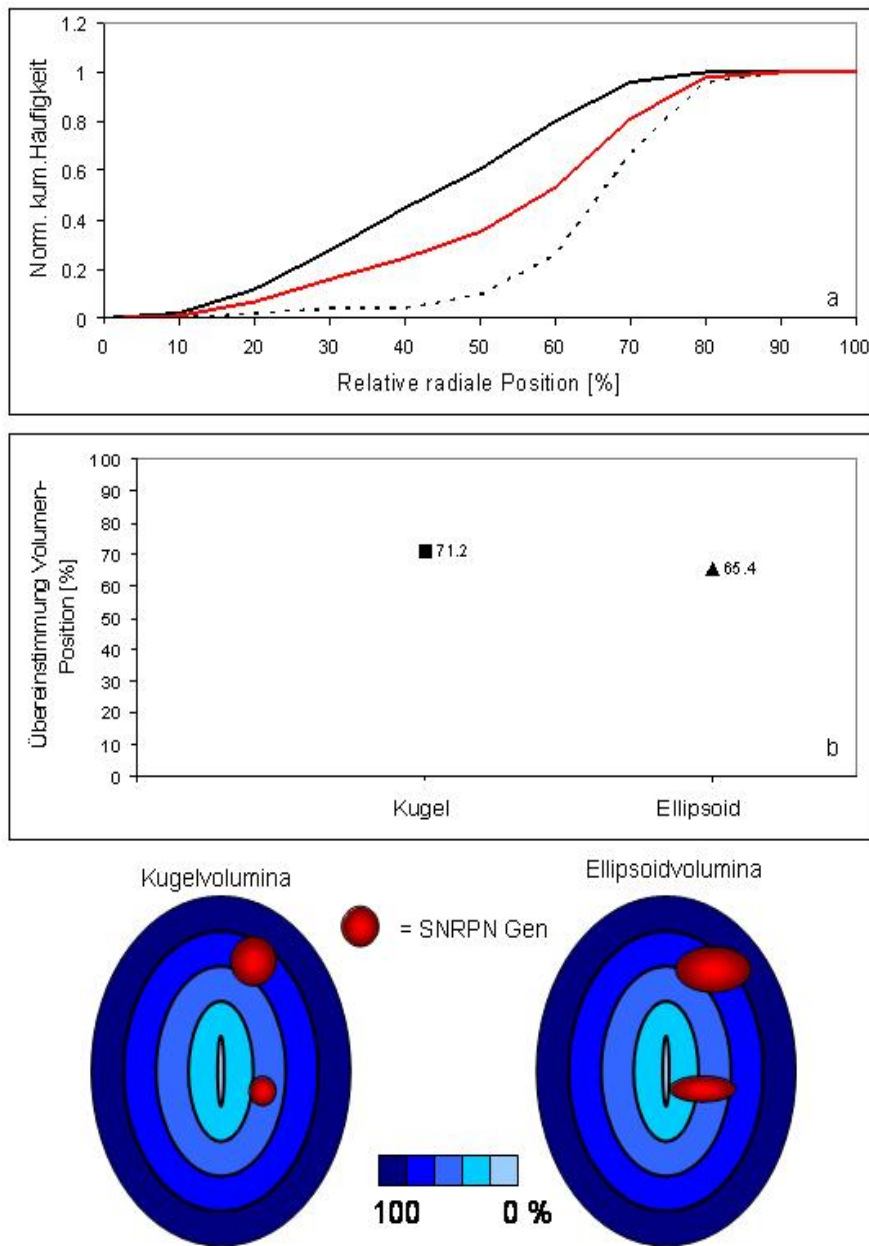


Abbildung 7.33: Das Diagramm a zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Position. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung mit den größeren Meßwerten, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung mit den kleineren Meßwerten und die rote Linie der gesamten Verteilung. Auf der Abszisse ist die relative radiale Position in % und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Diagramm b zeigt die prozentuale Korrelation zwischen den SNRPN Genen mit einem kleineren Ellipsoid- bzw. Kugelvolumen, welche radial bei 47% liegen, und den SNRPN Genen mit dem größeren Volumen, welche radial bei 70% liegen. Die untere Abbildung zeigt ein Modell, welches die randbasierte, relative radiale Position und die Größe der Ellipsoid bzw. Kugelvolumina korreliert.

7.3.3 Messung des Volumens und der Kompaktierung des SNRPN Gens (2. Experiment)

Die Messung des Ellipsoid- und Kugelvolumens und der Kompaktierung im zweiten Experiment erfolgte in lymphoblastoiden Zellen, in welchen das paternale und maternale SNRPN Gen unterschieden werden konnte. Es wurden die im dem ersten Experiment gemessenen PSF-Halbwertsbreiten verwendet, da keine Beadmessungen vorlagen, weshalb die aus der Messung resultierenden Meßwerte nicht als absolute Werte angesehen werden dürfen, sondern nur relativ zueinander. Die Messungen wurden dennoch durchgeführt, weil die Unterscheidung in aktives (paternal) und inaktives (maternal) SNRPN Gen ein geeignetes Modell zur Überprüfung der De- und Kondensationshypothese von Genen ist. Die Anzahl der Meßwerte befindet sich an einer statistisch kritischen Grenze, ist aber noch zulässig. Da keine Zellkernfärbungen vorlagen, konnte die Korrelation mit der radialen Lage nicht untersucht werden.

Die Messung der Ellipsoid- und Kugelvolumina und der Kompaktierung erfolgt mit den in den Kapiteln 3.3.2 und 4.4 beschriebenen Algorithmen. Aus den resultierenden Meßwerten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Verteilungen berechnet. Die Meßwerte mußten nicht zusätzlich in zwei Verteilungen sortiert werden, da paternales und maternales Gen bereits getrennt vorlagen und somit in zwei getrennten Verteilungen untersucht werden konnten. Die Distanz der Mittelwerte $\Delta\mu$ der Verteilung der paternalen und maternalen Gene wurde mit der skalierten Standardabweichung der gesamten Verteilung σ , also der Distanz der Mittelwerte einer zufälligen Verteilung, verglichen (siehe Kapitel 7.2). Die Mittelwerte der Verteilung der gesamten und maternalen bzw. paternalen Gene μ_{ges} , μ_{mat} und μ_{pat} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{mat} und σ_{pat} und Testergebnisse des Vergleichs zwischen den Verteilungen der paternalen und maternalen Ellipsoid-, Kugelvolumina und Kompaktierungen sind in Tabelle 7.17 zu sehen. Die Mittelwerte der Verteilung der Ellipsoidvolumina liegen in einem Bereich von 0.017 bis 0.022 μm^3 , die der Kugelvolumina in einem Bereich von 0.008 bis 0.011 μm^3 . Die Standardabweichungen sind entsprechen teilweise >90% der Mittelwerte. Ursache hierfür ist die geringe Anzahl an Meßwerten. Die Volumina der maternalen und paternalen Gene konnten statistisch nicht unterschieden werden.

Parameter	$V_{Ellipsoid}$ [μm^3]	V_{Kugel} [μm^3]	Komp. Ellipsoid [$\frac{MBp}{\mu m^3}$]	Komp. Kugel [$\frac{MBp}{\mu m^3}$]
μ_{ges}	0.020	0.010	15.7	32.4
σ_{ges}	± 0.014	± 0.008	± 12.7	± 22.7
μ_{mat}	0.017	0.008	16.3	34.3
σ_{mat}	± 0.008	± 0.005	± 15.3	± 22.0
μ_{pat}	0.022	0.011	15.1	30.6
σ_{pat}	± 0.017	± 0.010	± 10.0	± 23.8
$\Delta\mu$	0.005	0.003	1.2	3.7
σ	0.016	0.009	14.4	25.7
Testergebnis	negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 7.17: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verteilung der Meßwerte der gesamten, maternalen und paternalen Volumen und Kompaktierungsmessungen und die Ergebnisse des Vergleiches der maternalen und paternalen Gene mit dem Ergebnis einer zufälligen Verteilung. Die Ellipsoid- und Kugelvolumina (die beiden linken Spalten) sind in μm^3 angegeben, die Kompaktierung (die beiden rechten Spalten) in $\frac{MBp}{\mu m^3}$.

Die Mittelwerte der DNA-Kompaktierung, welche sich aus dem Ellipsoidvolumen ergibt, liegen, bei einer Sondenlänge von 159 kBp, in einem Bereich von 15.1 bis 16.3 $\frac{MBp}{\mu m^3}$. Die aus dem Kugelvolumen resultierenden Mittelwerte der Kompaktierung liegen in einem Bereich von 30.6 bis 34.3 $\frac{MBp}{\mu m^3}$. Die Standardabweichungen weisen, da die Kompaktierung aus den Volumina resultiert, die gleichen hohen Werte auf. Die Kompaktierung des maternalen und paternalen Gen kann nicht unterschieden werden. Der Volumenunterschied zwischen den Kugel- und Ellipsoidvolumina entspricht einem Faktor 2, was, wie zu erwarten, in der Größenordnung der Differenz der axialen und lateralen PSF entspricht. Die Diagramme **a** und **b** in Abbildung 7.34 zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kugel- und Ellipsoidvolumina. Die gestrichelten schwarzen Linien entsprechen den paternalen, die schwarzen durchgezogenen Linien den maternalen und die roten Linien der gesamten Verteilung. 80% der Meßwerte des Ellipsoidvolumens befinden sich in einem Bereich von 0.010 bis 0.040 μm^3 und 67% der Meßwerte der Kugelvolumina in einem Bereich von 0.005 bis 0.020 μm^3 . Die Verteilungen weisen einen unregelmäßigen Verlauf auf, da die Anzahl der Meßwerte klein ist. Die Mittelwerte der Ellipsoid- und Kugelvolumina werden im Diagramm **c** in Abbildung 7.34 gegenübergestellt. Die roten Punkte entsprechen den Mittelwerten der Verteilung der Volumina der maternalen, die blauen Punkte den Mittelwerten der Verteilung der Volumina der paternalen Gene und die schwarzen Punkte den Mittelwerten der Verteilung der Volumina der gesamten Meßwerte. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kompaktierungen, welche sich aus dem Kugel- und Ellipsoidvolumina ergeben sind in den Diagrammen **a** und **b** in Abbildung 7.35 zu sehen (Die Kennzeichnung der Linien ist analog der Kennzeichnung der Volumina). 82% der Meßwerte der Ellipsoidvolumina liegen in einem Bereich von 5.0 bis 20.0 $\frac{MBp}{\mu m^3}$ und 80% der Meßwerte der Kugelvolumina in einem Bereich von 10.0 bis 40.0 $\frac{MBp}{\mu m^3}$. Im Diagramm **c** in Abbildung 7.35 sind die Mittelwerte der Kompaktierung beider Volumenmessungen zu sehen (Die Kennzeichnung der Punkte ist analog der Kennzeichnung der Volumina). Die gemessenen Volumina wurden mit den Ergebnissen einer Volumenmessung verglichen, bei welcher interaktiv Schwellwerte auf die Bilder gesetzt, die Anzahl der Voxel gezählt und diese mit dem Voxelvolumen multipliziert wurde⁵. Die Mittelwerte der gesamten und maternalen bzw. paternalen Verteilungen μ_{ges} , μ_{mat} und μ_{pat} , die Standardabweichungen σ_{ges} , σ_{mat} und σ_{pat} und Testergebnisse des Vergleichs der paternalen und maternalen Verteilung der Volumina sind in Tabelle 7.18 aufgelistet.

Parameter	Einheit	Volumen
μ_{ges}	$[\mu m^3]$	0.397
σ_{ges}	$[\mu m^3]$	± 0.188
μ_{mat}	$[\mu m^3]$	0.386
σ_{mat}	$[\mu m^3]$	± 0.176
μ_{pat}	$[\mu m^3]$	0.407
σ_{pat}	$[\mu m^3]$	± 0.201
$\Delta\mu$	$[\mu m^3]$	0.021
σ	$[\mu m^3]$	0.212
Testergebnis		negativ

Tabelle 7.18: Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten, maternalen und paternalen Meßwerte der Volumenmessungen mittels Schwellwert. Die Volumina sind in μm^3 angegeben.

⁵Das Setzen der Schwellwerte und die Volumenmessung wurden von K.Teller ausgeführt, LMU München

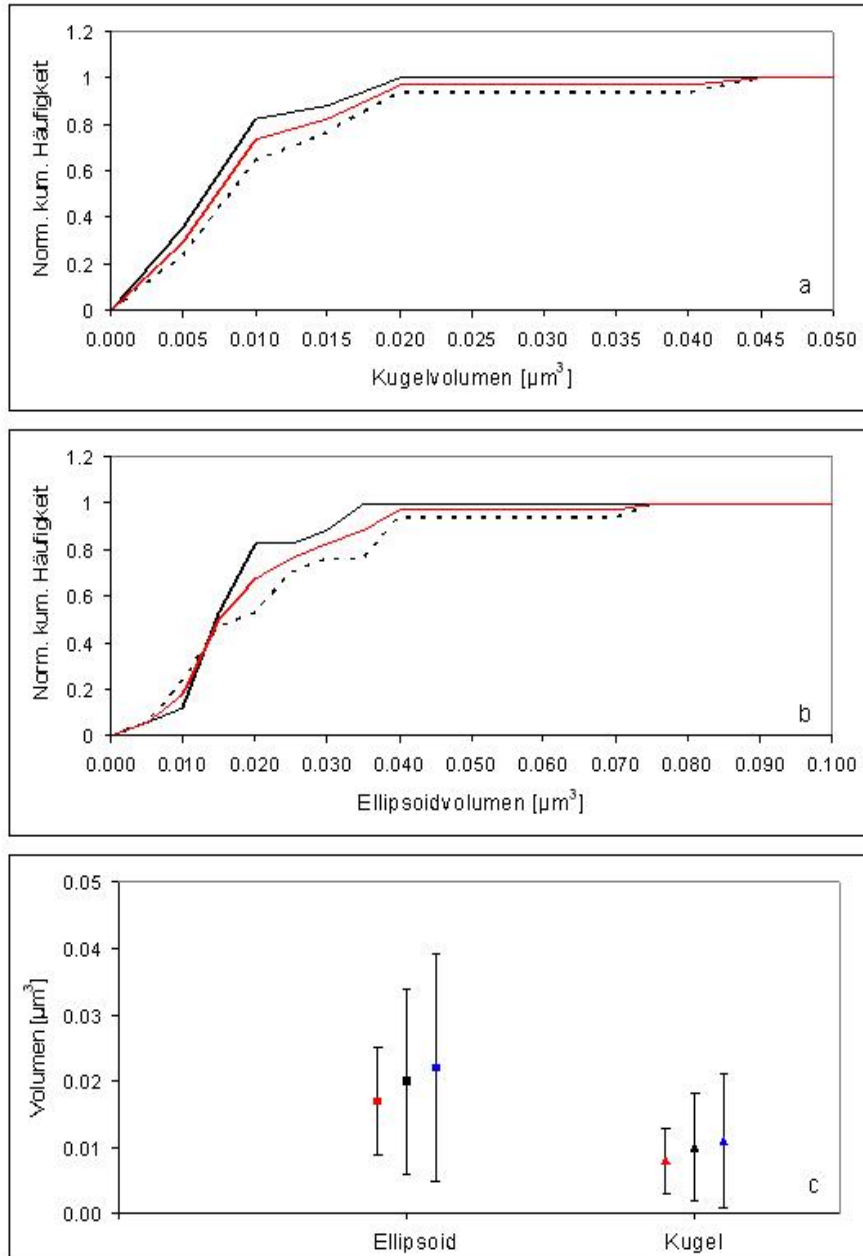


Abbildung 7.34: Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Kugel- und Ellipsoidvolumina. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der paternalen Gene, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung der Meßwerte der maternalen Gene und die rote Linie der gesamten Verteilung. Auf der Abszisse ist das Kugel- bzw. Ellipsoidvolumen in μm^3 und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Das Diagramm c zeigt die Mittelwerte der Verteilung der Volumina der paternalen (blau), maternalen (rot) und gesamten Meßwerte (schwarz) mit Standardabweichungen. Die Ordinate entspricht dem Volumen in μm^3 .

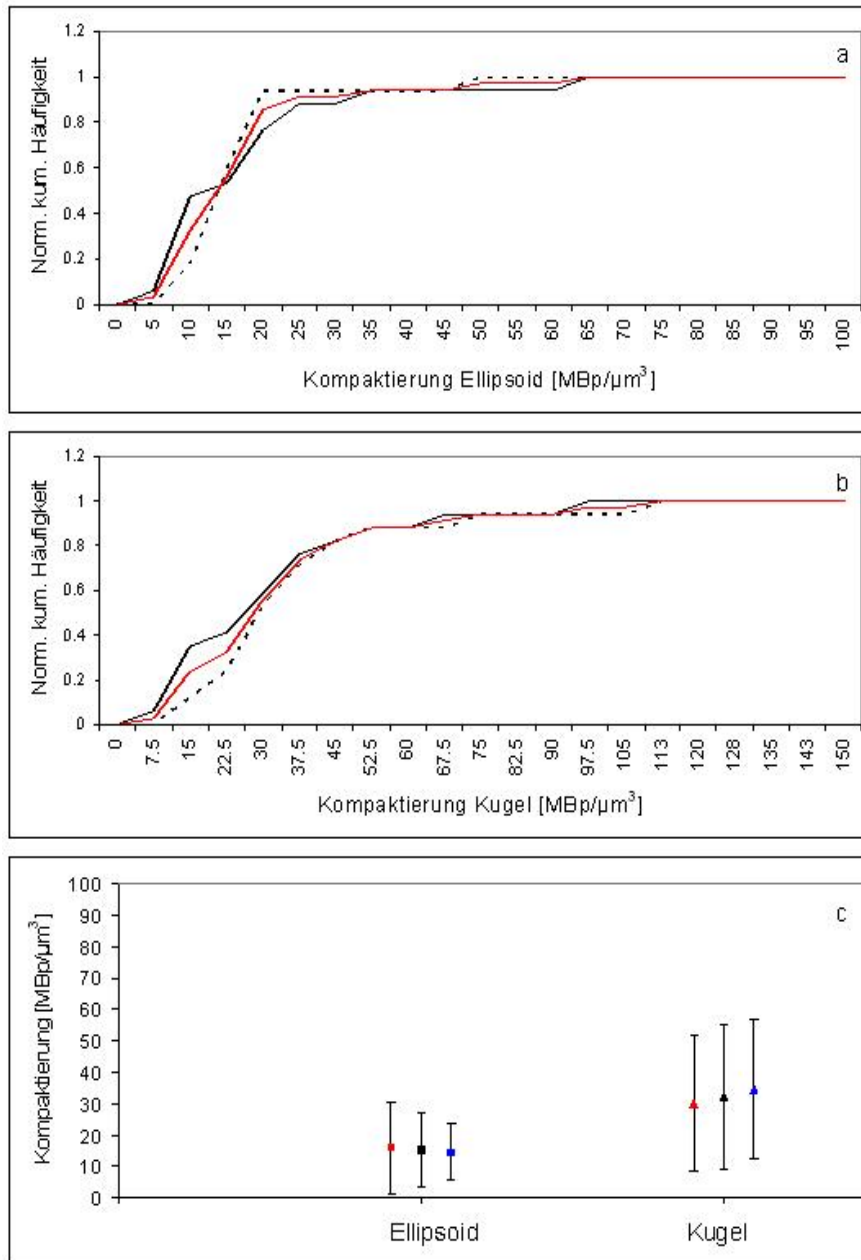


Abbildung 7.35: Die Diagramme a und b zeigen die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen Kompaktierungen, welche sich aus den Ellipsoid- bzw. Kugelvolumina und der Sondenlänge von 159 kBp ergeben. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der paternalen Gene, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung der Meßwerte der maternalen Gene und die rote Linie der gesamten Verteilung. Auf der Abszisse ist die Kompaktierung in $\frac{MBp}{\mu m^3}$ und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen. Das Diagramm c zeigt die Mittelwerte der Verteilung der Kompaktierung der paternalen Gene (blau), maternalen Gene (rot) und der gesamten Meßwerte (schwarz) mit Standardabweichungen. Die Ordinate entspricht dem Volumen in $\frac{MBp}{\mu m^3}$.

Die Mittelwerte der gesamten, maternalen und paternalen Volumina sind in einem Bereich von 0.386 bis $0.407 \mu\text{m}^3$ zu finden, die Standardabweichungen in einem Bereich 0.176 bis $0.201 \mu\text{m}^3$. Die Standardabweichungen entsprechen ca. 50% der Mittelwerte. Die paternale und maternale Verteilung kann nicht unterschieden werden. Die im Diagramm in Abbildung 7.37 zu sehenden normierten kumulierten Verteilungen zeigen, dass sich 80% der Meßwerte in einem Bereich von 0.2 bis $0.6 \mu\text{m}^3$ befinden. Die Volumenmessung der SNRPN Gene durch Zählen der Voxel ergibt ein Volumen, welches um einen Faktor 10 größer ist, als das Volumen, welches sich aus der Anpassung einer Gaußfunktion und der anschließenden Berechnung eines Ellipsoid- bzw. Kugelvolumens ergibt. In Abbildung 7.36 werden die gemessenen Volumina des paternalen und maternalen SNRPN Gene, welche aus den zwei verschiedenen Methoden resultieren, gegenübergestellt (Die Ordinate ist logarithmisch aufgetragen). Der extreme Unterschied zwischen den beiden Methoden kann anhand des PSF-Volumens verdeutlicht werden. Das aus der Messung der PSF-Halbwertsbreiten resultierende Ellipsoidvolumen entspricht $0.017 \mu\text{m}^3$. Das aus der Zählung der Voxel resultierende Volumen ergibt einen Wert $0.397 \mu\text{m}^3$, d.h. das gemessene Volumen und das PSF-Volumen unterscheiden sich um einen Faktor von 22.8. Die aus der Anpassung den Halbwertsbreiten der Gaußfunktion resultierende Ellipsoid- bzw. Kugelvolumen hingegen ergibt Volumina von 0.020 bzw. $0.010 \mu\text{m}^3$, d.h. das gemessene Volumen ist um einen Faktor 1.2 größer bzw. 0.6 kleiner als das PSF-Volumen. Die Messung des Volumens anhand von Setzen eines Schwellwertes sollte deshalb, aufgrund der Ungenauigkeit, nicht angewendet werden.

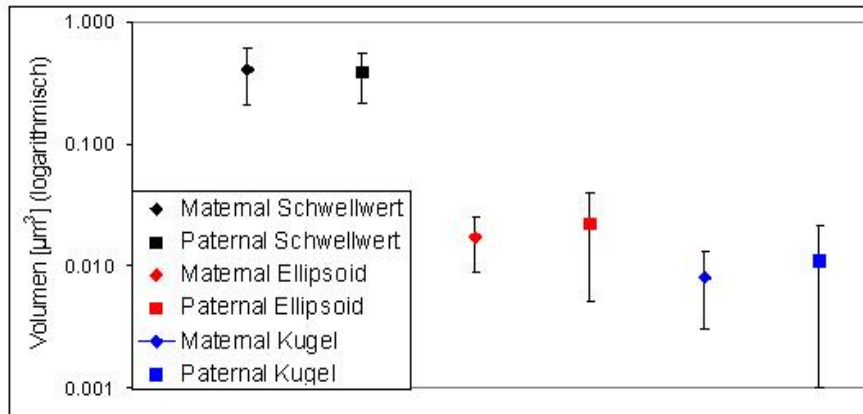


Abbildung 7.36: Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Verteilung der Volumina der paternalen und maternalen Gene, welche sich nach dem setzen eines Schwellwertes und anschließender Berechnung des Volumens aus der Anzahl der Voxel ergibt (schwarz). Dieser Messung sind die Mittelwerte der Verteilung der Volumina der paternalen und maternalen Gene gegenübergestellt, welche aus der Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion mit anschließender Volumenberechnung eines Ellipsoid- oder Kugelvolumens resultieren (rot und blau). Die Ordinate entspricht dem Volumen in μm^3 und ist **logarithmisch** aufgetragen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das Ellipsoidvolumen und die Kompaktierung der 159 kBp DNA-Sequenz innerhalb eines Ellipsoidvolumens des SNRPN Gens liegen bei $0.020 \pm 0.014 \mu\text{m}^3$ und $15.7 \pm 12.7 \frac{\text{MBp}}{\mu\text{m}^3}$.
2. Das Kugelvolumen und die Kompaktierung der 159 kBp DNA-Sequenz innerhalb eines Kugelvolumens liegen bei $0.010 \pm 0.008 \mu\text{m}^3$ und $32.4 \pm 22.7 \frac{\text{MBp}}{\mu\text{m}^3}$.

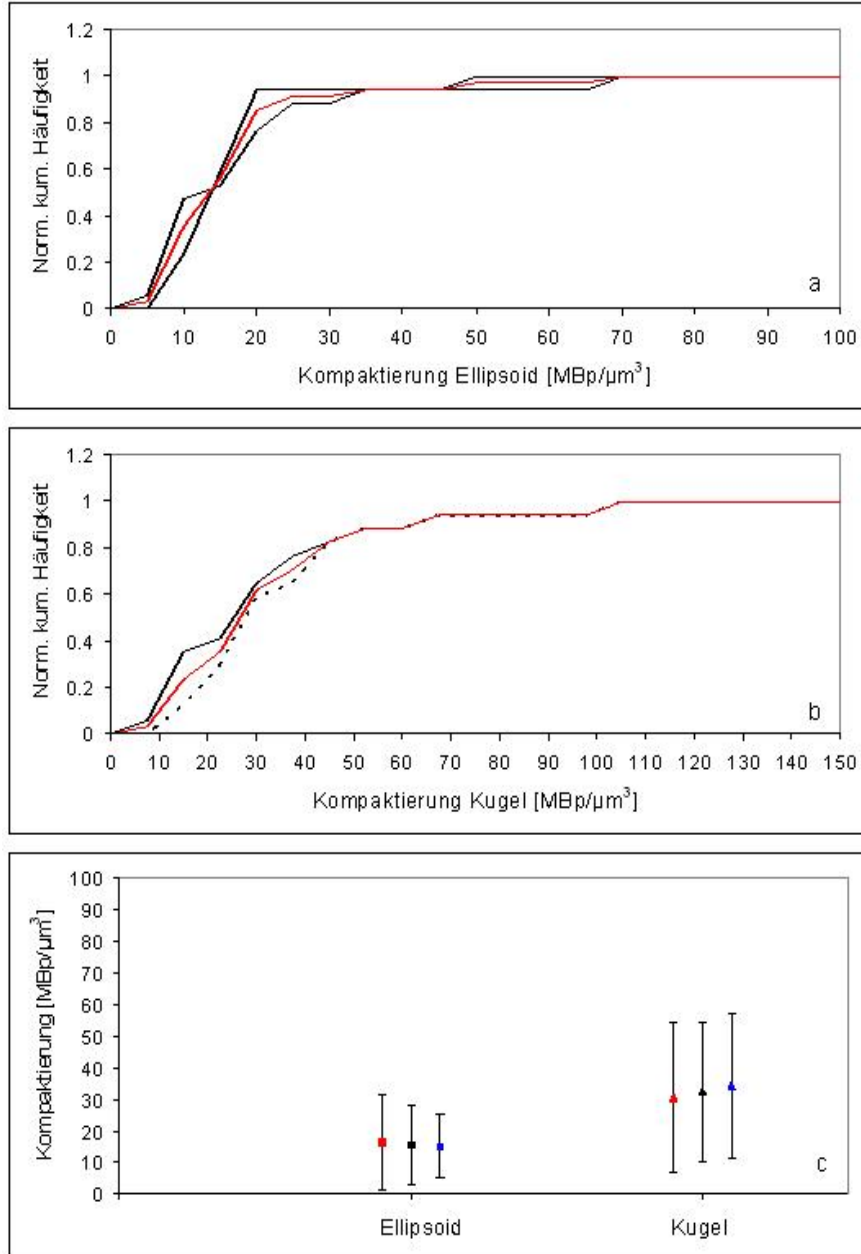


Abbildung 7.37: Das Diagramm zeigt die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der Volumina der SNRPN Gene, welches nach setzen eines Schwellwertes und aus dem Zählen der Voxel mit anschließender Multiplikation mit dem Voxelvolumen resultiert. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der Verteilung der Meßwerte der paternalen Gene, die schwarze durchgezogene Linie der Verteilung der Meßwerte maternalen Gene und die rote Linie der gesamten Verteilung. Auf der Abszisse ist das Volumen in μm^3 und auf der Ordinate die normiert kumulierte Häufigkeitsverteilung aufgetragen.

3. Das paternale und maternale Gen können von einer zufälligen Sortierung nicht unterschieden werden, weshalb die Mittelwerte der Punkte 1 und 2 gelten.
4. Die Messung des Volumens mittels Schwellwertsetzung und anschließender Berechnung des Volumens anhand der ausgezählten Voxel ist in den Größenbereichen nahe der Auflösungsgrenze, d.h. in der Größenordnung von einigen wenigen hundert kbp, **keine** adäquate Methode zur Berechnung des Volumens. Mit dem hier entwickelten Algorithmus zur Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion können Volumina gemessen werden, welche einen Faktor 20-30 kleiner sind.

7.3.4 Zusammenfassung der quantitativen Bildanalyse des SNRPN Gens

Im ersten Experiment wurden die mittlere Halbwertsbreiten der PSF aus der Intensitätsverteilung von 311 Beads berechnet und mit diesen sechs Halbwertsbreiten je zwei in drei Raumrichtungen von 102 SNRPN Genen in 51 Zellkernen berechnet. Aus den Halbwertsbreiten der SNRPN-Gene in drei Raumrichtungen wurde das Ellipsoidvolumen und mit den Mittelwerten der vier lateralen Halbwertsbreiten das Kugelvolumen der SNRPN Gene berechnet. Das Ellipsoidvolumen ist um einen Faktor 2-3 größer, als das Kugelvolumen, was in der Größenordnung des Verhältnisses der axialen zur lateralen PSF liegt. Anhand der Kenntnis der Länge der verwendeten DNA-Sonde (200 kbp) und der Ellipsoid- und Kugelvolumina wurde die Kompaktierung berechnet. Die Kompaktierung, welche aus dem Ellipsoidvolumen resultiert, ist um einen Faktor 3 kleiner als das einer homogenen DNA-Verteilung in einem Zellkern mit 10 μm Durchmesser, während die Kompaktierung, welche aus dem Kugelvolumen resultiert, in der Größenordnung einer homogenen DNA-Verteilung liegt. Das paternale und maternale SNRPN Gen kann mit keinem der Parameter unterschieden werden. Zusätzlich wurde die schwerpunkt-basierte und randbasierte, relative radiale Position der beiden SNRPN Gene vermessen. Die randbasierte, relative radiale Position der beiden Markierungen kann unterschieden werden, eine liegt signifikant radial bei ca. 47%, die andere bei ca. 70%. Das Gen mit dem kleineren Volumen liegt in 65% (Ellipsoid) bzw. 71% (Kugel) der Zellkerne radial zentraler, das mit dem größeren Volumen radial peripherer.

Im zweiten Experiment wurde zur Berechnung der Halbwertsbreiten die PSF aus dem ersten Experiment verwendet, da keine PSF-Messung des CLSM (Leica LSM 410, LMU München) vorlag, weshalb alle absoluten Werte fehlerbehaftet sind. Es wurde die Volumina und Kompaktierungen von je 17 maternalen und paternalen Genen in 17 Zellkernen, analog zum ersten Experiment, berechnet. Das paternale und maternale Gen konnten mit keinem der verwendeten Parameter signifikant unterschieden werden. Die Messung der Volumina der SNRPN Gene aus der Zählung der Voxel wurde verworfen, da diese Methode das Volumen um einen Faktor 22.8 überschätzt. Die Resultate der Messungen des zweiten Experimentes müssen, aufgrund der geringen Menge an Meßwerten, unter sehr kritischen Gesichtspunkten betrachtet werden. Es kann jedoch aus diesem zweiten Experiment eine Tendenz abgelesen werden, dass es, in der Größenordnung in welcher die Messung vorgenommen wurde, keine Korrelation zwischen aktiven und inaktiven Genen und einer Dekondensation und Kondensation der DNA gibt. Anhand des ersten Experimentes, welches die statistisch zuverlässigeren Messungen beinhaltet, kann eine obere Abschätzung des Ellipsoid- und Kugelvolumen einer 200 kbp langen DNA-Sequenz angegeben werden. Das obere Ellipsoidvolumen entspricht $0.070 \mu\text{m}^3$, das obere Kugelvolumen $0.026 \mu\text{m}^3$.

Ein Modell der oberen abgeschätzten Volumina ist in Abbildung 7.38 zu sehen. Abbildung

7.38 **a** zeigt das aus dem ersten Experiment resultierende Modell, Abbildung 7.38 **b** das aus dem zweiten Experiment resultierende Modell.

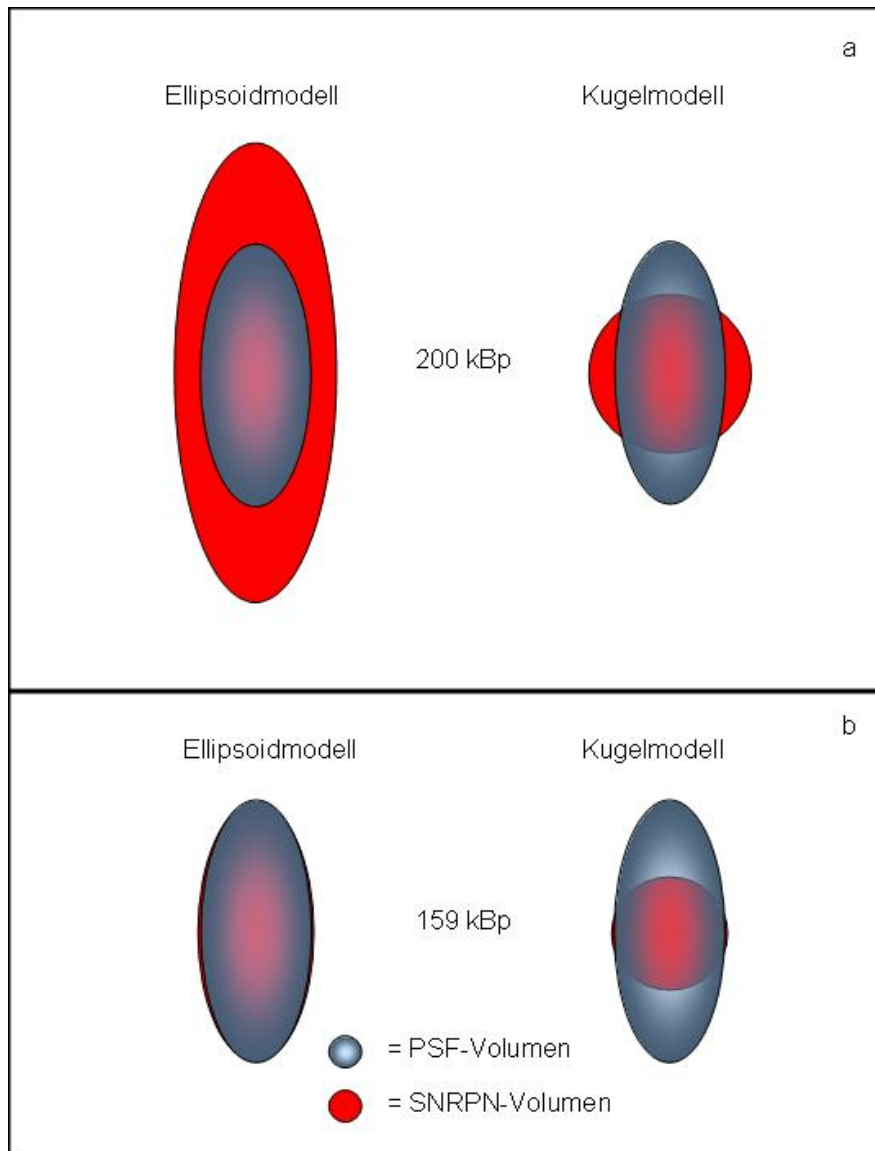


Abbildung 7.38: Die Abbildungen zeigen die Ellipsoidvolumina bzw. Kugelvolumina, welche sich aus mit dem hier vorgestellten Anpassungsalgorithmus ergeben, relativ zum gemessenen PSF-Volumen. Abbildung **b** zeigt das Modell für die 200kbp Sonde des ersten Experiments, Abbildung **b** das Modell für die 159 kbp langen DNA-Sonde des zweiten Experiments. Die PSF ist in blau, das Gen in rot dargestellt.

Kapitel 8

Diskussion und Ausblick

8.1 Vital COMBO-FISH

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, durch die Markierung der Zentromerregion 9 in lebenden primäre T-Lymphozyten mittels Mikroinjektion eines spezifischen PNA-Oligonukleotides, die Methode der vital COMBO-FISH, oder kurz vCF, entwickelt. Die vCF ermöglicht es Regionen im Genom, unter Ausschluß aller chemischen oder thermischen Behandlungen der Zellen, in lebenden primären T-Lymphozyten zu markieren und diese anschließend, nach einem Fixierungsschritt, zu beobachten. Die Spezifität der Zentromer 9 PNA-Oligonukleotidsonde wurde anhand eines Kolo-kalisationsexperimentes mit einer kommerziell erhältlichen Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde an fixierten Metaphasepräparaten gezeigt. Die Anzahl der Zellen mit den erwarteten zwei Zentromer 9 Signalen liegt bei 38%. Es wurde zusätzlich die Topologie der mittels vCF (PNA-Sonde) und FISH (kommerzielle DNA-BAC-Sonde) markierten Zentromere 9 in primären Interphase T-Lymphozyten verglichen und keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der Topologie zwischen der etablierten FISH-Methode und der vCF-Methode gefunden.

Die Markierung von Chromatinregionen des Genoms mittels in situ Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden (=FISH) ist eine Standardmethode zur quantitativen mikroskopischen Analyse des Genoms. Die Zellkerne werden hierbei vor dem eigentlichen Hybridisierungsschritt fixiert (Methanol/Eisessig, Ethanol oder Formaldehyd), die Membran permeabilisiert (Triton-X-100, Saponin) und die vorhandenen Proteine und RNA werden mittels enzymatischer Behandlung entfernt. Die Denaturierung der Ziel-DNA im Zellkern erfolgt bei ca. 72°C in 70% Formamid und während der Nachbehandlung erfolgen weitere Schritte bei Temperaturen von 40°-60°C. All diese Schritte haben einen destruktiven Einfluß auf die Chromatinstruktur und Substruktur der DNA, chromosomale Proteine und RNA, welche Teil der zu untersuchenden Substruktur des Chromatins sind. Eine quantitative Analyse der Genomarchitektur mittels hochauflösender Mikroskopie und Bildanalyse setzt aber eine nativ erhaltene Struktur des Chromatins voraus, weshalb schonende FISH-Methoden benötigt werden, welche diese erhalten. Die vCF stellt eine solche Methode dar. Das Einbringen der fluoreszenzmarkierten einzelsträngigen Sonde erfolgt bei vCF durch Mikroinjektion in den Zellkern der Zelle, sodass auf eine Permeabilisierung und weitere Vorbehandlung verzichtet wird. Die in situ Hybridisierung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂, in der lebenden Zelle, wobei kein Denaturierungsschritt der Ziel-DNA benötigt wird. Eine mechanische Beschädigung der Zellmembran bei der

Injektion oder die Toxizität der injizierten Sonde kann zunächst nicht ausgeschlossen werden, da ca 30-40% der Zellen, aufgrund zu hohen Injektionsdrucks (trotz Optimierung), bereits während der Injektion beschädigt werden. Da aber bei einer Kultivierungszeit von 24 Stunden davon auszugehen ist, dass die beschädigten Zellen innerhalb der ersten 1-3 Stunden [55] in Apoptose gegangen sind und sich vom Objektträger abgelöst haben, kann ausgeschlossen werden, dass beschädigte Zellen beobachtet bzw. diese identifiziert und nicht in die nachfolgenden Messungen mit einbezogen wurden. Es wird an dieser Stelle auf ein Experiment verwiesen, bei welchem die Permeabilisierung der Zellmembran mittels Glasbeads (Durchmesser 500 μm) und Schütteln erfolgte [78]. Die Zellen überlebten diese Prozedur mit einwandfrei erhaltener Morphologie. Die Ethanol-Fixierung der Zellen nach 24 Stunden dehydriert die Zellen und läßt diese abflachen, sodass die Annahme gemacht werden kann, die Substruktur des Genoms ist verändert. Die Annahme einer Zerstörung der Substruktur des Chromatins aufgrund der Ethanolfixierung, kann jedoch nicht aufrecht erhalten werden. Es wurde mittels scannender optischer Nahfeldmikroskopie (engl. SNOM) an Metaphase-Chromosomen gezeigt [117], dass der eigentliche Schritt, welcher zur Zerstörung der Substruktur des Chromatins führt, der Denaturierungsschritt und die Behandlung mit chaotropischen Detergenzien (z.B. Formamid) ist, auf welche aber bei vCF verzichtet wird. Die aus vCF resultierende Chromatinsubstruktur ist somit mindestens genauso gut bzw. besser erhalten, als die aus einer FISH Prozedur resultierende.

Herkömmliche einzelsträngige DNA-Sonden werden im Zellkern von lebenden Zellen, mit einer Halbwertszeit von 15-20 min, degradiert und aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wie anhand in den Zellkern mikroinjizierter fluoreszenzmarkierter DNA-Oligonukleotide gezeigt wurde [43]. Die Degradierung der DNA-Oligonukleotide erfolgt, indem Restriktionsnukleasen die Phosphordiesterbindung zwischen den Zuckerresten lösen, der Abtransport der degradierten Oligonukleotide ins Zytoplasma erfolgt über den Transportmechanismus der Zelle. Nach 24 Stunden wurde bei diesem Versuch, weder im Zellkern, noch im Zytoplasma, Fluoreszenz nachgewiesen, d.h. es waren keine DNA-Oligonukleotide mehr vorhanden. Die bei einer vCF verwendeten PNA-Oligonukleotide besitzen hingegen ein modifiziertes Rückgrat, d.h. die Bindung zwischen den Zuckerresten sind ungeladene Peptidbindungen, für welche Nukleasen keine Spezifität besitzen und somit die Bindung nicht lösen können. Im gleichen Versuch wurde zusätzlich gezeigt, dass PNA-Oligonukleotide eine zeitlich 30fach höher Verweildauer im Zellkern haben (bis zu 24 Stunden). Ein weiterer Grund, der für die Verwendung von PNA-Oligonukleotide spricht, ist die höhere Schmelztemperatur T_m einer PNA-DNA Bindung. Eine DNA-Sonde der in dieser Arbeit verwendeten Sonde hätte, unter in-vitro Bedingungen, eine Schmelztemperatur von $T_m = 32.51^\circ\text{C}$, bzgl. einer DNA-DNA Bindung (Berechnung nach [99], Corrigendum beachten), welche unterhalb der Atmosphärentemperatur der Zellen von 37°C in Kultur liegt. Die Schmelztemperatur der PNA-Oligonukleotidsonde liegt, unter in-vitro Bedingungen, für eine PNA-DNA Bindung bei $T_m = 40.21^\circ\text{C}$ (Berechnung nach [46]), also deutlich oberhalb der 37°C . Des weiteren haben PNA-Oligonukleotide die Eigenschaft, dass sich die Schmelztemperatur der PNA-DNA Bindung um $15\text{-}20^\circ\text{C}$ reduziert, wenn eine einzige Base fehlgepaart ist [92]. Diese Eigenschaft verhindert die Ausbildung von teilspezifischen Sekundärstrukturen der PNA-Oligonukleotid Sonde, welche bei DNA-Oligonukleotide zustande kommen. Einzelsträngige DNA-Oligonukleotid Sonden sind für eine vCF in lebenden Zellen nicht geeignet, weshalb auf deren Anwendung verzichtet wurde. Modifizierte DNA-Sonden, z.B. SMART-Probes, scheinen hingegen, aufgrund ihrer speziellen Sekundärstruktur, von der Degradierung ausgeschlossen, wie 2003 von Knemeyer et al. [63] gezeigt werden konnte. PNA-Oligonukleotid Sonden hingegen sind, aufgrund ihrer Eigenschaften, für die in-vivo Markierung

von spezifischen repetitiven Sequenzen mittels vCF besonders geeignet und wurden im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich angewendet.

Die hier vorgestellte vCF Methode unterläuft die allgemeine Vorstellungen bzgl. des in situ Hybridisierungsmechanismus. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Ziel-DNA im Zellkern doppelsträngig vorliegen und denaturiert werden muß, um anschließend, während der Renaturierungsphase, einen Doppelstrang mit der fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde auszubilden. Die Sonden-PNA der vCF Methode muß nicht denaturiert werden, da diese als einzelsträngige Sonde vorliegt und keine sekundären Strukturen in vitro ausbildet (siehe vorheriger Abschnitt). Die Ziel-DNA in lebenden Zellen liegt hingegen doppelsträngig vor und ist von Proteinen und RNA umgeben. Es wurden jedoch bereits 1997 Hinweise auf weitere mögliche in situ Hybridisierungsmechanismen von repetitiven fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden an fixierten Metaphase-Chromosomen bei 37°C gefunden [32], welche im Rahmen dieser Arbeit um weitere Mechanismen erweitert werden. Ein möglicher Mechanismus ist die Denaturierung der Ziel-DNA im Zellkern aufgrund des Fixierungsprozesses und eine anschließende in situ Hybridisierung der PNA-Sonde. Dies ist ein unwahrscheinlicher, aber nicht auszuschließender Mechanismus. Obwohl vier Stunden nach der Injektion der PNA-Sonden das Kulturmedium ausgetauscht wird, sodass die Zellen sich 24 Stunden in dem ausgetauschten Kulturmedium erholen, und die Zellen zusätzlich vor der Fixierung mit 1xPBS gewaschen werden, ist davon auszugehen, dass Reste der PNA-Sonde vorhanden sind. Eine Diffusion der einzelsträngig vorliegenden und ungebundenen PNA-Sonden aus dem Zellkern und deren Verteilung im gesamten Kulturmedium muß angenommen werden, da kein hoher Hintergrund in den fixierten Zellen vorhanden war¹. Die Aufnahmen, welche direkt nach der Fixierung ohne weitere Permeabilisierung und Behandlung gemacht wurden (siehe Abbildung 6.5) belegen dies, zeigen jedoch auch, dass, da der Zellkern einen schwachen Hintergrund aufweist, ein minimaler Anteil an Sondenresten vorhanden ist. Die Diffusion und Hybridisierung dieser im Zellkern verbliebenen Sondenreste zu einem spezifischen Zentromer 9 Signal während der Fixierungszeit (max. 600 s) kann aber, aufgrund folgender Rechnung, ausgeschlossen werden. Ausgehend von einem Diffusionskoeffizienten von $1.13 \times 10^{-11} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$ (siehe [7]), ergibt sich, bei einer max. Fixierungszeit von 600s aus der mittleren quadratischen Verrückung (engl. Mean square displacement=MSD) eine Diffusionskugel, in welcher sich das Teilchen bewegt, von $35.1 \mu\text{m}^3$. Wird eine Fixierungszeit von minimal 180 s angenommen, so ergibt sich eine Diffusionskugel von $5.6 \mu\text{m}^3$. Bei einem Zellkernvolumen von ca. $500 \mu\text{m}^3$ und einer Gleichverteilung der Sondenreste im Zellkernvolumen kann somit ausgeschlossen werden, dass derart spezifische Zentromer 9 Signale über eine Chromatinregion von ca. 1 MBp an 1-6 Stellen im Zellkern entstehen. Nicht ausgeschlossen wird, dass PNA-Sondenreste binden und die Zentromersignale verstärken. Eine zweite Variante ist eine tripelhelikale Bindung der PNA-Sonde an die doppelsträngige Ziel-DNA der lebenden Zelle [39][32]. Bei einer tripelhelikalen Bindung bindet die pyrimidinreiche PNA-Sequenz in parallele Richtung über Hoogsteen-Bindungen in der großen Furche des DNA-Doppelstrangs an die Homopurin-Sequenz der Ziel-DNA. Da die verwendete PNA-Sonde aus 11 Pyrimidin- und 7 Purinbasen besteht, ein ladungsfreies Rückgrat hat und PNA die Eigenschaft stabile tripelhelikale Bindungen auszubilden ($T_m > 85^\circ\text{C}$) [66], ist dies ein möglicher in situ Hybridisierungsmechanismus. Die Funktionsweise des tripelhelikalen in situ Hybridisierungsmechanismus bei 37°C und einschließlich eines Verzichts auf eine Denaturierung wurde anhand von

¹Eine Diffusion, anstatt einer Injektion in den Zellkern wurde verworfen, da die Sondenkonzentration im Zellkern zu gering wäre, und die Ablagerung der Sonde auf dem Objektträger einen fluoreszierenden Hintergrund bilden könnte.

31 DNA-Oligonukleotid Sonden, welche computerselektiert und spezifisch für die ABL-Region waren, bereits aufgezeigt [57]. Aufgrund des Absinkens der Schmelztemperatur und der daraus resultierenden geringeren Spezifität der PNA-Sonde, ist ein tripelhelikaler Mechanismus unwahrscheinlich. Eine dritte Variante der in situ Hybridisierung, ist ein Binden der Ziel-DNA während der Replikation und einem doppelsträngigen Binden der PNA an die dann einzelsträngig vorliegende Ziel-Sequenz. Größere Proteinkomplexe, z.B. die Replikationsmaschinerie scheinen hierbei die Zugänglichkeit von PNA-Oligonukleotid Sonden nicht zu beeinträchtigen [78], sodass die Möglichkeit einer Bindung der PNA-Oligonukleotid Sonde an die während der Replikation einzelsträngig vorliegende Ziel-DNA gegeben ist. Eine vierte Möglichkeit des in situ Hybridisierungsmechanismus ist eine Gleichgewichtsreaktion zwischen den Watson-Crick Bindungen der DNA-DNA und PNA-DNA mit der Zielsequenz. Die freie Enthalpie Wasserstoffbrückenbindungen beträgt zwischen 10 und 20 $\frac{kJ}{mol}$, was, im Vergleich zu kovalenten und ionischen Bindung ($>100 \frac{kJ}{mol}$), einer geringen Bindungsenthalpie entspricht. Die Anzahl an möglichen Bindungsstellen innerhalb der repetitiven Ziel-DNA der Zentromerregion 9 ist hoch, sodass die höhere Spezifität der PNA-Sonde einen Verdrängungsmechanismus induziert und sich, aufgrund der verwendeten PNA-Sonden-Konzentration, ein Gleichgewicht einstellt. Eine Kombination der letzten beiden Hybridisierungsmechanismen sollte ausreichen, um ein, mit dem CLSM gut sichtbares Zentromer 9 Signal, zu bewirken.

Der prozentuale Anteil an den ausgezählten T-Lymphozyten mit einem oder zwei Zentromer 9 Signalen entspricht 56% und die Anzahl der T-Lymphozyten mit 1-4 Zentromer 9 Signalen 88%. Die Anzahl der maximal sichtbaren Zentromere in der Interphase der T-Lymphozyten entspricht zwei, sodass 44% der T-Lymphozyten, in welchen drei bis sechs Signale sichtbar sind, nicht mit einer späten G2-Phase der T-Lymphozyten erklärt werden kann. Die Teilung der Chromosomen in ihre Chromatiden, sodass vier Zentromere sichtbar sind, findet erst in der Metaphase (Anaphase) statt, da aber nur Zellen in Interphase (G1-, S- und G2-Phase) ausgezählt wurden, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Es ist also davon auszugehen, dass in lebenden Zellen ein Fehl- und Nebenbindungsmechanismus vorliegt, der wegen der hohen Spezifität der PNA, eigentlich ausgeschlossen werden sollte, aber aufgrund der Vielfalt der möglichen Bindungen einer PNA [66], nicht ausgeschlossen werden kann. Von Tackett et al. [108] wurde 2002 von einer PNA-Klusterbildung, welche mittels der Veränderung der Polarisation gemessen wurde, bei Konzentrationen ab dem 5-10 μM -Bereich berichtet. Hierbei wurde von einer Selbstaggregation der PNA berichtet. Die Ursache könnte allerdings auch eine schlechte Löslichkeit der PNA-Sonde gewesen sein. Die von Tackett et al. [108] verwendete PNA-Sonde konnte allerdings "nur" mit einer maximalen Konzentration von 10 μM in Lösung gebracht werden, während die in dieser Arbeit verwendete Sonde bis zu einer Konzentration von 0.57 mM gelöst werden konnte. Eine Erklärung für die vereinzelt beobachteten Klusterbildung konnte der von Tackett et al. propagierte Mechanismus sein. Die bisher bei allen in situ Hybridisierungsmethoden mit Oligonukleotidsonden, die bei 37°C vorgenommen wurde, vorhandenen Fehl- und Nebenbindungsstellen (siehe [57] [32] [78]) werden somit von der vCF bestätigt.

Die relative radiale Position von Zentromeren 9 ist nicht zufällig und evolutionär konserviert [116] [4] [109] [23], weshalb diese ein geeigneter topologischer Parameter ist, um die Position der aus der vCF resultierenden Zentromeren 9 zu überprüfen. Es wurde die randbasierte relative radiale Position der Zentromere 9 in Interphase T-Lymphozyten einer kommerziellen Zentromer 9 DNA-Sonde und der Zentromer 9 PNA-Oligonukleotid Sonde gemessen und

miteinander verglichen. Die randbasierte relative radiale Position welche sich aus den beiden Experimente ergibt können nicht statistisch signifikant unterschieden werden. Zusätzlich wurden die absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9 für beide Experimente bestimmt, welche ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede aufweisen. Die Topologie des Zentromer 9, welche sich aus FISH und vCF Experimenten in Interphase T-Lymphozyten ergeben, stimmen überein, sodass die Aussage gemacht werden kann, es wurde, aus topologischer Sicht, die gleichen Zentromerregionen 9 markiert. Dies stützt die These, dass in denjenigen Zellen, in welchen das Zentromer 9 Signal mittels vCF markiert wurde, den tatsächlichen Zentromer 9 Signalen entspricht.

Zusammenfassung und Ausblick

Die entwickelte vital COMBO-FISH (vCF) ist ein weiterer Schritt in Richtung substrukturhaltender in situ Hybridisierung von spezifischen Chromatinregionen mittels fluoreszenzmarkierter PNA-Sonden. Die vCF Methode verwendet PNA-Sonden, welche für die Fluoreszenzmarkierung von Chromatinregionen in lebenden Zellen besonders geeignet sind. Dabei wird die PNA-Sonde in der lebenden Zelle hybridisiert und es wird auf einen Denaturierungsschritt verzichtet. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit der “proof of principle“ erbracht, dass die fluoreszenzmarkierung Markierung von DNA in lebenden Zellen möglich ist und die Topologie der aus vCF resultierenden Zentromermarkierung mit der aus FISH Experimenten übereinstimmt. Eine Steigerung der Effizienz bzgl. der Bindungssignale kann zukünftig über sogenannte “intelligente“ PNA-Proben erreicht werden, deren Fluoreszenz gering ist, wenn die Probe nicht an die Zielsequenz gebunden hat, und deren Fluoreszenz ansteigt, wenn die Probe an die Zielsequenz gebunden hat [64]. Die in-vivo Langzeitbeobachtung der hybridisierten PNA-Probe und die Kolo-kalisation mit z.B. einer grün fluoreszierenden proteinmarkierten Chromatinregion sind die folgerichtigen nächsten Schritte in Richtung Chromatinsubstruktur erhaltender in situ Hybridisierung, bei welcher auf eine thermische Behandlung und die Anwendung von chaotropen Reagenzien verzichtet wird.

8.2 Schwellwertalgorithmen und Tophatfilter

Die Reduzierung des Hintergrundes und die Schwellwertsetzung, an CLSM- oder Epifluoreszenzmikroskop – Aufnahmen von FISH Präparaten resultierenden digitalen 8 bit Bildstapeln, ist eine Standardtechnik der Bildverarbeitung. Die interessierenden biologischen Objekte (Zellkerne, Chromosomenterritorien usw.) werden von Artefakten und unspezifisch vorliegenden Sondenresten getrennt. Die Hintergrundreduzierung und Schwellwertsetzung bedeuten hierbei, dass, wenn eine Bildtiefe von 8 Bit (entspricht einem Grauwertbereich von [0, 255]) vorliegt, alle unterhalb eines bestimmten Grauwertes liegenden Werte auf 0 gesetzt werden. Das Definieren eines Hintergrund- und Schwellwertes ist jedoch, in Bezug auf die Aufnahmen von FISH-Präparaten, nicht eindeutig, da für die zu untersuchenden Objekte kein mathematisches Modell und keine klar definierten Objekte vorliegen. Im Allgemeinen werden diese bei Aufnahmen von biologischen FISH-Präparaten interaktiv und somit nicht reproduzierbar definiert. Die Reproduzierbarkeit von Messungen ist jedoch, wenn quantitative oder qualitative Aussagen gemacht werden sollen, ein unverzichtbares Mittel, um die aus den verschiedenen Messungen resultierenden Ergebnisse zu vergleichen. Für die quantitative Bildanalyse von FISH-Präparate sind Hintergrund- und Schwellwert, in Bezug auf die Grenzen von Chromo-

somenterritorien und die Position von Genen bzw. Chromosomenterritorien relativ zur Oberfläche der Chromosomenterritorien, entscheidende Faktoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vollautomatisierte zwei- und dreidimensionalen globale Isodata- und Otsu-Algorithmen mit vorheriger Hintergrundreduzierung implementiert und auf 56 bzw. 68 Chromosomenterritorien 18 bzw. 19 angewendet. Die resultierenden prozentualen Volumenanteile am Kernvolumen wurden mit den theoretischen prozentualen DNA-Anteilen der Chromosomenterritorien, unter der Annahme einer homogenen DNA-Verteilung, verglichen. Die theoretischen prozentualen Volumenanteile von Chromosomenterritorium 19 entsprechen 2.1% und die des Chromosomenterritoriums 18 2.5%. Die theoretischen Werte wurden zur Definition eines Vertrauensbereiches von 1.0% bis 3.0% für beide Chromosomenterritorien verwendet. Der einzige der vier Hintergrund- und Schwellwert-Algorithmen, dessen resultierenden prozentualen Volumenanteile innerhalb des Vertrauensintervall liegen, sind die des globalen dreidimensionalen Isodata-Algorithmus, weshalb nur dieser Ansatz weiter verfolgt wurde. Für das Chromosomenterritorium 19 ergibt sich ein prozentuales Volumen von 1.8 ± 1.0 und für das Chromosomenterritorium 18 ein Wert von 2.1 ± 0.6 . Die prozentualen Volumina beider Chromosomenterritorien liegen unterhalb der theoretischen Werte, was auf einen zu hohen Schwellwert hinweist. Das Verhältnis der beiden experimentellen prozentualen Volumina (prozentuales Volumen Chromosomenterritorium 19 zu 18) entspricht 0.9 ± 0.2 , das Verhältnis der theoretischen Werte 0.8. Die Verhältnisse stimmen innerhalb ihrer Fehlergrenzen überein. Diese Ergebnisse sind, trotz der hohen Standardabweichungen, akzeptabel, weshalb der globale dreidimensionale Isodata-Algorithmus für die weiteren Anwendungen in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die Überschätzung der Schwellwerte, die daraus resultierenden unterhalb der theoretischen Werte liegenden prozentualen Volumina und die hohen Standardabweichungen zeigen auf, dass der globale dreidimensionale Isodata-Algorithmus nicht dazu verwendet werden kann, um reelle absolute Volumina von Chromosomenterritorien anzugeben. Eine Abschätzung der Morphologie mittels Volumina resultiert aufgrund der Überschätzung der Schwellwerte immer in zu niedrigen prozentualen Volumina. Ein Kondensationsunterschied der DNA zwischen dem genreichen Chromosom 19 und dem genarmen Chromosom 18 ist, wie das Verhältnis der Volumina aufzeigt, nicht vorhanden. Das Verhältnis der prozentualen Volumina der Chromosomenterritorien 19 zu 18 müßte, wenn eine Kondensation vorliegen würde, deutlich oberhalb des theoretischen Wertes liegen. Der globale dreidimensionale Isodata-Algorithmus ist jedoch, gerade aufgrund seiner Überschätzung, dazu geeignet biologische Objekte für topologische Messungen, welche mit den Intensitätsschwerpunkten arbeiten, von ihrem biologischen Hintergrund und Rauschen zu trennen. Die Überschätzung des Schwellwertes liefert klar definierte und voneinander zu trennende Objekte, sodass eine Segmentierung und die Berechnung der Intensitätsschwerpunkte eindeutig ist. Da Intensitätsschwerpunkte mit den Grauwerten gewichtet werden, ist deren Stabilität bei Verzicht auf die niedrigen Grauwerte des Objektes gewährleistet.

Der implementierte Algorithmus verzichtet, im Gegensatz zum interaktiven Setzen von Schwellwerten (siehe [34] [71]), auf ein subjektives und somit nicht reproduzierbares Eingreifen des Experimentators in den Prozeß der Hintergrund- und Schwellwertsetzung. Der in Edelman et al. [34] angewendete Cavalieri-Estimator verwendet zwar ein ganzes Schwellwertintervall, berechnet innerhalb dieses Intervalls alle Parameter und mittelt diese, aber das Intervall wird subjektiv und somit nicht reproduzierbar vom Experimentator definiert. Die Definition eines einzigen interaktiv definierten Schwellwerts [71] auf Chromosomenterritorien, von deren Oberfläche der Abstand eines Gens gemessen wird, ist ebenfalls subjektiv und nicht reprodu-

zierbar. Das Gen könnte weiter innen liegen, wenn der Schwellwert zu hoch gesetzt wird, und weiter außen, wenn ein zu niedriger Schwellwert verwendet wird. Die aus den Messungen resultierenden biologischen Interpretationen, der in den beiden Arbeiten gemessenen Parameter Volumen und Position eines Gens relativ zur Oberfläche von Chromosomenterritorien, könnten mit in die Anwendung des interaktiven Schwellwertes eingeflossen sein. Es kann also nicht zwischen den vom Experimentator erwarteten und den aus dem Experiment resultierenden Ergebnissen unterschieden werden. Die Schwellwerte müssen anhand eines reproduzierbaren Kriteriums und ohne Einfluß des Experimentators definiert werden. Der Hintergrundwert und der aus dem globalen Isodata-Algorithmus resultierende Schwellwert basiert auf einem solche Kriterium (siehe Kapitel 5.1.2 und 5.1.3), als Hintergrundwert wird das Grauwertmaximum und als Schwellwert das arithmetische Mittel der Maxima des Grauwertistogramms definiert. Die Schwellwerte werden somit ohne Einfluß des Experimentators automatisiert nach einem definierten Kriterium kalkuliert.

Die Detektion und Segmentierung von mittels FISH markierten Genloci, in der Größenordnung der PSF, erfolgt mit einem zweidimensionalen lateralen Tophatfilter. Der entwickelte Tophatfilter ist ein modellbasierter Algorithmus und eine Erweiterung des dreidimensionalen Tophatfilters nach Bornfleth et al. [8]. Es fließt bei diesem Ansatz die Abschätzung der Größe der zu detektierenden Objekte mit in den Algorithmus mit ein. Der Tophat-Algorithmus rastert das Bild mit einer inneren Maske, deren Größe der PSF entspricht, und einer äußeren Maske, deren Größe einem Hintergrundbereich entspricht, pixelweise ab und untersucht die Grauwertunterschiede zwischen der inneren und äußeren Region. Sind diese größer als ein definierter Wert, so wird das Pixel als dem Objekt zugehörig angesehen, sind diese kleiner, so wird der Grauwert des Pixels unterdrückt. Der Tophat-Algorithmus wird, um eine schnellere Rechenzeit zu erreichen, auf die zweidimensionale Maximumsprojektion angewendet. Der Algorithmus wurde mit einem Parameter r versehen, der es dem Experimentator ermöglicht, die Gegebenheit des biologischen Hintergrundes abzuschätzen und diese mit in den Algorithmus einfließen zu lassen. Der Parameter, muß, aufgrund oben diskutierter Reproduzierbarkeit anhand eines definierten Kriteriums, bei Anwendung des Tophatfilters für alle Datensätze eines Experiments der Gleiche sein. Eine zweite Erweiterung ist die Nummerierung der detektierten Objekte. Den mittels Tophat detektierten Objekten wird eine Nummer zugewiesen, sodass diese bei allen weiteren Messungen identifiziert werden können [33].

Der Tophatfilter wurde zur Detektion und Segmentierung der BCL2-Signale, der Bead-Signale und SNRPN-Signale verwendet. Die Bead-Signale konnten mit einer Effizienz von 97.5%, die BCL2-Signale mit einer Effizienz von 91.0% und die SNRPN mit einer Effizienz von 90% detektiert und segmentiert werden. Die Effizienzen ergaben sich alle mit einer konstanten Einstellung des Parameters $r=0.5$. Die hohe Effizienz von 97.5%, welche sich bei der Detektion der Bead-Signale ergibt, zeigt, dass der Tophatfilter, unter optimalen optischen Bedingungen, d.h. geringer Hintergrund und hohe Photonenausbeute, eine optimale Leistungsfähigkeit hat. Diesem Resultat wird die Effizienz von 89.9% der SNRPN-Signale gegenübergestellt, welche mit den gleichen Einstellungen, welche bei den Beads verwendet wurde, des CLSM (gleiches Pinhole, gleiches Objektiv) aufgenommen wurden. Die Effizienz reduziert sich bei Anwendung auf biologischen Präparate, da auch unspezifische Hybridisierungssignale detektiert werden. Da die Hybridisierung jedoch Zellzyklus unabhängig erfolgte, weshalb auch mehr als zwei der erwarteten SNRPN-Signale vorhanden sein können, und Zellen mit mehr als zwei Signalen nicht mit in die Effizienzberechnung miteinbezogen wurden, entspricht das Ergebnis einer unteren

Effizienzabschätzung. Das gleiche Ergebnis gilt für die BCL2-Signale, welche ebenfalls Zellzyklus unabhängig hybridisiert wurden. Die Erweiterung des Tophat-Algorithmus, um den vom Experimentator zu setzenden Parameter r , ist bzgl. der Reproduzierbarkeit zu rechtfertigen, da keine morphologischen Messungen mit den resultierenden Datensätzen vorgesehen sind. Die biologischen Objekte werden mit dem Algorithmus lediglich detektiert und segmentiert, um anschließend, anhand des Intensitätsschwerpunktes z.B. Startparameter für den hier entwickelten Anpassungsalgorithmus oder die relative radiale Position zu berechnen. Der Parameter hat den Vorteil, dass bekannte biologische Parameter in den Detektionsprozeß miteinfließen. Die Effizienzen, welche aus den BCL2- und SNRPN-Signalen resultieren, stimmen, aufgrund dieses eingeführten Parameters r , mit den Effizienzen Bornfleth et al. [8] (zwischen 90.1% und 96.6%) für simulierte Objekte annähernd überein. Der weiterentwickelte Tophat-Algorithmus mit integrierter Objektdetektion ermöglicht in Zusammenhang mit den entwickelten Analysealgorithmen eine automatisierte Auswertung der digitalen Datensätze.

Zusammenfassung und Ausblick

Der globale dreidimensionale Isodata-Algorithmus berechnet den Schwellwert vollautomatisiert und unabhängig vom Experimentator anhand des Grauwertistogramms. Eine Anwendung für morphologische Messungen ist, aufgrund der Standardabweichungen und der Schwellwertüberschätzung, nicht sinnvoll. Für topologische Messungen, bei welchen das biologische Objekt klar definiert vorliegen muß, um dessen Intensitätsschwerpunkt zu berechnen, ist der Algorithmus geeignet. Eine optimale vollautomatisierte Objekterkennung ist zukünftig nur möglich, wenn ein Modell der biologischen Objekte vorliegt, sodass eine Anpassung über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermöglicht wird. Eine Weiterentwicklung des globalen dreidimensionalen Isodata-Algorithmus kann zukünftig durch die Kombination mit experimentell belegtem Wissen (siehe z.B. Tophatfilter) oder ganz neue Ansätze (z.B. Kantendetektion von Chromosomenterritorien) erreicht werden.

Der erweiterte Tophat-Algorithmus detektiert und segmentiert biologische Objekte in der Größenordnung der PSF mit einer Effizienz von ca. 90% und von optisch optimalen Objekten mit einer Effizienz von 97.5%. Der neu eingeführte Parameter r ermöglicht dem Experimentator, im Rahmen der Reproduzierbarkeit, experimentelles Vorwissen in den Algorithmus mit einfließen zu lassen. Die Nummerierung der Objekte ermöglicht eine schnelle und automatisierte Verarbeitung der resultierenden digitalen Bilder.

Eine Weiterentwicklung des Algorithmus könnte durch eine benutzerdefinierte Maske erreicht werden. Hierzu müßte die Maske vom Benutzer als einzulesender Parameter vorgegeben werden. Es würden dann nur die Objekte detektiert werden, welche der vom Benutzer vorgegebenen Größe entsprechen.

8.3 Relative radiale Positionierung

Die topologische Genomarchitektur von Chromosomenterritorien, Zentromeren und Genen in Zellkernen ist aktuell Gegenstand der Forschung. Die relative radiale Position von genreichen und genarmen Chromatinregion bzw. großen und kleinen Chromosomenterritorien (in Abhängigkeit von der MBp-Zahl) im Zellkern wird hierbei eine entscheidende Funktion zugeordnet. Die relativen radialen Positionen von Chromosomenterritorien variieren zelltypspezifisch und in Abhängigkeit von ihrer Größe (siehe ausgewählte Arbeiten [4] [10]).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die randbasierte relative radiale Positionierung eines Objektes

entwickelt. Hierzu werden zunächst die minimalen Distanzen aller Punkte innerhalb des Zellkerns zur Zellkernhülle berechnet und diese auf die maximale Minimaldistanz normiert. Dies entspricht einer Abbildung der minimalen Distanzen vom Zellkernrand in eine Einheitskugel mit einem Wertebereich von $[0, 1]$, welcher dem invertierten Wertebereich der schwerpunkt-basierten Positionierung entspricht. Die Werte werden aus diesem Grund invertiert und, analog obiger Rechnung, mit einem Faktor 100 multipliziert, sodass die Wertebereich der beiden Methoden übereinstimmen. Die Position einer Chromatinregion ergibt sich aus der Position der Intensitätsschwerpunkte, analog der schwerpunkt-basierten Methode.

Die Berechnung der minimalen Distanzen erfolgt anhand von Distanztransformationen (=DT), wobei zwei unterschiedliche DT implementiert wurden, die Chamfering DT und die euklidische DT. Die Chamfering DT wurde mit einer erweiterten Manhattan Metrik implementiert [79] und benötigt eine geringe Laufzeit, mit dem Nachteil, dass die berechneten Distanzen überschätzt werden. Die Implementierung der euklidische DT erfolgte, indem eine von Yamada et al. [118] verwendete zweidimensionale DT-Maske auf drei Dimensionen erweitert wurde. Diese ist exakt, hat allerdings, aufgrund der hohen Anzahl an Rasterungen des Bildes, eine wesentlich längere Laufzeit. Beide DT wurden in Algorithmen implementiert und die resultierenden absoluten Distanzen der Intensitätsschwerpunkte der Chromosomenterritorien 18 und 19 vom Zellkernrand in den gleichen Zellkernen miteinander verglichen.

Die Chamfering DT überschätzt die Mittelwerte der absoluten Distanzen für die beide Chromosomenterritorien um 0.16 bis 0.17 μm und es kann für das Chromosomenterritorium 19 ein signifikanter Unterschied $p < 0.05$ zwischen den beiden Methoden nachgewiesen werden. Da der Fehler linear mit der gemessenen Distanz skaliert [5] [30], entspricht dies einem Fehler von 450-480 nm in einem Zellkern mit einem Radius von 5 μm , welcher ca. 10% entspricht, weshalb die Chamfering DT in dieser Arbeit nicht weiter angewendet wurde. Die Anwendung der Chamfering DT sollte allerdings nicht generell verworfen werden, da, wenn der Fehler bzw. die Genauigkeit mit welcher gemessen wird, oberhalb des Fehlers von 0.45 bis 0.48 μm liegt, der Laufzeitvorteil der Chamfering DT (Faktor 20 bis 30 bzgl der Anzahl der Abrasterungen) überwiegt. Liegt die Genauigkeit unterhalb dieses Fehlers, so muß, um exakt zu messen die euklidische DT verwendet werden.

Der Vergleich der entwickelten randbasierten und der vorhandenen schwerpunkt-basierten Methoden zur Messung der relativen radialen Positionen, wobei für die randbasierte Methode, aus oben genannten Gründen, nur die euklidische DT verwendet wurde, erfolgte anhand der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblasten Zellkernen und der Chromosomenterritorien 18 bzw. der BCL2 Gene in unterschiedlichen Cervix-Gewebeschichten.

8.3.1 Die randbasierte und schwerpunkt-basierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19

Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 können mittels KS-Test nicht statistisch signifikant unterschieden werden, die der Chromosomenterritorien 19 können hingegen statistisch signifikant unterschieden werden $p < 0.05$. Die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 können hingegen mittels KS-Test nicht statistisch signifikant unterschieden. Zusätzlich wurden die Differenzen für die resultierenden Meßwerte des gleichen Chromosomenterritoriums miteinander verglichen. Die Differenzen zwischen den relativen radialen Positionen der Chro-

mosomenterritorien 18 bzw. 19, welche aus den beiden Methoden resultieren, stimmten nur für 10.71% bzw. 22.06% der Meßwerte überein oder umgekehrt es stimmten 89.29% bzw. 77.94% der Meßwerte nicht überein.

Im Jahre 1999 wurde von Croft et al. [29] die relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und 19 in zweidimensionalen Fibroblastenzellkernen mittels eines 2D-Algorithmus berechnet. Die relativen radialen Positionen ergeben sich aus der Einteilung der zweidimensionalen Zellkernfläche, welche aus der Projektion des gefärbten Zellkerns berechnet wurde, in fünf Schalen, die alle eine gleichgroße Fläche hatten. Abschließend wurden das Grauwertverhältnis zwischen den Chromosomenterritorien 18 und 19 und der DAPI-Zellkernfärbung für jede eingeteilte Schale berechnet, wobei zunächst der mittlere Grauwert von den Territorienwerten subtrahiert wurde. Die Positionen wurden anhand der minimalen Distanz zwischen den Intensitätsschwerpunkten der Chromosomenterritorien und dem Zellkernrand berechnet und auf den Radius des kartierten Zellkerns normiert. Es zeigte sich, dass das Chromosomenterritorium 18 in primären Fibroblasten radial peripher, das Chromosomenterritorium 19 radial zentral liegt. Von Boyle et al. [10] wurden diese Messungen 2001 mit dem gleichen Algorithmus bestätigt und zusätzlich alle weiteren Chromosomen des Genoms untersucht. Resultat dieser Arbeit ist ein genabhängiges Modell, genarme Chromosomen (z.B. Chromosom 18) befinden sich radial peripher, genreiche Chromosomen (z.B. Chromosom 19) befinden sich radial zentral. Der gleiche Algorithmus wurde 2000 von Bridger et al. [14] dazu verwendet zwischen alternden, ruhenden und proliferierenden Fibroblasten zu unterscheiden. Es zeigte sich, dass in proliferierende Fibroblasten das Chromosomenterritorium 18 peripher und Chromosomenterritorium 19 zentral lokalisiert ist, während in ruhenden und alternden Fibroblasten das Chromosomenterritorium 18 sich in eine radial zentralere Position bewegt. Der Nachteil dieser zweidimensionale Analyse ist, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das genreiche Chromosomenterritorium 19 sich immer in eine Richtung senkrecht zur 2D-Bildebene ausrichtet und das genärmere Chromosomenterritorium 18 immer innerhalb der Bildebene in Richtung Peripherie, dass ein formabhängiger Effekt vorliegt. Aus diesem Grund ist eine dreidimensionale Analyse unabdingbar. Die Einteilung der Zellkernfläche in fünf Schalen gleicher Fläche verhindert den Effekt einer nach außen hin zunehmenden Schalenfläche, sodass eine Überbewertung der DNA-Verteilung in den äußeren Schalen ausgeschlossen wird. Die konstanten Schalenflächen verändern allerdings die Distanzverhältnisse der Schalen zum Rand. Der Grund für diese Änderung ist der größere Radius der inneren Schalen (gegenüber den äußeren Schalen), der aufgrund der Anpassung der Flächen benötigt wird. Aus dieser Anpassung resultieren innere Schalen mit großen Radien und äußere Schalen mit kleinen Radien. Die Einteilung der Radien ähnelt der der randbasierten relativen radialen Positionierung in 2D, jedoch werden nicht äquidistante Flächen zum Zellkernrand, sondern gleiche Flächeninhalte verwendet.

Ein weiterer Algorithmus wurde von Cremer et al. 2001 [22] eingeführt, welcher auf einer schwerpunkt-basierten Methode beruht und, im Gegensatz zum vorherigen Modell, dreidimensionale Datensätze analysiert (Erklärung siehe Kapitel 4.1). Die dreidimensionale, relative radiale Positionierung einer Chromatinregion innerhalb des Zellkerns erfolgt, indem die Intensitätsschwerpunkte der Chromatinregionen und des Zellkerns bestimmt werden, die radialen Strecken Zellkernschwerpunkt – Chromatinschwerpunkt und Zellkernschwerpunkt – Chromatinschwerpunkt – Zellkernhülle berechnet werden und das Verhältnis der ersten zur zweiten Strecke gebildet wird (siehe Kapitel 4.1 und 5.3). Diese Methode bildet die radialen Streckenverhältnisse in eine Einheitskugel ab, sodass ein Wertebereich von $[0, 1]$ entsteht. Der Wertebereich wird, um eine prozentualen radialen Wertebereich zu erhalten, mit einem Faktor

100 multipliziert. Die Volumina der Schalen sind bei dieser Methode, im Gegensatz zu den Flächen bei der Methode von Croft et al. [29], nicht gleichgroß, sondern nehmen zur Peripherie hin zu. Die schwerpunkt-basierte relative radiale Positionierung wurde ebenfalls auf die Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblasten angewendet. Es zeigt sich, dass beide Chromosomenterritorien radial zentral bis mittig lagen. Das Resultat von Bridger et al. [14] wurde bestätigt, war jedoch statistisch nicht signifikant. Es zeigt sich, aufgrund der Untersuchung der radialen Position weiterer Chromosomen, dass die großen Chromosomen (in Bezug auf die MBp) radial peripher und die kleinen radial zentral lagen. Aufgrund dieser Resultate ergab sich ein Modell in Abhängigkeit von der Größe der Chromosomen [107] [4].

Im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Methode der randbasierten relativen radialen Positionierung bestätigt zwar das von Bolzer et al. [4] propagierte Modell, auch bzgl. der proliferierende und ruhenden Fibroblasten, jedoch zeigen sich gleichzeitig große Unterschiede in Bezug auf die Meßmethode. Die relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 ist radial zentral bis mittig (bei schwerpunkt-basierter und randbasierter Messung), jedoch ist die schwerpunkt-basierte Position der Chromosomenterritorien 18 und 19, unabhängig von der Zellzyklusphase gemessen, statistisch signifikant unterschiedlich. Die randbasierte Positionsmessung hingegen weist, für den gleichen Datensatz, keine Signifikanz auf. Werden die Differenzen der Einzelmesswerte der beiden Methoden bzgl. des gleichen Chromosomenterritoriums im gleichen Zellkern miteinander verglichen, so zeigt sich, dass nur eine geringe Anzahl an Chromosomenterritorien die gleiche radiale Position aufweisen. Diese Messung ist der eigentlich wichtige Hinweis darauf, dass die randbasierte und schwerpunkt-basierte Methode nicht übereinstimmen. 79% (Chromosom 18) bzw. 57% (Chromosom 19) der Meßwerte weisen eine Differenz von $>10\%$ auf. Die übereinstimmenden Ergebnisse in Bezug auf die mittleren radialen Positionen resultiert lediglich aus einer Gaußverteilung der Positionsdifferenzen.

Der Unterschied ergibt sich aus der in Kapitel 4.1 erwähnten Verzerrung der radialen Position bei schwerpunkt-basierter Messung in flachen und unregelmäßig geformten Zellkernen. Die hier verwendeten Fibroblasten sind flache ellipsoide Zellkerne, weshalb die Abbildung der radialen Streckenverhältnisse in eine Einheitskugel entlang der "kleinen Halbachse" in einer anderen Definition von radial zentral und radiale peripher resultiert, als entlang der "großen Halbachse". Die randbasierte relative radiale Position ist hingegen von dieser Formänderung nicht betroffen, da die Änderung der Halbachsen nicht in den Bezugspunkt miteinfließen.

Das von Bolzer et al. [4] propagierte Paradoxon in Bezug auf die Ergebnisse in Fibroblasten von Boyle et al. [10] kann somit aufgelöst werden. Die korrekte Positionierung in flachen und unregelmäßig geformten Zellkernen erfolgt mittels der hier vorgestellten randbasierten Methode, denn diese gibt die unverzerrte relative radiale Position in Abhängigkeit von der Zellkernhülle wieder. Die schwerpunkt-basierte relative radiale Position hingegen kann in kugelförmigen Zellen und zur Messung der radialen Streckenverhältnisse verwendet werden. Die von Croft et al. [29] verwendete Methode in zwei Dimensionen muß auf drei Dimensionen erweitert werden, da diese den DNA-Gehalt in Abhängigkeit vom Zellkernrand angibt. Die gleichen Volumina der Schalen vermeiden eine Verzerrung des radialen DNA-Gehalts, welche sich bei Anwendung der schwerpunkt-basierten Methode, aufgrund der radial nach außen zunehmenden Volumina ergibt. Die Methode der gleichen Volumina kann jedoch nicht zur Messung von relativen radialen Positionen verwendet werden, da die Radien, aufgrund der gleichen Volumina verzerrt sind. Die hier vorgestellte randbasierte relative radiale Positionierung und eine erweiterte Methoden nach Croft et al. [29] (bzgl. DNA-Gehalt) können somit als die geeigneten Methoden in flachen und unregelmäßig geformten Zellkernen angesehen werden, wenn der Frage nachgegangen werden soll, ob genarme und genreiche bzw. große und kleine Chromosomenterritorien

einen großen oder kleinen Abstand vom Zellkernrand haben, also radial zentral oder peripher liegen.

8.3.2 Die randbasierte und schwerpunktbasierte, relative radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene

Die im vorigen Kapitel dargelegte Diskrepanz zwischen schwerpunktbasierter und randbasierter relativer radialer Positionierung kann anhand der aus beiden Methoden unterschiedlichen resultierenden radialen Modellen (siehe Kapitel 7.2.4) der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene in Apikal-, Intermediär-, Basal- und Karzinom-Cervix-Gewebe belegt werden.

Das **schwerpunktbasierte** Modell:

Im Basalgewebe liegen die Chromosomenterritorien 18 radial statistisch signifikant unterschiedlich, das eine radial peripherer, das andere radial zentraler (51% und 72%). Die gleiche Aussage kann für die beiden BCL2-Gene abgeleitet werden (48% und 71%). Während der Differenzierung, also im Intermediär- und Apikalgewebe wird eine relative radiale Position eingenommen, welche für die beiden Chromosomenterritorien 18 und beiden BCL2 Genen übereinstimmt (zwischen 58%-64%) und zwischen den beiden Positionen des Basalgewebes liegt. Es liegt die nicht signifikante Tendenz vom Basalgewebe über das Intermediärgewebe hin zum Apikalgewebe einer immer mehr radial zentraleren Position sowohl für das Chromosomenterritorium 18, als auch das BCL2 Gen vor. Im Cervix-Karzinomgewebe gleichen sich die relativen radialen Positionen der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene der des Basalgewebes wieder an, wobei nicht signifikant unterschiedliche, radial peripherere Positionen eingenommen werden. Interessanterweise können die sortierten Verteilungen des Basal- und Karzinomgewebes unterschieden werden, während die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen in keiner der untersuchten Gewebeschichten mit dem KS-Test signifikant unterschieden werden können.

Das **randbasierte** Modell:

Im Basalgewebe liegen die Chromosomenterritorien 18 radial bei 66% und weisen keine signifikanten Unterschiede auf, während von den beiden BCL2 Genen eines signifikant radial zentral (50%) und das Zweite peripher (77%) liegt. Im Intermediär- und Apikalgewebe stimmen die radialen Positionen mit denen des schwerpunktbasierten Modells im wesentlichen überein. Unterschiede ergeben sich bzgl. des Karzinomgewebes. Bei Messung mit der schwerpunktbasierten Methode ergibt sich eine radiale Position, welche mit der des Basalgewebes übereinstimmt, während die randbasierte Methode eine Positionen für beide Chromosomenterritorien 18 (69%) und beide BCL2 Gene (69%) aufzeigt, welche radial peripher sind. Auch ergeben sich statistische Unterschiede anhand der normiert kumulierten Häufigkeitsverteilung, dass äußere BCL2 Gen unterscheidet sich signifikant vom radial peripher liegenden des Basalgewebes und sowohl das Chromosomenterritorium 18, als auch das BCL2 Gen, des Apikalgewebe unterscheidet sich signifikant vom Karzinomgewebe. In beiden Fällen liegt das Chromosomenterritorium 18 und das BCL2 Gen deutlich radial zentraler.

Der Unterschied zwischen den beiden Modellen kann anhand der Differenz der Meßwerte erklärt werden. Hierzu wurden die Meßwerte des gleichen Chromosomenterritoriums 18 und des BCL2 Gens im gleichen Zellkern, welche aus der randbasierten und schwerpunktbasierten Messung resultieren, voneinander subtrahiert (Randbasiert-Schwerpunktbasiert). Für 50-51% der Meßwerte weisen die beiden Methode Unterschiede auf, welche nur aufgrund der Gaußverteilung der Differenzen zwischen den beiden Methoden um 0, bei der Berechnung der Mittelwerte kompensiert werden. Die gemessenen Unterschiede zeigen, dass die Wahl der Methode entschei-

dend ist. Die im Kapitel 7.2.4 gezeigte Abbildung 7.28 verdeutlicht, dass alle verwendeten Zellen flach und die Karzinomzellen unregelmäßig geformt sind. Da aber die randbasierte Methode zur Messung der relativen radialen Position in diesen Zelltypen die Meßwerte eindeutig weniger verzerrt, wird das hier vorgestellte schwerpunktbasierte Modell des Chromosom 18 und BCL2 Gens verworfen. Die randbasierte Methode stützt die von Sun et al. [107] und Bolzer et al. [4] propagierte größenabhängige radiale Position, das Chromosom 18 ist ein kleines Chromosom (79MBp.), und die von Bridger et al. [14] und Bolzer et al. [4] radial peripherere Position in proliferierenden Zellen (Karzinomgewebe und Basalgewebe), als in den alternden bzw. ruhenden Zellen (Intermediär- und Apikalgewebe).

8.3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit die Methode der relativen radialen Positionierung von Chromatinregionen im Zellkern etabliert werden. Die randbasierte Kartierung des Zellkerns wird mittels DT realisiert und es wurden hierzu zwei Ansätze, die Chamfering DT und euklidische DT, gewählt. Die Chamfering DT wurde aufgrund der fehlerbehafteten Ergebnisse verworfen, die euklidische DT weiter verwendet. Im nächsten Schritt wurde die etablierte schwerpunktbasierte und die randbasierte Methode verglichen. Die schwerpunktbasierte Methode bildet die radialen Streckenverhältnisse zwischen Zellkernschwerpunkt – Objekt zu Zellkernschwerpunkt – Objekt – Zellkernhülle auf eine Einheitskugel ab. Die randbasierte Methode bildet die Distanzverhältnisse zum Zellkernrand auf eine Einheitskugel ab. Die beiden Methoden wurden anhand der relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in Fibroblastenzellkernen miteinander verglichen, wobei sich einerseits zeigt, dass die randbasierte Methode keine Unterschiede aufweist, während die schwerpunktbasierte Methode für den gleichen Datensatz bei gleichen Randbedingungen Unterschiede bzgl. der radialen Position aufweist. Im nächsten Schritt wurden die Differenzen der Einzelmessungen berechnet, wobei sich zeigte, dass diese zu 50% unterschiedlich sind, die Mittelwerte aber, aufgrund der Gaußverteilung der Differenzen, ähnlich sind. Die bessere Meßmethode in Bezug auf die flache und unregelmäßige Form der Zellkerne ist die **randbasierte** relative radiale Positionierung, da diese die Meßwerte, aufgrund der nicht in den Bezugspunkt miteinfließenden Halbachsen, nicht verzerrt. Gleichzeitig konnte eine geeignete Methode zur die Messung des radialen DNA-Gehalts hergeleitet werden, die Volumina der verwendeten radialen Schalen müssen dabei gleichgroß sein, sodass alle Schalen gleiche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten haben. Mit dieser Methode können keine Abstände gemessen werden, da diese verzerrt sind. Es kann somit einerseits die von Bolzer et al. [4] propagierte Diskrepanz mit Boyle et al. [10] erklärt werden und andererseits die von Bolzer et al. [4] gemessene weder zentrale noch periphere relative radiale Position der kleinen Chromosomenterritorien 18 und 19 bestätigt werden.

Die Unterschiede zwischen der schwerpunktbasierten und randbasierten Methode wurde anhand der unterschiedlichen resultierenden Modelle bzgl. des gleichen Datensatzes der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene in Cervix-Gewebe aufgezeigt. Auch die große Differenz der Einzelmesswerte konnte anhand dieses Datensatzes aufgezeigt werden.

Für die Analyse von Zellkernen, insbesondere ellipsoide und beliebig geformte Tumorzellen, sollten zukünftig weitere Algorithmen zur randbasierten, relativen radialen Positionierung entwickelt werden, um eine schnellere Datenverarbeitung zu gewährleisten. Der implementierte Algorithmus sollte auf alle bisher bzgl. ihrer schwerpunktbasierten, relativen radialen Position untersuchten Datensätze nochmals angewendet werden, um Interpretationsfehler zu vermeiden. Im weiteren sollte die vorgeschlagene Methode der gleichen Volumina implementiert

werden, sodass nicht nur die Positionen, sondern auch die Verteilungen gesamter Chromosomenterritorien untersucht werden können.

8.4 Ellipsoidanpassung

Die Simulation von Chromatinmodellen, z.B. das sphärische 1MBp Chromatin Modell (=engl. 1MBp SCD), tragen einen wesentliche Teil zum Verständnis der Genomarchitektur bei. Der Vergleich zwischen Simulation und Experiment ist hierbei in beide Richtungen nötig, die Experimente dienen der Verfeinerung des Modells und die Simulation liefert Hinweise für weitere experimentell zu untersuchende Aspekte bzgl. der Genomarchitektur. Die beim 1MBp SCD Modell verwendeten Zellkerne entsprechen Ellipsoiden und Kugeln. Die Chromosomenterritorien, welcher anschließend mit experimentellen Daten verglichen wird, werden hierbei in einem Zellkern simuliert, dessen Form vor der Simulation festgelegt wird. Eine Verbesserung der Rahmenbedingung für den Vergleich zwischen Experiment und Simulation wäre, wenn für jeden experimentellen Zellkern individuell an diesen Zellkern angepaßter Ellipsoid bzw. eine Kugel zur Verfügung stünde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Algorithmus entwickelt, der Ellipsoide anhand eines Ellipsoidmodells und mittels Lagranger Optimierung an die beliebige Zellkerne anpaßt. Der Algorithmus wurde anschließend an Fibroblastenzellkernen, welche eine annähernd ellipsoide Form haben, getestet. Als Parameter, welcher die Güte der Anpassung beschreibt, wurde das Verhältnis der Schnittmenge von Zellkernvolumen und Ellipsoidvolumen zum Zellkernvolumen verwendet. Die Güte der Anpassung lag für die Fibroblastenzellkerne mit den Chromosomenterritorien 18 bei 89.2% und für die Zellkerne mit den Chromosomenterritorien 19 bei 88.6%. Eine weitere Untersuchung bzgl. der Güte der Anpassung erfolgte anhand des Vergleichs zwischen der randbasierten relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in den angepaßten Ellipsoiden und den Fibroblastenzellkernen. Die relative radiale Position konnte für die Chromosomenterritorien 18 in den angepaßten Ellipsoiden und den Fibroblastenzellkernen nicht unterschieden werden, während sich für die Chromosomenterritorien 19 ein signifikanter Unterschied von $0.01 < p < 0.05$ ergab. Die Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 war in den angepaßten Ellipsoiden radial peripherer, als in den Fibroblastenzellkernen.

Die Güte der Anpassung muß, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, $\geq 89.2\%$ sein, sodass die angepaßten Ellipsoide für eine Simulation verwendet werden können. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen der relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 19 ergibt sich aufgrund der mangelnden Anpassungseffizienz und der Ellipsoidform. Die Anpassungseffizienz von 88.6% ist zwar nur um 0.6% kleiner, als die Anpassungseffizienz der an die Zellkerne der Chromosomenterritorien 18 angepaßten Ellipsoide, muß aber aufgrund der vorliegenden Resultate als ungenügend bezeichnet werden. Die unterschiedliche Form der Ellipsoide und Zellkerne hat einen wesentlichen Einfluß auf die randbasierte Kartierung, da Ellipsoide keine konvexen Bereiche aufweisen, Zellkerne hingegen schon. Hieraus resultiert eine Verschiebung der radialen Position in Richtung Peripherie, welche bei beiden Chromosomenterritorien zu beobachten ist.

Zusammenfassung und Ausblick

Der entwickelte Algorithmus zur Anpassung eines Ellipsoid an Zellkerne konnte die Erwartungen nur teilweise erfüllen. Es konnte ein Algorithmus entwickelt werden, der Ellipsoide

an Fibroblastenzellkerne anpaßt, welche allerdings eine minimale Anpassungseffizienz erfüllen müssen. Als Grenze wird eine Anpassungseffizienz von $\geq 89.2\%$ festgelegt. Eine Verbesserung des Algorithmus, in Bezug auf die Anpassungseffizienz kann eventuell mittels anderer Nebenbedingungen im Rahmen der Lagrange Optimierung erreicht werden. Fitzgibbon et al. [44] zeigten, dass theoretisch die Implementierung eines Algorithmus mit einer quadratischen Nebenbedingung möglich ist.

8.5 Anwendung der Minkowskifunktionale

Die Definition von Parametern zur Analyse der morphologischen Struktur von Chromosomenterritorien ist, aufgrund der bildanalytischen Bearbeitung der aus FISH resultierenden digitalen Aufnahmen, nicht trivial. Von Eils et al. [35] wurde 1996 die Struktur der Chromosomenterritorien X in Fibroblasten mittels Voronoi Mosaiken und der Parameter Volumen, Oberfläche und Roundness untersucht und anhand dieser Parameter unterschieden. Von Croft et al. [29] wurde die Morphologie der Chromosomenterritorien 18 und 19 untersucht und vermutet, dass das genreichere Chromosomenterritorium 19 größer, weniger kondensiert und die Oberfläche irregulärer im Vergleich zu der des genärmeren Chromosomenterritorium 18 ist. Edelmann et al. [34] führten 2001 zusätzlich zu den Parametern von Eils et al. [35] den Parameter Smoothness ein und untersuchten anhand dieser Parameter die Struktur von in-vivo markierten Chromatinregionen.

Die hier vorgestellten MF stellen einen anderen Ansatz dar. Das zu charakterisierende Objekt wird als Element einer konvexen Menge definiert, das im dreidimensionalen anhand von vier Funktionalen charakterisiert werden kann, welche eine Basis des dreidimensionalen Raums bilden. Diese vier Funktionalen entsprechen den geometrischen Parametern normiertes Volumen, spezifische Oberfläche, spezifische integrierte mittlere Krümmung und spezifische integrierte totale Krümmung. Ein fünfter Parameter ist die Eulerzahl, deren Definition analog der spezifischen integrierten totalen Krümmung, aber in Abhängigkeit von der Richtung der Messung ist. Die spezifische integrierte totale Krümmung hingegen ist unabhängig von der Meßrichtung. Die Verknüpfung zwischen den MF, welche invariant bzgl. Translation und Rotation sind, werden anhand der Gleichung von Crofton in ihre räumlichen Anteile zerlegt. Da die Definition der Funktionalen auf kontinuierliche Räume bezogen ist, die Chromosomenterritorien aber in digitalen Bildern, also diskreten Gittern, untersucht werden sollen, muß die Gleichung von Crofton zunächst auf diskrete Gitter übertragen werden. Hierzu wird ein Integrationsschritt und eine Analyseschritt vollzogen; ersterer entspricht der Berechnung des absoluten Häufigkeitsvektors der Nachbarschaftskonfigurationen mittels Marching Cube Methode, zweiterer der Extraktion der Parameter aus dem absoluten Häufigkeitsvektor.

Die Parameter wurden auf die Chromosomenterritorien 18 und 19 in experimentellen Fibroblastenzellkernen angewendet und anschließend die Verhältnisse der Chromosomenterritorien 19 zu 18 miteinander verglichen. Die morphologischen Unterschiede zwischen den Chromosomenterritorien wurden anhand des Vergleichs der resultierenden Verhältnisse mit theoretischen Werten untersucht. Für den Vergleich der experimentellen Verhältnisse der Chromosomenterritorien 19 zu 18 wurde als theoretischer Wert das Verhältnis der MBp 19 zu 18 gewählt.

Die Verhältnisse der experimentellen Chromosomenterritorien 19 zu 18 konnten die von Croft et al. [29] gefundenen Unterschiede nicht bestätigen. Alle Parameter, außer der von der Richtung der Messung abhängige Parameter Eulerzahl, stimmten, innerhalb der Fehlergrenzen, mit dem theoretischen Wert überein. Somit können, unter den gegebenen Randbedingungen,

die genreichen Chromosomenterritorien 19 und die genarmen Chromosomenterritorien 18 morphologisch nicht unterschieden werden. Es gibt hierfür drei mögliche Gründe:

1. Die morphologische Substruktur der DNA ist aufgrund der FISH zerstört, sodass keine morphologischen Unterschiede detektiert werden können.
2. Die Anwendung von Schwellwerten, welche aufgrund des aus der FISH resultierenden biologischen Hintergrundes angewendet werden müssen, unterdrücken jeden morphologischen Unterschied.
3. Es existiert kein Unterschied zwischen den Chromosomenterritorien 18 und 19.

Der erste Punkt, die Zerstörung der DNA-Substruktur, ist ein möglicher Grund und wurde bereits in Kapitel 8.1 diskutiert. Sollte dies der Fall sein, so kann eine morphologische Analyse auf digitale Aufnahmen von FISH-Präparaten nicht angewendet werden bzw. es müssen schonendere biologische Markierungsmethoden, wie z.B. die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der vCF, entwickelt werden.

Der zweite Punkt, die Anwendung von Schwellwerten, wurde bereits im Kapitel 8.2 diskutiert. Der verwendete Isodata-Algorithmus überschätzt den Schwellwert, weshalb eine Unterdrückung des morphologischen Unterschieds anhand des MF normiertes Volumen vorhanden sein sollte. Die MF spezifische Oberflächendichte und die Krümmungen, welche ein Maß für die Vernetzung und Oberflächenstruktur sind, sollten jedoch Unterschiede aufweisen, da die Schwellwerte vom Isodata-Algorithmus nur minimal überschätzt werden.

Der dritte Punkt, es sind keine Unterschiede bzgl. der Chromosomenterritorien vorhanden, soll anhand der Ergebnisse des SNRPN Gens untersucht werden (welche später diskutiert werden). Es konnte für das SNRPN Gen kein Volumenunterschied gemessen werden, sodass angenommen werden muß, dass die Dekondensation eines Gens, wenn vorhanden, unterhalb der gemessenen Größenordnung von ca. $0.018-0.026 \mu m^3$ liegt. Es ist also möglich, dass, wenn nur ein bestimmter Anteil an Genen auf den Chromosomen aktiv ist, dass die Veränderung mit den vorhandenen Methoden nicht detektiert werden können. Es kann auch umgekehrt argumentiert werden, die DNA-Helix muß sich öffnen um abgelesen zu werden, es werden jedoch nicht alle Gene gleichzeitig abgelesen. Die resultierende morphologische Änderung ist klein, sodass eine gesamte resultierende Änderung der Morphologie des Chromosomenterritoriums mit den vorhandenen Methoden nicht detektiert wird. Die Aussage, es existiert kein Unterschied zwischen der Morphologie der Chromosomenterritorien ist also nicht haltbar.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Resultate zeigen, dass die biologischen Methoden (FISH) und die hieraus resultierende Anwendung von Schwellwerten nicht ausreichend sind, um Aussagen über die Morphologie von Chromosomenterritorien zu machen. Die Anwendung der MF sollte weiter verfolgt werden, da die verwendeten Parameter eine sinnvolle Ergänzung des vorhandenen Parametersatzes zur Charakterisierung der Morphologie darstellen. Die Implementierung der MF in ein Schwellwertverfahren [106] könnte den Anwendungsbereich der MF erweitern.

8.6 Topologie des Chromosom 18 und BCL2 Gens in Cervix-Gewebe

Die Topologie des Genoms, auf der Ebene von Chromosomenterritorien und Genen, wurde bereits in unterschiedlichen Zelltypen und in unterschiedlichen Zellzyklusphasen untersucht [23] [4] [10] [29]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen, dass die Architektur des Genoms hochgradig organisiert ist. Die verwendeten Zellen waren hierbei allerdings alle Zellkulturzellen und wurden nicht im Zusammenhang eines Gewebeverbands betrachtet. In Wiech et al. [116] wurde erstmals die Topologie von Chromosom 8 und des Zentromer auf Chromosom 17 von in Formalin fixierten und Paraffinwachs eingebettetem Pankreas- und Brustgewebe quantitativ untersucht. Die Untersuchung der Topologie von Chromosomenterritorien und Genen in den unterschiedlich differenzierten Zelltypen in unterschiedlichen Gewebeschichten ist ein essentieller Baustein im Gesamtbild der Genomarchitektur.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die randbasierte, relative radiale Position, die absoluten Distanzen, die normierten Distanzen und die Winkel für das Chromosom 18 und das BCL2 Gens in Epithelzellen des Cervix-Gewebes untersucht, welches Formalin fixiert und in Paraffinwachs eingebettet war. Zusätzlich wurde die Position des BCL2 Gens in Bezug auf die Oberfläche des Chromosomenterritoriums analysiert, indem die absolute Distanz des Intensitätsschwerpunktes des BCL2 Gens von der Oberfläche vermessen wurde. Es wurde die Topologie in Basal-, Intermediär- und Apikalgewebe untersucht, wobei die Reihenfolge dem Differenzierungsweg der Epithelzellen entspricht, und diese mit der in Karzinomgewebe verglichen. Anhand der vorliegenden Resultate wurde ein vollständiges Modell der Topologie des Chromosom 18 und des BCL2 Gens in Epithelzellen, während der Differenzierung und im Karzinom, geschaffen.

Als Grundlage dieser Diskussion dient die randbasierte, relative radiale Position, welche für die radiale Positionierung in flachen und unregelmäßig geformten Zellkerne geeigneter ist, wie bereits im Rahmen des Vergleichs zwischen schwerpunktbasierter und randbasierter Methode gezeigt wurde. Im Basalgewebe, also während die Epithelzellen noch proliferieren, wird das BCL2 Gen stark transkribiert. In Abbildung 8.1, welche einen Schnitt durch das Cervix-Gewebe zeigt, ist das BCL2 Protein immunhistochemisch angefärbt und es ist zu sehen, dass das BCL2 Protein in der Basalschicht stark exprimiert wird. Es kann gleichzeitig anhand der Topologie gezeigt werden, dass in der Basalschicht eines der BCL2 Gene radial zentral und das andere radial peripher orientiert ist (Abbildung 8.2 rechts unten), während beide Chromosomenterritorien eine radial periphere Position einnehmen. Diese topologische Konformation entspricht, wenn ein funktioneller Zusammenhang mit der Expression hergestellt wird, somit der transkriptionell aktiven. Im Apikalgewebe, in welchem das BCL2-Protein nicht exprimiert wird (siehe Abbildung 8.1), nehmen beide Chromosomenterritorien 18 eine radial zentralere Position ein, als im Basalgewebe. Die Konformation der BCL2 Gene entspricht einer radialen Position zwischen der der beiden BCL2 Gene im Basalgewebe. Die radiale Position der Chromosomenterritorien 18 und der BCL2 Gene im Apikalgewebe unterscheidet sich statistisch signifikant von der des Basalgewebes. Diese Beobachtungen korrelieren, in Bezug auf das Chromosomenterritorium 18, mit den Messungen von Bridger et al. [14] und Bolzer et al. [4], welche eine radial zentrale Position und DNA-Verteilung des Chromosomenterritoriums 18 in ruhenden bzw. alternden Fibroblasten² (Apikalgewebe) und eine radial periphere Position und DNA-Verteilung in proliferierenden Fibroblasten (Basalgewebe) beobachten. Im

²Bei Bridger et al. statistisch signifikant, bei Bolzer et al. statistisch nicht signifikant

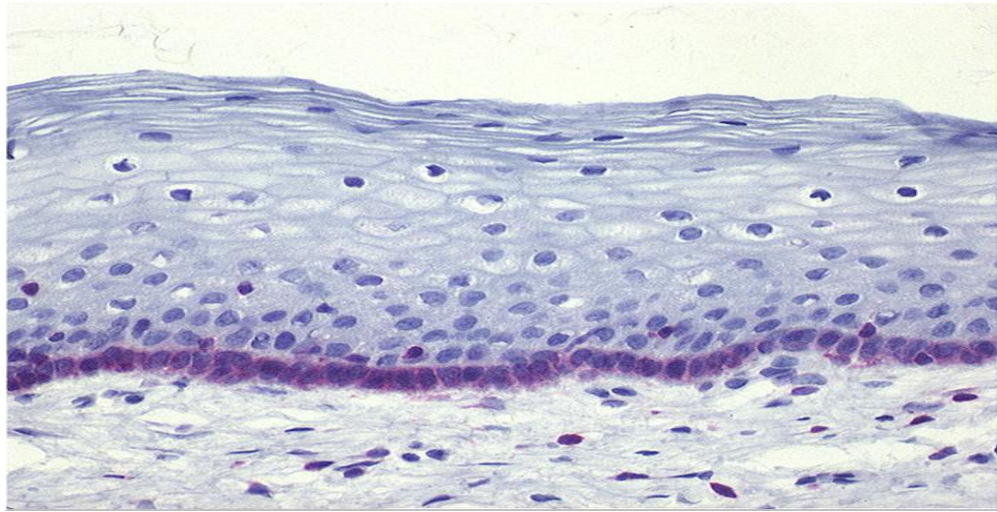


Abbildung 8.1: Die Abbildung zeigt die immunohistochemische Färbung des BCL2 Proteins im normalen Cervix-Gewebe. Die Expression des BCL2 Proteins in der Basalschicht (dunkler blauer Streifen) ist deutlich zu sehen. Die darüberliegende Intermediär- und Apikalschicht zeigen keine Färbung, die dort vereinzelt zu sehenden angefärbten Zellen sind Blutzellen.

Intermediärgewebe, in welchem das BCL2 Protein teilweise ebenfalls nicht exprimiert wird (siehe Abbildung 8.1), entspricht die topologische Konformation einer Mischung aus Basal- und Apikalgewebe, da die radiale Position kein statistisch signifikanten Unterschiede zu beiden Gewebeschichten aufweist. Es wird angenommen, dass in der Intermediärschicht ein topologischer Umbau erfolgt, welcher die BCL2-Protein-Expression ausschaltet, und der in der Apikalschicht abgeschlossen wird. Die Distanzen und Winkel zwischen den Chromosomenterritorien 18 und den BCL2 Genen ändern sich während der Differenzierung minimal, aber statistisch nicht signifikant, sodass davon auszugehen ist, dass der topologische Umbau nur auf radialer Ebene stattfindet. Die Position des BCL2 Gens in Bezug auf die Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18 stimmen im Basal-, Intermediär- und Apikalgewebe überein und können als chromosomal peripher beschrieben werden. Dieses Resultate stimmt mit den Ergebnissen von Scheuermann et al., Dietzel et al. und Cremer et al. [102] [31] [23] überein, welche die Position von aktiven Genen als, in Bezug auf die Chromosomenoberfläche, periphere Position beschreiben. Scheuermann et al. untersuchten 2004 die Position des BCL2 Gens in bezug auf die Oberfläche des Chromosom 18 in HeLa-Zellen und fanden über 80% der BCL2 Gene peripher, was hier bestätigt werden kann. Allerdings korreliert die periphere Position nicht unbedingt mit transkriptioneller Aktivität, da das BCL2 Protein in der Apikal- und Intermediärschicht nicht exprimiert wird (siehe Abbildung 8.1). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Positionen des BCL2 Gens der unterschiedlichen normalen Gewebeschichten nachgewiesen werden. Bedacht werden sollte, dass bei allen Arbeiten Schwellwerte auf die Chromosomenterritorien angewendet wurden, welche wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, überschätzt werden können. Eine Überschätzung des Schwellwertes resultiert in einem kleineren Chromsomenterritorium, sodass die Gene näher an der Chromosomenoberfläche detektiert werden, als diese sich reell befinden. Mahy et al. [72] fanden 2002 Hinweise darauf, dass transkriptionell aktive Gene sich nicht unbedingt an der Peripherie der Chromosomenterritorien befinden müssen. Dies wurde 2004 von Kosak et al. [67] mit einer morphologischen Formänderung der Chromosomen erklärt. Demnach faltet sich die Chromosomenoberfläche

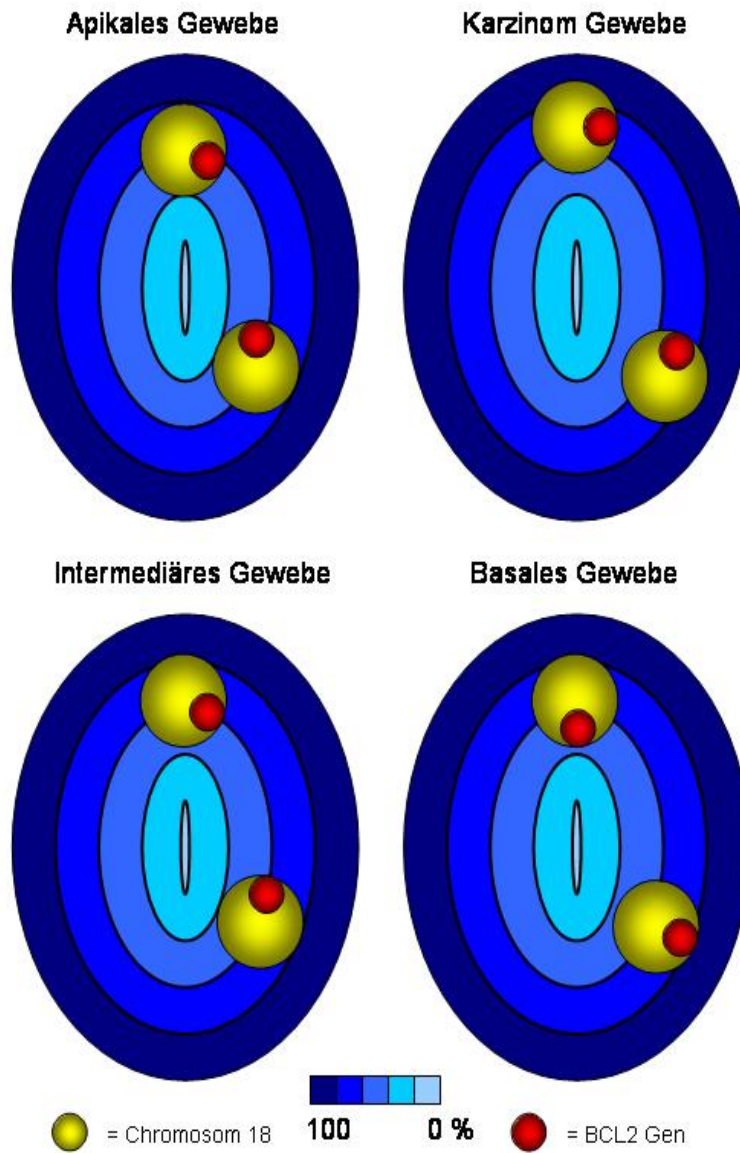


Abbildung 8.2: Die Abbildung zeigt das topologische Modell des Chromosom 18 und BCL2 Gens in Cervix-Gewebe. Die blauen Ringe entsprechen der randbasierte relative radiale Position des Chromosom 18 und des BCL2 Gens in %.

nach innen, sodass Gene, welche innerhalb des Chromosomenterritorium positioniert sind, reell peripher liegen können. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass im Rahmen der verwendeten Algorithmen, dass das BCL2 Gen, unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität, immer peripher liegt.

In Cervix-Karzinomzellen erfolgt ein Umbau der Topologie, die Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene sind radial peripherer zu finden, als in den Zellen der drei normalen Gewebeschichten. Diese topologische Konformation weist einen hochsignifikanten Unterschied zu der Konformation im Apikalgewebe auf. Die radiale Position des Chromosom 18 bestätigt nochmals obige Vermutung, dass in proliferierende Zellen das Chromosomenterritorium 18 radial peripher liegt (Bridger et al. [14] und Bolzer et al. [4]). Die Überexpression des BCL2 Proteins korreliert in Cervix-Karzinomgewebe mit dem beobachteten topologischen Umbau³ [110] [121]. Im Cervix-Karzinom-Gewebe liegt eine zur Basalschicht (normale Expression des BCL2 Proteins) ähnliche, aber andere topologische radiale Konformation vor. Die Distanzen und Winkel verändern sich auch in den Karzinomzellen, im Vergleich zu den normalen Gewebeschichten, nicht, sodass die Ursache des topologischen Umbaus radial verursacht sein muß [116].

Die Position der zwei BCL2 Gene in Bezug auf die Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 konnte zwar statistisch signifikant unterschieden werden, d.h. eines der Gene befindet sich außerhalb, das andere innerhalb des Chromosomenterritoriums. Der Unterschied wurde jedoch verworfen, da der Unterschied zwischen einer zufälligen und der vorgenommenen Sortierung der Distanzen nur 11 nm beträgt, die normiert kumulierten Häufigkeitsverteilungen statistisch nicht unterschieden werden können, die chromatische Verschiebung nicht korrigiert wurde und die Häufigkeitsverteilungen sich nicht wesentlich von denen der drei normalen Gewebeschichten unterscheiden. Der statistisch signifikante Unterschied kann jedoch als Hinweis auf einen patientenspezifischen Unterschied gewertet werden. Die Position der BCL2 Gene wird, in Übereinstimmung mit Scheuermann et al., Dietzel et al. und Cremer et al. [102] [31] [23], als peripher beschrieben und stimmt mit der transkriptionellen Aktivität somit für 60-70% der Patienten überein.

Die von Nogami et al. [83] und Kurz et al. [69] gefunden Zusammenhänge bzgl. der Lokalisation von Genen relativ zur Chromosomenoberfläche und der relativen radialen Position können somit erklärt werden. Die Position der BCL2 Gene ist in Bezug auf die Chromosomenoberfläche peripher und ändert in Abhängigkeit von der Zyklusphase der Zelle die radiale Position.

Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde erstmals ein vollständiges topologisches Modell des Chromosoms 18 und BCL2 Gens in Zellen des Cervix-Gewebes vorgestellt. Die topologische Konformation korreliert im Basalgewebe mit der Expression des BCL2-Proteins und verändert sich im Intermediär- und Apikalgewebe in eine transkriptionell inaktive Konformation, welche ebenfalls anhand der Expression des BCL2 Gens nachgewiesen wurde. Die Position des BCL2 Gens in Bezug auf die Oberfläche des Chromosom 18 ist in allen drei Gewebeschichten peripher. Im Karzinomgewebe erfolgt wiederum ein topologischer Umbau, welcher der Konformation des Basalgewebes ähnlich ist und mit der Expression des BCL2 Proteins teilweise korreliert. Der topologische Umbau ist radial bedingt, die Distanzen und Winkel ändern sich nicht. Die Position des BCL2 Gens in Bezug auf das Chromosomenterritorium 18 ist auch im Karzinomgewebe radial peri-

³Es wurde allerdings nicht zwischen Patientengruppen unterschieden, 60-70% der Patienten weisen eine Überexpression auf

pher.

Eine Verfeinerung des topologischen Modells kann anhand einer patientenspezifischen Untersuchung erfolgen. Hierzu müßten die Gewebeproben der Patienten immunhistochemisch untersucht werden und in BCL2 exprimierende und nicht exprimierende Gruppen unterteilt werden. Bei der Analyse kann dann zwischen der Position des BCL2 Gens in Bezug auf das Chromosomenterritorium 18 zwischen einer topologisch exprimierten und nicht exprimierten Konformation unterschieden werden. Die Expressionanalyse muß auch, um eine falsch positive Expression auszuschließen, an der mRNA untersucht werden.

8.7 Messungen am SNRPN Gen

Die Messung des Volumens, der Größe und Kompaktierung von Genen anhand der Fluorophorverteilung mittels FISH markierten Genregionen ist essentiell, um ein vollständiges Modell der DNA-Struktur in der Größenordnung von Genen zu erhalten. Von J. Rauch [93] wurden 1999 ein Modell für eine 240 kBp langen DNA-Bereich in der PWSR (über die SNRPN-Region hinweg) mittels spektraler Präzisionsdistanzmessungen an CLSM Aufnahmen entwickelt, welches die erste bekannte Messung in dieser Größenordnung ist. Das resultierende Volumen bzw. die Kompaktierung der markierten Region betrug $0.006 \mu m^3$ bzw. $40.0 \frac{MBp}{\mu m^3}$, wobei zusätzlich die Strukturinformation, aufgrund der spektralen Präzisionsdistanzmessungen, vorhanden war. 2005 wurde dann von Hildenbrand et al. [59] Messungen mittels räumlich modulierter Beleuchtung (engl. spatial modulated illumination=SMI) vorgenommen und die Größe der p53, p58 und der c-myc Genregionen vermessen. Die Volumina dieser Regionen lagen zwischen 0.00057 und $0.00097 \mu m^3$. Analoge Messung wurden 2006 von Mathee et al. [73] für eine 7q22 Genregion vorgenommen und es ergab sich ein Volumen von $0.00061 \mu m^3$.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher eine zweidimensionale Gaußfunktion in drei Raumrichtungen an die Fluorophorverteilung der mittels FISH markierten Chromatinregion anpaßt. Die insgesamt sechs resultierenden Halbwertsbreiten, zwei axiale und vier laterale, werden einerseits dazu verwendet ein Ellipsoidvolumen (anhand der lateralen und axialen Halbwertsbreiten) und andererseits ein Kugelvolumen (anhand der gemittelten lateralen Halbwertsbreiten) zu berechnen. Die Kompaktierung der DNA wird anhand der Volumina, indem die Megabasenpaar Anzahl pro Volumen $\frac{MBp}{\mu m^3}$ berechnet wird, angegeben.

Der entwickelte Algorithmus wurde in zwei Experimenten auf das mittels FISH markierte SNRPN Gen in der PWSR angewendet. Im ersten Experiment wurde anhand des Algorithmus zunächst die PSF-Halbwertsbreiten des verwendeten CLSM vermessen und dieser anschließend auf das mittels einer kommerziellen DNA-Sonde, mit einer Länge von 200 kBp, markierte SNRPN Gen in T-Lymphozyten angewendet. Im zweiten Experiment wurden die Halbwertsbreiten des ersten Experiments verwendet, da keine PSF-Messungen vorlagen, und mit diesen der entwickelte Algorithmus auf die 159 kBp lange markierte Region angewendet. In diesem zweiten Experiment konnte das paternale, aktive vom maternal, inaktiven SNRPN Gen unterschieden werden, was im ersten Experiment nicht möglich war. Aus den resultierenden Halbwertsbreiten der beiden Messungen wurden die Ellipsoid- und Kugelvolumina sowie die Kompaktierungen der beiden Sonden ermittelt. Die aus dem ersten Experiment resultierenden Volumina wurde abschließend mit den randbasierten und schwerpunktbasierten relativen radialen Positionen verglichen. Die aus dem zweiten Experimenten resultierenden Volumina wurden mit den sich aus Anwendung eines Schwellwertes und dem Abzählen der Voxel ergebenden Volumina verglichen.

Die gemessenen lateralen PSF-Halbwertsbreiten zeigen, dass der entwickelte Algorithmus, die Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion, es ermöglicht, Unterschiede der PSF-Halbwertsbreiten zu detektieren. Die lateralen PSF-Halbwertsbreiten weisen einen Unterschied von 40-50 nm auf, was aus einer Asymetrie der Lochblende resultiert. Die lateralen Halbwertsbreiten liegen mit 214 nm bis 264 nm oberhalb des theoretischen Wertes von 146 nm, aber unterhalb der von P. Edelmann [33] in situ gemessenen PSF-Halbwertsbreite von 283 nm. Die axialen Halbwertsbreiten liegen zwischen 581 bis 582 nm und somit ebenfalls oberhalb des theoretischen Wertes von 292 nm und unterhalb des von P. Edelmann gemessenen Wertes von 718 nm. Über die Art der Messung der PSF existieren unterschiedliche Meinungen. Die in situ Messung von P. Edelmann ist eigentlich die bestmögliche Methode, da die vermessene PSF anhand einer 40 kBp langen hybridisierten DNA-Sequenz vorgenommen wurde, welche als ein punktförmiges Objekt in Bezug auf die Auflösung angenommen werden kann. Die resultierende Intensitätsverteilung besteht jedoch aus der effektiven Intensitäts-PSF, welche mit der Intensitätsverteilung der 40 kBp Region konvolviert ist, weshalb die PSF überschätzt wird. Der Vorteil der Messungen von Edelmann sind die realen optischen Bedingungen im Zellkern, unter welchen die Messungen vorgenommen wurden, diese wurden bei den PSF-Messungen dieser Arbeit vernachlässigt. Andererseits wurde die in dieser Arbeit vermessene PSF um die Halbwertsbreite der Beads korrigiert, sodass davon auszugehen ist, dass die resultierende Halbwertsbreite der PSF der realen entspricht. Es wurde von S.Fenz [42] gezeigt, dass die Unterschiede des Brechungsindex innerhalb des Zellkerns so stark variieren, dass die Messung der PSF in unmittelbarer Nähe des zu untersuchenden biologischen Objekts erfolgen muß, um eine möglichst realistische Messung der PSF für die anschließende Messungen am biologischen Objekt zu erhalten. Welche Meßmethode letztendlich die Richtige ist, kann nicht entschieden werden, optimal wäre eine in situ Messung an einem Objekt mit bekannter Geometrie und Intensitätsverteilung in der Nähe des biologischen Objektes. Dies ist mit den zur Verfügung stehenden Methoden jedoch nicht möglich. Die Injektion von Beads in den Zellkern wurde bereits 1999 von J.Rauch angedacht und in dieser Arbeit versucht, wobei sich zeigt, dass die Beads Cluster bilden.

Die Ergebnisse des ersten Experimentes (SNRPN-Sonde Qbiogen) zeigten, dass das paternale und maternale Gen, welches bei diesem Experiment auch biologisch nicht unterschieden werden konnten, keine statistisch signifikanten bzgl. ihrer Volumina und Kompaktierungen aufweisen. Die Ergebnisse des zweiten Experimentes, bei welchem paternales und maternales Gen biologisch unterschieden werden konnten, bestätigte die Ergebnisse des ersten Experimentes. Das aktive paternale Gen kann vom inaktiven maternalen nicht unterschieden werden. Die Ursachen für die nicht detektierbaren Unterschiede, welche biologisch aufgrund der Aktivität des paternalen und Inaktivität des maternalen vorhanden sein müssten, gibt es verschiedene Erklärungen:

Die Auflösung des CLSM ist nicht ausreichend, um die "Kondensations-" bzw. "Dekondensationsunterschiede" der Genregionen zu detektieren. Das gemessene mittlere Ellipsoidvolumen entspricht dem 4.02fachen des PSF-Volumens von $0.017 \mu\text{m}^3$, das gemessenen mittlere Kugelvolumen dem 1.49fachen des PSF-Volumens. Das von J.Rauch gemessene Volumen entspricht hingegen $0.006 \mu\text{m}^3$ für eine 240 kBp lange Sequenz. Die gemessenen Volumina liegen somit alle in der Größenordnung des PSF-Volumens, während die von J.Rauch gemessenen unterhalb liegen. Dies zeigt, dass mittels Einfarbenmessungen und des hier verwendeten Algorithmus, die untere meßbare Volumengrenze oberhalb des PSF-Volumens liegt und die anisotrope Auflösung in axiale Richtung, wie das Ellipsoidvolumen zeigt, eine unüberwindbare Hürde ist. Können Unterschiede bzgl. der Volumina bzw. der Kompaktierung von Genregionen mit der

Auflösung des CLSM nicht detektiert werden, dann können nur Techniken wie SMI und SPDM, ein Weg sein, um diese zu detektieren. Von Rauch konnten 1999 zwar auch keine Unterschiede in der Struktur gefunden werden, jedoch wiesen zwei der sechs gemessenen Distanzen geringe signifikante Unterschiede auf, wenn die jeweils größeren und kleineren Meßwerte im gleichen Zellkerne getrennt betrachtet werden. Dies sollte als Hinweis gewertet werden und zu einer weiteren Anwendung der SPDM-Methode motivieren. Hildenbrand et al. [59] zeigten, dass mittels SMI ein Volumen untersucht werden kann, welches um einen Faktor 30 kleiner ist, als die in dieser Arbeit gemessenen. Die verwendete DNA-Sonde könnte eine weitere Ursache für die nicht detektierbaren Unterschiede sein. Die Sonden hatten eine Länge von 159-240 kbp, wobei die kommerzielle SNRPN-Sonde nur das SNRPN Gen mit einer Länge von 44 kbp überlagert, während die von Rauch und im zweiten Experiment verwendeten Sonden zusätzlich die Genregion 043458 mit einer Länge von 52 kbp bedecken (siehe Abbildung 8.3). Die Sonden von J.Rauch markiert also 40%, die Sonde des ersten Experimentes 22% und die des zweiten Experimentes 60.37% der Genregionen. Dieser Anteil scheint nicht auszureichen, um Unterschiede zu detektieren⁴, sodass eventuell exaktere Markierungsmethoden benötigt werden. Eine dritte Ursache könnte die Zerstörung der nativen Struktur aufgrund der FISH sein. Diese Ursache wurde bereits im Rahmen der vCF diskutiert, weshalb hier nur nochmals auf Winkler et al. [117] eingegangen wird (Untersuchung von denaturierten und nicht denaturierten Metaphase-Chromosomen mittels SNOM). Die letzten beiden Ursachen sind biologischer Natur, welche nur mittels genauerer und schonenderer Hybridisierungsmethoden ausgeschlossen werden können.

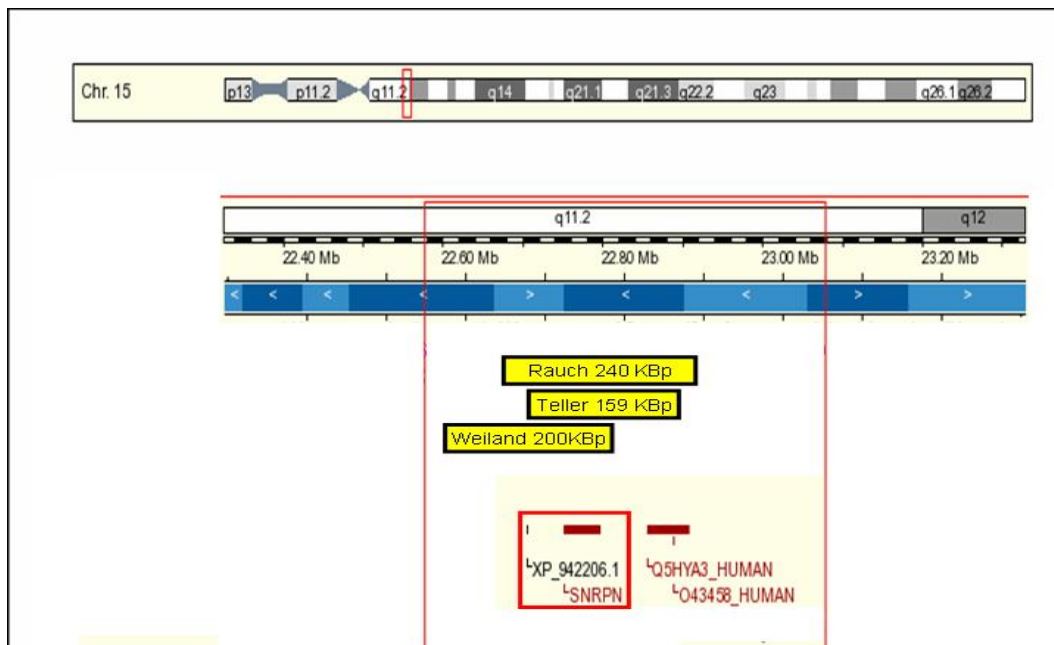


Abbildung 8.3: Die Abbildung zeigt Position der von K.Teller, J.Rauch und Y.Weiland verwendeten DNA-Sonden auf Chromosom 15. Die Sondenbereiche sind gelb markiert und die SNRPN-Genregion rot umrahmt. Die Sonde von Y.Weiland bindet nur links und im Bereich des SNRPN-Gen, während die Sonden von K.Teller und J.Rauch links und im Bereich des SNRPN-Gen und das 043458 Gen binden.

⁴J.Rauch verwendete zusätzlich SPDM

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass native Hybridisierungsmethoden, z.B. die in dieser Arbeit entwickelte vCF, sowie die Ansätze von Hausmann et al. [57] bzw. Durm et al. [32], benötigt werden.

Die gemessenen Kompaktierungen liegen für die Ellipsoidvolumina in der Größenordnung von 3.7 (erstes Experiment) und 15.7 (zweites Experiment) $\frac{MBp}{\mu m^3}$ und für die Kugelvolumina in der Größenordnung von 10.8 (erstes Experiment) und 32.4 (zweites Experiment) $\frac{MBp}{\mu m^3}$. Die von J.Rauch gemessene Kompaktierung für ein Kugelvolumen entspricht $40.0 \frac{MBp}{\mu m^3}$. Somit liegen alle hier gemessenen Volumina unterhalb der Messung von J.Rauch, was ebenfalls ein Hinweis auf die genauere SPDM-Methode ist [37]. Die hier gemessenen Werte können aufgrund der volumenbezogenen Messung der Kompaktierung nicht mit Literaturangaben zur 30 nm Faser verglichen werden, da diese die Kompaktierung immer auf die Länge beziehen. Da DNA aber dreidimensionale Strukturen ausbildet, ist zukünftig ein Bezug auf das Volumen unabdingbar. Die Messung der randbasierten, relativen radialen Position des ersten Experiments und die anschließend vorgenommene Sortierung der Meßwerte zeigt, dass diese signifikante Unterschiede aufweisen. Die im Weiteren vorgenommene Korrelation der randbasierten relativen radialen Position mit den Volumina ergab eine Übereinstimmung von 71.2% (Kugelvolumina) und 65.4% (Ellipsoidvolumina) der Zellkerne mit einer radial zentralen Position der kleineren und radial peripheren Position der größeren Volumina⁵. Diese gute Übereinstimmung wird hier als Indiz für die zentrale Bedeutung der relativen radialen Positionierung gedeutet. Vielleicht weist die Verknüpfung mehrerer Parameter, wie hier vorgenommen, eine Möglichkeit auf, die biologisch vorhandenen Unterschiede bzgl. der Aktivität von Genen nachzuweisen.

Der Vergleich zwischen der Schwellwertmethode (mit anschließender Volumenberechnung mittels Voxelzählen) und den hier gemessenen Ellipsoid- und Kugelvolumina zeigt, dass adäquate mathematische Anpassungsmethode benötigt werden. Der Faktor 22.8 zwischen dem PSF-Volumen und der Schwellwertmethode und der Faktor 4.0 und 1.5 mit der hier entwickelten Methode und dem PSF-Volumen entspricht einem Unterschied in der Größenordnung von 5-10. Die Schwellwertmethode ist also nicht geeignet ist, um die Volumina von FISH Markierungen in der Größenordnung von 159-240 kBp zu vermessen.

Zusammenfassung und Ausblick

Die hier entwickelte Methode der Anpassung einer zweidimensionalen Gaußfunktion in drei Raumrichtungen ermöglicht es Größenunterschiede in der Größenordnung von 50-60 nm in die laterale Raumrichtung zu detektieren, wie anhand der PSF-Messungen gezeigt wurde. Die in der paternalen und maternalen PWSR markierten Bereiche weisen keine Volumen oder Kompaktierungsunterschiede auf bzw. konnten in zwei Experimenten nicht nachgewiesen werden. Es können mit der hier entwickelten Methode Größen für Einfarbenmessungen in der Größenordnung des PSF-Volumens des CLSM gemessen werden. Dies entspricht der unteren Grenze des mit dieser Methode erreichbaren Volumens dar. Die Ursache für die nicht gefundenen Unterschiede, welche physikalische bedingt sind, ist die begrenzte Auflösung des CLSM. Diese ist nicht ausreichend, sodass bessere Methoden, z.B. SMI und SPDM benötigt werden [104] [103] [21] [37]. Die Ursachen für die nicht gefundenen Unterschiede auf biologischer Ebene sind die Zerstörung der Chromatinsubstruktur bei der Denaturierung und die nicht ausreichende Markierung aufgrund der verwendeten DNA-Sonden. Eine Verbesserung der biologischen Methoden kann durch die ebenfalls hier vorgestellte Methode der vCF und die von Hausmann et

⁵Dies wird im Weiteren von Y.Weiland in Rahmen ihrer Doktorarbeit diskutiert, hier wird nur nochmals auf die zentrale Bedeutung der radialen Positionierung verwiesen

al. [57] vorgestellte Methode der COMBO-FISH erreicht werden [105] [32] [78]. Eine Verknüpfung der Volumenmessung mit weiteren Parametern ermöglicht es zukünftig diese zusätzlich im Rahmen der Topologie einzuordnen.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich zunächst bei all jenen, ohne deren Motivation und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof.Dr.Dr. Christoph Cremer gilt mein besonderer Dank für dessen Motivation mich der Biophysik zu widmen, für die Möglichkeit in den letzten fünf Jahren Teil seiner Arbeitsgruppe zu sein, sein Vertrauen, die Möglichkeit dieser Arbeit und die Betreuung in dieser Zeit.

Die folgenden Zeilen widmen ich meinen beiden Mentoren, Herrn Prof.Dr. Michael Hausmann und Dr. Jutta Schwarz-Finsterle, die beide wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich bedanke mich herzlichst für die überragende Betreuung, die persönlichen und fachlichen Gespräche, für das mir allzeit entgegengebrachte Vertrauen, ihre Menschlichkeit und die wunderbare Zeit. Sie haben mich persönlich geprägt und mich als Mensch bereichert. Ich hätte mir niemand anderen an ihrer Stelle gewünscht! Danke! Verba docent, exempla trahunt.

Mein persönlicher Dank gilt Dr. Gregor Kreth, der mich als Mensch und Kollege in den letzten fünf Jahren immer unterstützt, immer geholfen hat und immer da war. Danke!

Für die Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Dr. Eberhard Schmitt, Dr. Udo Birk, Dipl.Biol. Yanina Weiland und Dipl.Biol. Patrick Müller.

Mein persönlicher und besonders herzlicher Dank gilt Dipl.Phys. Margund Bach, Dipl.Troph. Claudia Batram, Bianca Reinhard, Elvira Steinwand, Dipl.Biol. Yanina Weiland, Dipl.Phys. Roman Amberger, MSc. David Baddely, Dr. Udo Birk, Dipl.Ing. Heinz Eipel, Dipl.Phys. Hans Mathee, Dipl.Biol. Patrick Müller, MSc. Senthilkumar Pazhanisamy, Adrian Pfeiffer, Dipl.Phys. Jürgen Reymann für:

- Eine sehr gute Zusammenarbeit.
- Jegliche Hilfe und Unterstützung.
- Die lehrreichen Diskussionen.
- Die schöne Zeit, in und außerhalb der Arbeitszeit.
- Die netten Zigarettenpausen.
- ...

Danke für alles!

Mein Dank gilt der Dipl. Biol. Yanina Weiland für die Aufnahmen des SNRPN Gens, Danke!

Mein Dank gilt der Dr Eberhard Schmitt für gute Zusammenarbeit im Rahmen des COMBO-FISH-Projektes und die bereichernden Diskussionen, Danke!

Mein Dank gilt der Dipl. Biol. Yanina Weiland für die Aufnahmen des SNRPN Gens, Danke!

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. P.Lichter am DKFZ (Heidelberg), insbesondere Dr. Ute Schmidt und Dr. Karsten Richter, für die Benutzung der Mikroinjektionsanlage, die Einweisung und die vielen biologischen Ratschläge.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. R.Krämer in der anorganischen Chemie (Heidelberg) für die Synthese der PNA-Sonde.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. M.Werner am pathologischen Institut (Freiburg), insbesondere Dr. med. Thorsten Wiech und Viktoria Lachenmaier für die segmentierten Aufnahmen des Cervix-Gewebes und biologischen Ratschläge.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. T.Cremer, Institut für Humangenetik und Anthropologie (München), insbesondere Dr. Marion Cremer, Dr. Irina Solovei und Dipl. Biol. Kathrin Teller für die Aufnahmen der Chromosomen 18 und 19 in Fibroblasten und des SNRPN-Gens in der PWSR. Zusätzlich möchte ich Dipl. Biol. Kathrin Teller für das Setzen der Schwellwerte und die Auswertung dieser Daten danken.

Bei Dipl.Biol. Thibaud Jegou möchte ich mich für das Überlassen der HeLa-Zellne und die manchmal anstrengenden, aber immer hilfreichen Ratschläge bzgl. der Zellkultur bedanken.

Mein Dank gilt allen weiteren Kooperationspartnern, deren Unterstützung meine Forschungsarbeit ermöglicht haben.

Persönlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Mitbewohnerin und guten Freundin Diana Popovici für ihre Geduld, Fürsorge, jegliche Unterstützung und die wunderbare Zeit. Den sehr guten Freundinnen und Freunden die mein Leben bereichern, mit Inhalt füllen und mit mir ihr Leben teilen, danke ich bis hierher und schon im Vorraus für so vieles. Eure Geduld mir gegenüber, eure Motivation und eure Unterstützung haben mich so weit getragen. Danke!

Meiner Familie, meinen Eltern, Tillie und Hans Stein, und meinem Bruder, Joachim Stein, möchte ich diese Arbeit widmen. Ihr seid der Mittelpunkt meines Lebens, ihr hab mich immer und in jeglicher Art und Weise, ohne zu zögern und ohne zu fragen, unterstützt, gestützt, ge- und ertragen. Ich danke euch aus tiefstem Herzen!

Anhang A

Eigene Publikationen, Buchbeiträge und Abstracts

A.1 Publikationen

1. Weierich, C. ; Brero, A. ; **Stein, S.** ; von Hase, J. ; Cremer, C. ; Cremer, T. ; Solovei, I. : Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res.* (2003) ; 11:485-502.
2. Solovei, I. ; Schermelleh, L. ; Doring, K. ; Engelhardt, A. ; **Stein, S.** ; Cremer, C. ; Cremer, T. : Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma.* (2004) ; 112:410-23.
3. Stadler, S. ; Schnapp, V. ; Mayer, R. ; **Stein, S.** ; Cremer, C. ; Bonifer, C. ; Cremer, T. ; Dietzel, S. : The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. *BMC Cell Biol.* 2004 ; 5:44.
4. Wiech, T. ; Timme, S. ; Riede, F. ; **Stein, S.** ; Schuricke, M. ; Cremer, C. ; Werner, M. ; Hausmann, M. ; Walch, A. : Archival tissues provide a valuable source for the analysis of spatial genome organisation. *Histochem. Cell Biol.* (2005) ; 123:229 - 238.
5. Schwarz-Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Großmann, C. ; Schmitt, E. ; Schneider, H. ; Trakhtenbrot, L. ; Rechavi, G. ; Amariglio, N. ; Cremer, C. ; Hausmann, M. : COMBO-FISH for focussed fluorescence labelling of gene domains: 3D-analysis of the genome architecture of *abl* and *bcr* in human blood cells. *Cell Biol. Intern.* (2005) ; 29:1038 - 1046.
6. Shopland, LS. ; Lynch, CR. ; Peterson, KA. ; Thornton, K. ; Kepper, N. ; von Hase, J. ; **Stein, S.** ; Vincent, S. ; Molloy, KR. ; Kreth, G. ; Cremer, C. ; Bult, CJ. ; O'Brien, TP. : Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J. Cell. Biol.* (2006) ; 174:27-38.
7. Schwarz-Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Großmann, C. ; Schmitt, E. ; Trakhtenbrot, L. ; Rechavi, G. ; Amariglio, N. ; Cremer, C. ; Hausmann, M. : Comparison of triplehelical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of *abl/bcr* genome organisation. *J. Biophys. Biochem. Meth.* (2006) (eingereicht)

A.2 Buchbeiträge

1. Nolte, O. ; Müller, M. ; Häfner, B. ; Knemeyer, J-P. ; Stöhr, K. ; Wolfrum, J. ; Hakenbeck, R. ; Denapaite, D. ; Schwarz-Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Schmitt, E. ; Cremer, C. ; Herten, D-P. ; Hausmann, M. ; Sauer, M. : Novel singly labelled probes for identification of microorganisms, detection of antibiotic resistance genes and mutations, and tumor diagnosis (SMART PROBES). *Biophotonics* (2006) (Ed.: Popp J, Strehle M) Wiley-VCH, Weinheim: 167-230.

A.3 Abstracts

1. Hausmann, M. ; Finsterle, J. ; Hildenbrand, G. ; Schmitt, E. ; Winkler, R. ; Rapp, A. ; **Stein, S.** ; Werner, M. ; Cremer, C. : COMBO-FISH: Specific labeling of chromosome regions by computer selected oligo-probe combinations. 16th Heidelberg Cytometry Symposium (2003), Heidelberg, 16. - 18. 10. 2003, Abstracts (ISSN 0949 - 5347).
2. Hausmann, M. ; Schmitt, E. ; Finsterle, J. ; Hildenbrand, G. ; **Stein, S.** ; Rapp, A. ; Cremer, C. : COMBO-FISH zur hochspezifischen Markierung von Genom-Bruchpunktregionen. GBS, Proceedings der 7. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (Hrg. Scholz M, Taucher-Scholz G), Darmstadt, 31. 3. - 2. 4. 2004 (ISBN 3-00-013476-X):32
3. **Stein, S.** ; Solovei, I. ; Cremer, M. ; Zinner, R. ; Timme, S. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Hausmann, M. ; Cremer, C. : 3D-image analysis of the topological organisation of chromatin in human lymphocytes, fibroblasts and in cancer cells of formallin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. 15th International Chromosome Conference, London, 5. - 10. 9. 2004. *Chromos. Res.* 12 (Suppl. 1):34
4. Hausmann, M. ; Finsterle, J. ; Hildenbrand, G. ; Schmitt, E. ; Großmann, C. ; Rapp, A. ; **Stein, S.** ; Werner, M. ; Cremer, C. : COMBO-FISH: Specific labelling of genes and breakpoint regions by computer selected oligo-probe combinations. 15th International Chromosome Conference, London, 5. - 10. 9. 2004. *Chromos. Res.* 12 (Suppl. 1):149
5. Hausmann, M. ; **Stein, S.** ; Kaya, Z. ; Finsterle, J. ; Schmitt, E. ; Krämer, R. ; Cremer, C. : COMBO-FISH of living cells. *Cell Proliferation* (2005) ; 38:182
6. Schmitt, E. ; Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Hausmann, M. : Focused COMBO-FISH for selected nanosized genomic regions. *Cell Proliferation* (2005) 38:182
7. Hausmann, M. ; Schwarz-Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Schmitt, E. ; Cremer, C. : Fokussierte Fluoreszenzmarkierung von Genomregionen für die Mikroskopie. *Verhandl. DPG(VI)* (2006) ; 41,2: 44
8. **Stein, S.** ; Riede, F. ; Schmitt, E. ; Riede, UN. ; Schwarz-Finsterle, J. ; Cremer, C. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Hausmann, M. : The nuclear architecture of HER2neu and centromere 17 in ductal breast carcinoma and non-neoplastic ductal epithelium. *Cell Proliferation* (2006) (eingereicht)

9. Schmitt, E. ; **Stein, S.** ; Schwarz-Finsterle, J. ; Hausmann, M. Preparation and fixation induced cell deformations: Mathematical description and experimental perspectives. Cell Proliferation (2006) (eingereicht)
10. Hausmann, M. ; Finsterle, J. ; Hildenbrand, G. ; Winkler, R. ; Rapp, A. ; Schmitt, E. ; **Stein, S.** ; Technau-Ihling, K. ; Werner, M. ; Cremer, C. : COMBO-FISH: A new approach for specific labeling by computer selected DNA oligo-probe combinations. 2. Discussion Workshop: Standardisation of FISH-Procedures, Ladenburg, 10.7. - 11.7.2003
11. Knemeyer, J-P. ; Barsch, H. ; Wolfrum, J. ; Sauer, M. ; Müller, M. ; Häfner, B. ; Geiss, H-K. ; Nolte, O. ; Hakenbeck, R. ; Finsterle, J. ; Schmitt, E. ; Hildenbrand, G. ; **Stein, S.** ; Cremer, C. ; Hausmann, M. : Smart Probes zur schnellen und hochempfindlichen Diagnostik von Antibiotikaresistenzen und tumorassoziierten Translokationen. 1. BMBF-Symposium Nanobiotechnologie, Hannover, 7. - 8. 10. 2003
12. Cremer, C. ; Spöri, U. ; Wagner, C. ; Albrecht, B. ; Failla, AV. ; Rauch, J. ; Schweitzer, A. ; Hildenbrand, L. ; Finsterle, J. ; Kepper, N. ; Engelbrecht, C. ; v.Hase, J. ; **Stein, S.** ; Kreth, G. ; Hausmann, M. ; Rapp, A. ; Martin, S. ; Pombo, A. ; Cremer, M. ; Cremer, T. : Introduction into Nuclear Structure. Cell Nucleus Workshop at the European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, 9. - 10. 2. 2004
13. Wiech, T. ; Hausmann, M. ; Timme, S. ; **Stein, S.** ; Nikolopoulos, E. ; Schuricke, M. ; Werner, M. ; Walch, A. : An approach for three-dimensional (3D) image analysis of the spatial genome organisation in cell nuclei of archival tissue sections. 46th Symposium of the Society for Histochemistry, Prag, 22. 9. - 25. 9. 2004
14. **Stein, S.** ; Timme, S. ; Schurike, M. ; Wiech, T. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Cremer, C. ; Hausmann, M. : 3D-image analysis of the topology of chromatin in cell nuclei of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. 17th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 21. - 23. 10. 2004
15. Hausmann, M. ; Finsterle, J. ; Schmitt, E. ; Großmann, C. ; **Stein, S.** ; Spöri, U. ; Hildenbrand, G. ; Rapp, A. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Krämer, R. ; Cremer, C. : COMBO-FISH: A versatile fluorescence labeling technique of genome regions for high resolution microscopy. 17th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 21. - 23. 10. 2004
16. 8. Walch A, Stein S, Hausmann M, Werner M (2004) Genome organization in human cancer: basic principles and clinical applications. 17th Heidelberg Cytometry Symposium, Heidelberg, 21. - 23. 10. 2004
17. Timme, S. ; **Stein, S.** ; Wiech, T. ; Schurike, M. ; Hausmann, M. ; Cremer, C. ; Werner, M. ; Walch, A. : Alterations of the 3D-architecture of chromosome territories #8 in pancreatic adenocarcinoma. 89. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Wuppertal, 18. - 21. 5. 2005
18. Wiech, T. ; Timme, S. ; Riede, F. ; Hausmann, M. ; **Stein, S.** ; Cremer, C. ; Werner, M. ; Walch, A. : The 3D-architecture of neoplastic and non-neoplastic cell nuclei analysed by quantitative microscopy of archival tissues. 89. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Wuppertal, 18. - 21. 5. 2005

19. Hausmann, M. ; **Stein, S.** ; Timme, S ; Riede, F. ; Wiech, T. ; Schurike, M. ; Finsterle, J. ; Cremer, C. ; Werner, M. ; Walch, A. : A software package for 3D-fluorescence image analysis of spatial genome organization in FISH labelled cell nuclei. 89. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Wuppertal, 18. - 21. 5. 2005
20. Hausmann, M. ; Hildenbrand, G. ; Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Spöri, U. ; Timme, S. ; Wiech, T. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Cremer, C. : Nanosizing of specific gene domains by means of SMI microscopy and COMBO-FISH labelling. Riga Meeting on Comprehensive Cell Biology, Riga, 2. - 4. 6. 2005
21. Schmitt, E. ; Hausmann, M. ; Finsterle, J. ; **Stein, S.** ; Großmann, C. ; Schneider, H. ; Hildenbrand, G. ; Rapp, A. ; Cremer, C. : COMBO-FISH: A new approach for specific labeling by computer selected DNA oligo-probe combinations. Biophotonik Symposium, Jena, 15. - 17. 3. 2005
22. Riede, F. ; **Stein, S.** ; Schuricke, M. ; Schwarz-Finsterle, J. ; Cremer, C. ; Walch, A. ; Werner, M. ; Hausmann, M. : The nuclear architecture of chromosome 17 in ductal breast carcinoma cells in comparison to non-neoplastic ductal epithelium. International Conference Stem Cells and Cancer, Heidelberg, 12. - 14. 3. 2006
23. Hausmann, M. ; Schwarz-Finsterle, J. ; Schmitt, E. ; **Stein, S.** ; Großmann, C. ; Birk, U. ; Baddeley, D. ; Batram, C. ; Hildenbrand, G. ; Trakhtenbrot, L. : Nanoskopie mit Nanomarkern: Werkzeuge für die zelluläre Strahlenbiologie? Proc. 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, Braunschweig, 10.- 12. 5.2006: 12

Anhang B

Material und Methoden

B.1 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Chromosomenmedium B	Biochrom
Colcemid	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Riedel De Haen
Formamid	Merck
Salzsäure HCl	J.T. Baker
HEPES	Carl Roth GmbH
Immersionsöl (ImmersolTM518F)	Zeiss
Kaliumchlorid KCl	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid-6-Hydrat($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Sigma Aldrich
Merckofix	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid NaCl	J.T. Baker
PBS (10x)	Sigma Aldrich
Pepsin (100mg/ml ddH ₂ O)	Sigma-Aldrich
Phytohämagglutinin	Roche
Poly-L-Lysin 0.01%	Sigma-Aldrich
RNase-Lösung(Stocklösung:10mg/ml in	Sigma-Aldrich
Tris HCl)	
Saponin	Serva
SSC (20x)	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Merck
Vecta Shield	Vector

B.2 Lösungen

Hybridisierungspuffer

- 0,6 M MgCl₂·6H₂O
- 3M NaCl
- 1M NaAc
- pH 7 einstellen und autoklavieren

Mikroinjektionpuffer

- 80 mM KCL
- 10mM K₂HPO₄
- 4mM NaCL

B.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die vitalen Zellen werden von den nicht vitale Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest unterschieden. Bei Zellen deren Membran beschädigt ist, diffundiert der Farbstoff ins Zellinnere und färbt das Zytoplasma blau bis violett, während bei Zellen mit einer intakte Zellmembran der Farbstoff ausgeschlossen wird. Gleichzeitig wird Gesamtzellzahl bestimmt. Aus der Zellsuspension werden 20µl entnommen und mit gleichem Volumen Trypanblau-Lösung gemischt. Diese Mischung wurde auf eine geeichte Neubauer-Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgewertet. Dafür wurden alle vier Großquadrate mit jeweils 16 kleinen Quadraten erfasst und die Zellzahl und die Vitalität ([%]) berechnet.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellen}_{\text{gesamt}}}{4} \cdot 2 \cdot 10^4 \quad (\text{B.1})$$

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{Zellen}_{\text{vital}}}{\text{Zellen}_{\text{gesamt}}} \cdot 100 \quad (\text{B.2})$$

B.4 Protokolle

B.4.1 Methanol/Eisessig Fixierung

Reagenzien:

- Kulturmedium: RPMI Medium 1640 inklusive 10% FCS, 1% Penicillin/Stretomycin, 1% L-Glutamin
- Phytohämagglutinin (PHA)
- Colcemid (10 mg/ml)
- 75mM KCL-Lösung
- Fixativ (Methanol/Eisessig, Verhältnis 3:1)

Metaphase-Präparation und Interphase-Präparation:

1. 0.1 ml Colcemid ((10 mg/ml) zugeben, mischen und für 10-30 Min. bei 37°C inkubieren (Dieser Schritt entfällt bei der Interphase-Präparation).
2. Zellen in ihrem Medium in 15 ml Falcon-Röhrchen überführen und für 10 Min bei 200 g zentrifugieren.
3. Verwerfen des Überstands und resuspendieren des Pellets in 5-6 ml einer auf 37°C temperierten 75 mM KCL-Lösung.
4. Inkubation für 10-15 Min. bei 37°C.
5. 10 Min. bei 200 g zentrifugieren.
6. Überstand bis auf ca.1 ml abnehmen und die Zellen resuspendieren.
7. Fixativ (Methanol/Eisessig, Verhältnis 3:1), auf -20°C gekühlt, Tropfen für Tropfen unter leichtem Schwenken des Röhrchens zugeben.
8. Auf 4 ml auffüllen und 30 min ruhen lassen.
9. Die Schritte 5-8 werden, in Abhängigkeit vom Zelltyp, 1-4 Mal wiederholt.

B.4.2 Interphase/Metaphase-FISH Zentromer 9

Reagenzien:

- Aus Pepsinstocklösung (100 mg/ml in ddH₂O) 18 μ l Pepsinstocklösung in 60 ml 0,01 N HCl
- Permeabilisierungslösung 0.7 ml Triton-X-100/0.1 g Saponin/99.3 ml 2xSSC (entspricht 0.7% Triton-X100/0.1% Saponin in 2xSSC)

Hybridisierungslösung für PNA/DNA-Metaphase-FISH:

- 2 μ l Zentromer 9 PNA-Sonde (0,89 μ M)
- 8 μ l kommerzieller Hybridisierungspuffer(Formamid,SSC)
- 2 μ l kommerzielle Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde

Hybridisierungslösung für Interphase:

- 8 μ l kommerzieller Hybridisierungspuffer(Formamid,SSC)
- 2 μ l kommerzielle Zentromer 9 DNA-BAC-Sonde

Protokoll:

1. 10-30 μ l, in Abhängigkeit von der Zelldichte, der Zellsuspension auftropfen.
2. 30 min in Permeabilisierungslösung inkubieren
3. 2x5 min in 2xSSC
4. 200 μ l RNase (4 μ l Stock + 196 μ l 2xSSC) bei 37°C für 30 min, Deckglas verwenden und versiegeln
5. 2x5 min in 2 x SSC und 5 Min. in 1 x PBS
6. 1 min in 0.002% Pepsin bei 37°C inkubieren.
7. 1xPBS für 5 min
8. Denaturierung in 70% Formamid/2xSSC (pH 7-7,2) für 5 min bei 72°C (für 2 Objektträger) +1°C für jeden weiteren Objektträger
9. je 2 min 70%/90%/100% EtOH
10. 5 min in 2xSSC bei 42°C
11. 5 min in 0.5xSSC bei 42°C
12. 5 min in 0.5xSSC bei 65°C
13. 15 μ l 0.25 μ M YOYO-1 für 1 min, Deckglas verwenden
14. Kurz in 2xSSC geben
15. Vectashield zugeben, Deckglas und mit Fixogum versiegeln

Literaturverzeichnis

- [1] ACCUSOFT, Corporation. *Khoros Software*. <http://www.accusoft.com/>
- [2] ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEVIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J.D.: *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London, 1989
- [3] ALDINGER, K.: *Quantitative Analyse fluoreszenzgefärbter Chromosomen und Zellkerne unter Verwendung einer CCD-Farbkamera.*, Universität Heidelberg, Diss., 1994
- [4] BOLZER, A. ; KRETH, G. ; SOLOVEI, I. ; KOEHLER, D. ; SARACOGLU, K. ; FAUTH, C. ; MÜLLER, S. ; EILS, R. ; CREMER, C. ; SPEICHER, M. ; CREMER, T.: Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. In: *PLOS Biology* 3 (2005), S. e157
- [5] BORGEFORS, G.: Distance transformation in arbitrary dimensions. In: *Comput. Vision Graph.* 27 (1984), S. 321–345
- [6] BORNFLETH, H.: *Precision distance microscopy and model-based segmentation for the analysis of the functional topology of the cell nucleus*, Universität Heidelberg, Diss., 1999
- [7] BORNFLETH, H. ; EDELMANN, P. ; ZINK, D. ; CREMER, T. ; CREMER, C.: Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells using Four-Dimensional Microscopy. In: *Biophys. J.* 77 (1999), S. 2871–2886
- [8] BORNFLETH, H. ; SÄTZLER, K. ; EILS, R. ; CREMER, C.: High-precision distance measurements and volume conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three dimensional confocal fluorescence microscopy. In: *J. Microsc.* 189 (1997), S. 118–136
- [9] BOVERI, T.: Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. In: *Archiv für Zellforschung* 3 (1909), S. 181–268
- [10] BOYLE, S. ; GILCHRIST, S. ; BRIDGER, J.M. ; MAHY, N.L. ; ELLIS, J.A. ; BICKMORE, W.A.: The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. In: *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001), S. 809–820
- [11] BRAKENHOFF, G.J. ; BLOM, P. ; BARENDs, P.: Confocal scanning light microscopy with aperture immersion lenses. In: *J. Microsc.* 117 (1979), S. 219–232
- [12] BRAKENHOFF, G.J. ; VOORT, H.T.M. van d. ; SPRONSEN, E.A. van ; LINNEMANS, W.A.M ; NANNINGA, N.: Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. In: *Nature* 317 (1985), S. 748–749

- [13] BRANCO, M.R. ; POMBO, A.: Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations. In: *PLOS Biology* 4 (2006), S. e138
- [14] BRIDGER, J.M. ; BOYLE, S. ; KILL, I.R. ; BICKMORE, W.A.: Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. In: *Curr. Biol.* 10 (2000), S. 149–152
- [15] CARLSSON, K. ; DANIELSSON, P. ; LENZ, R. ; LILJEBORG, A. ; MAJLOF, L. ; ASLUND, N.: Threedimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. In: *Opt. Lett.* 10 (1985), S. 53–55
- [16] CHATTERJEE, C. ; CHONG, E.K.P.: Efficient algorithms for finding the centres of conics and quadrics in noisy data. In: *Pattern Recogn.* 30 (1997), S. 673–684
- [17] CHEN, C. ; WU, B. ; WEI, T. ; EGHOLM, M. ; STRAUSS, W.M.: Unique chromosome identification and sequence-specific structural analysis with short PNA oligomers. In: *Mamm. Genome* 11 (2000), S. 384–391
- [18] COMINGS, D.E.: The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. In: *Am. J. Hum. Genet.* 20 (1968), S. 440–460
- [19] COX, I.J. ; SHEPPARD, C.J.R. ; WILSON, T.: Super-resolution by confocal fluorescent microscopy. In: *Optik* 60 (1982), S. 391–396
- [20] CREMER, C. ; CREMER, T.: Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. In: *Microsc. Acta* 81 (1978), S. 31–44
- [21] CREMER, C. ; EDELMANN, P. ; ESA, A. ; BORNFLETH, H. ; SCHNEIDER, B. ; BRADL, J. ; RINKE, B. ; TRAKHTENBROT, L. ; DIETZEL, S. ; HAUSMANN, M. ; CREMER, T.: SpektralePräzisionsdistanzmikroskopie in der Genomforschung. In: *Z. Med. Phys.* 9 (1999), S. 14–20
- [22] CREMER, M. ; HASE, J. von ; VOLM, T. ; BRERO, A. ; KRETH, G. ; WALTER, J. ; FISCHER, C. ; SOLOVEI, I. ; CREMER, C. ; CREMER, T.: Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. In: *Chromosome Res.* 9 (2001), S. 541–567
- [23] CREMER, T. ; CREMER, C.: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. In: *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001), S. 292–301
- [24] CREMER, T. ; CREMER, C. ; BAUMANN, H. ; LUEDTKE, E.K. ; SPERLING, K. ; TEUBNER, V. ; ZORN, C.: Rabl's model of the interphase chromosome arrangement, tested in chinese hamster cells by premature chromosome condensation and Laser-UV-Microbeam experiments. In: *Hum. Genet.* 60 (1982), S. 46–56
- [25] CREMER, T. ; CREMER, M. ; DIETZEL, S. ; MÜLLER, S. ; SOLOVEI, I. ; FAKAN, S.: Chromosome territories - a functional nuclear landscape. In: *Curr. Op. Cell Biol.* 18 (2006), S. 307–316

- [26] CREMER, T. ; KRETH, G. ; KOESTER, H. ; FINK, R.H.A. ; HEINTZMANN, R. ; CREMER, M. ; SOLOVEI, I. ; ZINK, D. ; CREMER, C.: Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. In: *Crit. Rev. Eukar. Gene* 12(2) (2000), S. 179–212
- [27] CREMER, T. ; KURZ, A. ; ZIRBEL, R. ; DIETZEL, S. ; RINKE, B. ; SCHRÖCK, E. ; SPEICHER, M.R. ; MATHIEU, U. ; JAUCH, A. ; EMMERICH, P. ; SCHERTHAN, H. ; RIED, T. ; CREMER, C. ; LICHTER, P.: Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. In: *Symp. Quant. Bio. Cold Spring Harb.* (1993), S. 777–792
- [28] CREMER, T. ; LICHTER, P. ; BORDEN, J. ; WARD, D.C. ; MANUELIDIS, L.: Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome specific library probes. In: *Hum. Genet.* 80 (1988), S. 235–246
- [29] CROFT, J.A. ; BRIDGER, J.M. ; BOYLE, S. ; PERRY, P. ; TEAGUE, P. ; BICKMORE, W.A.: Differences in the Localization and Morphology of Chromosomes in the Human Nucleus. In: *J. Cell Biol.* 145 (1999), S. 1119–1131
- [30] CUISENAIRE, O.: *Distance transformations: Fast algorithms and applications to medical image processing.*, Laboratoire de Telecommunications et Teledetection, Universite catholique de Louvain, Diss., 1999
- [31] DIETZEL, S. ; SCHIEBEL, K. ; LITTLE, G. ; EDELMANN, P. ; RAPPOLD, G.A. ; EILS, R. ; CREMER, C. ; CREMER, T.: The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity. In: *Exp. Cell Res.* 252 (1999), S. 363–375
- [32] DURM, M. ; HAAR, F.M. ; HAUSMANN, M. ; LUDWIG, H. ; CREMER, C.: Non-Enzymatic, Low Temperature Fluorescence in situ Hybridization of Human Chromosomes with a Repetitive a-Satellite Probe. In: *Z.Naturforsch.* 52c (1997), S. 82–88
- [33] EDELMANN, P.: *Confocal spectral precision distance microscopy for the investigation of the functional 3D structure of the human genome*, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, Diss., 1999
- [34] EDELMANN, P. ; BORNFLETH, H. ; ZINK, D. ; CREMER, T. ; CREMER, C.: Morphology and dynamics of chromosome territories in living cells. In: *Biochim. Biophys. Acta* 87498 (2001), S. 1–11
- [35] EILS, R. ; DIETZEL, S. ; BERTIN, E. ; SCHRÖCK, E. ; SPEICHER, M. ; RIED, T. ; ROBERT-NICOUD, M. ; CREMER, T. ; CREMER, C.: Three-dimensional Reconstruction of painted human interphase chromosomes: Active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. In: *J. Cell Biol.* 135 (1996), S. 1427–1440
- [36] ENGH, G. van d. ; SACHS, R.K. ; TRASK, B.: Estimating genomic distance from DNA Sequence location in cell nuclei by a random walk model. In: *Science* 257 (1992), S. 1410–1412

- [37] ESA, A. ; EDELMANN, P. ; KRETH, G. ; TRAKHTENBROT, L. ; AMARIGLO, N. ; RECH-AVI, G. ; HAUSMANN, M. ; CREMER, C.: Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. In: *J. Microsc.* 199 (2000), S. 96–105
- [38] FAWCETT, D.W.: *A Textbook of Histology*. 12th. A Hodder Arnold Publication, 1997
- [39] FELSENFELD, G. ; DAVIES, R.D. ; RICH, A.: Formation of a three-stranded polynucleotide molecule. In: *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957), S. 2023–2024
- [40] FELSENFELD, G. ; GROUDINE, M.: Controlling the double helix. In: *Nature* 421 (2003), S. 448–453
- [41] FELSENFELD, G. ; RICH, A.: Studies on the formation of two and three stranded polynucleotides. In: *Biochim. Biophys. Acta* 26 (1957), S. 457–468
- [42] FENZ, S.: *Zwei-Farbenhochpräzisionsdistanzmessungen mit dem SMI-Mikroskop.*, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 2005
- [43] FISHER, T.L. ; TERHORST, T. ; CAO, X. ; WAGNER, R.W.: Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. In: *Nucleic Acids Res.* 21 (1993), S. 3857–3865
- [44] FITZGIBBON, A. ; PILU, M. ; FISHER, R.B.: Direct least square fitting of ellipses. In: *IEEE Pattern Anal.* 21 (1999), S. 476–480
- [45] GALL, J.G. ; PARDUE, M.L.: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969), S. 378–383
- [46] GIESEN, U. ; KLEIDER, W. ; BERDING, C. ; GEIGER, A. ; ORUM, H. ; NIELSEN, P.E.: A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. In: *Nucleic Acids Res.* 26 (1998), S. 5004–5006
- [47] GNU FREE DOCUMENTATION LICENSE, Wikipedia. *Abbildung einer PNA.* <http://en.wikipedia.org/wiki/PNA>
- [48] GNU FREE DOCUMENTATION LICENSE, Wikipedia. *Zellzyklus.* <http://www.biologie.de/biowiki/Zellzyklus>
- [49] GREINER, W.: *Klassische Elektrodynamik*. 5. Auflage. Thun-Verlag, 1991
- [50] GSL. *GNU scientific library.* <http://www.gnu.org/software/gsl/>
- [51] GU, M.: *Principles of Three-dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. World Scientific Publishing, Singapore, 1996
- [52] HAAR, F.M. ; DURM, M. ; HAUSMANN, M. ; LUDWIG, H. ; CREMER, C.: Optimization of Fast-FISH for α -satellite DNA probes. In: *J. Biochem. Biophys. Methods* 33 (1996), S. 43–54
- [53] HADWIGER, H.: *Vorlesung über Inhalt, Oberfläche und Isoperimetrie*. Springer Verlag Berlin, 1957

- [54] HAKEN, H. ; WOLF, H.C.: *Molekülphysik und Quantenchemie*. 3te Auflage. Springer-Verlag Berlin, 1998
- [55] HAKKE, AR. ; PALOKOWSKA, RR.: Cell Death by apoptosis in epidermal biology. In: *J. Invest. Dermatol.* 105 (1993), S. 333–338
- [56] HAUSMANN, M. ; WINKLER, R. ; DURM, M. ; CREMER, C.: Fluoreszenzmarkierung des ABL-Gens mit computerselektierten Oligo-DNA-Sonden. In: *12. Heidelberger Zytometrie Symposium Kurzfassung der Beiträge* (1999), S. ISSN 0949–5347
- [57] HAUSMANN, M. ; WINKLER, R. ; HILDENBRAND, G. ; FINSTERLE, J. ; WEISEL, A. ; RAPP, A. ; SCHMITT, E. ; JANZ, S. ; CREMER, C.: COMBO-FISH: specific labeling of nondenatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. In: *BioTechniques* 35 (2003), S. 564–577
- [58] HEINTZMANN, R.: *Resolution improvement of biological microscopic data*, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, Diss., 1999
- [59] HILDENBRAND, G. ; RAPP, A. ; SPÖRI, U. ; WAGNER, C. ; CREMER, C. ; HAUSMANN, M.: Nano-Sizing of Specific Gene Domains in Intact Human Cell Nuclei by Spatially Modulated Illumination Light Microscopy. In: *Biophys. J.* 88 (2005), S. 4312–4318
- [60] HUG, D. ; SCHNEIDER, R.: Kinematic and Crofton formulae of integral geometry: recent variants and extensions. In: *Homenatge al professor Lluís Santalo i Sors* (2002), S. 51–80
- [61] JÄHNE, B.: *Digital image processing*. 5th Edition. Springer Verlag, 2002
- [62] KERN, R. *Cell biology trading*. <http://www.ais2.com>
- [63] KNEMEYER, J.P. ; HERTEN, D.P. ; SAUER, M.: Detection and Identification of Single Molecules in Living Cells Using Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM). In: *Anal. Chem.* 75 (2003), S. 2147–2153
- [64] KNEMEYER, J.P. ; MARME, N. ; SAUER, M.: Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level. In: *Anal. Chem.* 72 (2000), S. 3717–3724
- [65] KNIPPERS, R. ; PHILIPPSEN, P. ; SCHÄFER, K.P. ; FANNING, E.: *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1990
- [66] KOPPELHUS, U. ; NIELSEN, P.E.: Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). In: *Adv. Drug Deliver Rev.* 55 (2003), S. 267–280
- [67] KOSAK, S.T. ; GROUDINE, M.: Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. In: *Genes Dev.* 18 (2004), S. 1371–1384
- [68] KOZUBEK, S. ; LUKASOVA, E. ; JIRSOVA, P. ; KOUTNA, I. ; KOZUBEK, M. ; GANOVA, A. ; BARTOVA, E. ; FALK, M. ; PASEKOVA, R.: 3D Structure of the human genome: order in randomness. In: *Chromosoma* 111 (2002), S. 321–331
- [69] KURZ, A. ; LAMPEL, S. ; NICKOLENKO, J.E. ; BRADL, J. ; BERMER, A. ; ZIRBEL, R.M. ; CREMER, T. ; LICHTER, P.: Active and Inactive Genes Localize Preferentially in the Periphery of Chromosome Territories. In: *J. Cell. Biol.* 135 (1996), S. 1195–1205

- [70] LICHTER, P. ; CREMER, T. ; BORDEN, J. ; MANUELIDIS, L. ; WARD, D.C.: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. In: *Hum. Genet.* 80 (1988), S. 224–234
- [71] MAHY, N. ; PERRY, P.E. ; BICKMORE, W.A.: Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH. In: *J. Cell Biol.* 159 (2002), S. 753–763
- [72] MAHY, N.L. ; PERRY, P.E. ; GILCHRIST, S. ; BALDOCK, R.A. ; BICKMORE, W.A.: Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. In: *J. Cell Biol.* 157 (2002), S. 579–589
- [73] MATHEE, H. ; BADDELEY, D. ; WOTZLAW, C. ; FANDREY, J. ; CREMER, C. ; BIRK, U.: Nanostructure of specific chromatin regions and nuclear complexes. In: *Histochem. Cell Biol.* 125 (2006), S. 75–82
- [74] MCNEIL, P.L. ; WERDER, E.: Glass beads load macromolecules into living cells. In: *J. Cell Sci.* 88 (1987), S. 669–678
- [75] MINSKY, M.: Microscopy Apparatus. In: *US Patent: 3013467* (1961)
- [76] MÜNDEL, Ch. ; LANGOWSKI, J.: Chromosome structure predicted by a polymer model. In: *Phys. Rev. E* 57 (1998), S. 5888–5897
- [77] MOLECULAR probes. *Spectraviewer*. <http://probes.invitrogen.com>
- [78] MOLENAAR, C. ; WIESMEIJER, K. ; VERWOERD, N.P. ; KHAZEN, S. ; EILS, R. ; TANKE, H.J. ; DIRKS, R.W.: Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. In: *EMBO J.* 22 (2003), S. 6631–6641
- [79] MONTANARI, U.: A method for obtaining skeletons using a quasi euclidean distance. In: *J. Assoc. Comp. Mach.* 15 (1968), S. 600–624
- [80] MURMANN, A.E. ; GAO, J. ; ENCINOSA, M. ; GAUTIER, M. ; PETER, M.E. ; EILS, R. ; LICHTER, P. ; ROWLEY, J.D.: Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. In: *Exp. Cell Res.* 311 (2005), S. 14–26
- [81] NIELSEN, P.E.: Peptide nucleic acid. A molecule with two identities. In: *J. Biochem. Biophys. Methods* 33 (1996), S. 43–54
- [82] NIELSEN, P.E. ; EGHOLM, M. ; BERG, R.H. ; BUCHARDT, O.: Sequence-selective recognition of dna by strand displacement with a thymine-substituted poyamide. In: *Science* 254 (1991), S. 1497–1500
- [83] NOGAMI, M. ; KOHDA, A. ; TAGUCHI, H. ; NAKAO, M. ; IKEMURA, T. ; OKUMURA, K.: Relative locations of the centromere and imprinted SNRPN gene within chromosome 15 territories during the cell cycle in HL60 cells. In: *J. Cell Sci.* 113 (2000), S. 2157–2165
- [84] OHSER, J. ; MÜCKLICH, F.: *Statistical analysis of microstructures materials science*. John Wiley, 2001
- [85] OLINS, A.L. ; OLINS, D.E.: Spheroid chromatin units (v bodies). In: *Science* 183 (1974), S. 330–332

- [86] OTSU, N.: A threshold selection method from grey level histograms. In: *IEEE Trans. System Man and Cybernetics* 9 (1979), S. 62–66
- [87] PARADA, L.A. ; MCQUEEN, P.G. ; MISTELI, T.: Tissue-specific spatial organization of genomes. In: *Genome Biol.* 5 (2004), S. R44
- [88] PEDERSON, T.: The spatial organization of the genome in mammalian cells. In: *Curr. Op. Cell Biol.* 14 (2004), S. 203–209
- [89] PINKEL, D. ; LANDEGENT, J. ; COLLINS, C. ; FUSCOE, J. ; SEGARVES, R. ; LUCAS, J. ; GRAY, J.W.: Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. In: *P. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988), S. 9138
- [90] PINKEL, D. ; STRAUME, T. ; GRAY, J.W.: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), S. 2934–2938
- [91] RABL, C.: Über Zellteilung. In: *Morphologisches Jahrbuch* 10 (1885), S. 214–330
- [92] RATILAINEN, T. ; HOLMEN, A. ; TUITE, E. ; NIELSEN, P.E. ; NORDEN, B.: Thermodynamics of sequence-specific binding of PNA to DNA. In: *Mamm. Genome* 39 (2000), S. 7781–7791
- [93] RAUCH, J.: *Spektrale Präzisionsdistanzmikroskopie zur Untersuchung der 3D-Topologie ausgewählter DNA-Marker*, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, Diss., 1999
- [94] REINERT, K. *Computational Molecular Biology.* <http://www.mpi-sb.mpg.de/units/ag1/projects/CompBio/vorlesungk/vorlesungk.html>
- [95] ROBINETT, C.C. ; STRAIGHT, A. ; LI, G. ; WILLHELM, C. ; SUDLOW, G. ; MURRAY, A. ; BELMONT, A.S.: In vivo localisation of DNA sequences and visualisation of large-scale chromatin organisation using lac operator/repressor recognition. In: *J. Cell Biol.* 135 (1996), S. 1685–1700
- [96] ROSENFELD, A. ; PFALTZ, J.L.: Distance functions on digital pictures. In: *Pattern Recogn.* 1 (1968), S. 33–61
- [97] RUSS, J.C.: *Computer-assisted microscopy: the measurement and analysis of images.* 3rd. Plenum Press, 1990
- [98] RUSS, J.C.: *The image processing handbook.* 3te Auflage. CRC Press, 1992
- [99] RYCHLIK, W. ; SPENCER, W.J. ; RHOADS, R.E.: Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. In: *Nucleic Acids Res.* 11 (1990), S. 6409–6412
- [100] SACHS, R.K. ; ENGH, G. van d. ; TRASK, B. ; YOKOTA, H. ; HEARST, J.E.: A randomwalk/giant-loop model for interphase chromosomes. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), S. 2710–2714

- [101] SCHARDIN, M. ; CREMER, T. ; HAGER, HD ; LANG, M.: Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. In: *Hum. Genet.* 71 (1985), S. 281–287
- [102] SCHEUERMANN, M.O. ; TAJBAKHS, J. ; KURZ, A. ; SARACOGLU, K. ; EILS, R. ; LICHTER, P.: Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. In: *Exp. Cell Res.* 301 (2004), S. 266–279
- [103] SCHNEIDER, B. ; BRADL, J. ; KIRSTEN, I. ; HAUSMANN, H. ; CREMER, C.: *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes.* 2te Auflage. Plenum Press, 1998
- [104] SCHNEIDER, B. ; UPMANN, I. ; KIRSTEN, I. ; BRADL, J. ; HAUSMANN, M. ; CREMER, C.: A dual-laser, spatially modulated illumination fluorescence microscope. In: *Microsc. & Anal.* 1/99 (1999), S. 5–7
- [105] SCHWARZ-FINSTERLE, J. ; STEIN, S. ; GROSSMANN, G. ; SCHMITT, E. ; SCHNEIDER, H. ; TRAKHTENBROT, L. ; REHAVI, G. ; AMARIGLIO, N. ; CREMER, C. ; HAUSMANN, M.: COMBO-FISH: specific labeling of nondenatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. In: *Cell Biol. Int.* 29 (2005), S. 1038–1045
- [106] STEIN, S.: *Bildanalytische Erfassung der räumlichen Organisation von Chromatin in Lymphozyten, Fibroblasten und Tumorzellen.*, Fakultät für Physik und Astronomie, Universität Heidelberg, Diplomarbeit, 2003
- [107] SUN, H.B. ; SHEN, J. ; YOKOTA, H.: Size-Dependent Positioning of Human Chromosomes in Interphase Nuclei. In: *Biophys. J.* 79 (2000), S. 184–190
- [108] TACKETT, A.J. ; COREY, D.R. ; RANEY, K.D.: Non-Watson-Crick interactions between PNA and DNA inhibit the ATPase activity of bacteriophage T4 Dda helicase. In: *Nucleic Acids Res.* 30 (2002), S. 950–957
- [109] TANABE, H. ; MULLER, S. ; NEUSSER, M. ; HASE, J. von ; CALCAGNO, E. ; CREMER, M. ; SOLOVEI, I. ; CREMER, C. ; CREMER, T.: Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002), S. 4424–4429
- [110] TJALMA, W. ; WEYLER, J. ; GOOVAERTS, G. ; DE POOTER, C. ; MARCK, Van ; DAM, P. van: Prognostic value of bcl-2 expression in patients with operable carcinoma of the uterine cervix. In: *J. Clin. Pathol.* 50 (1997), S. 33–36
- [111] TUMBAR, T. ; BELMONT, A.S.: Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator. In: *Nat. Cell. Biol.* 3 (2001), S. 134–139
- [112] TURNER, D.A. ; ANDERSON, I.J. ; MASON, J.C. ; COX, M.G.: An Algorithm for Fitting an Ellipsoid to Data. (2006)
- [113] VOET, D. ; VOET, J.G.: *Biochemistry.* Second Edition. John Wiley & Sons Inc., 1995
- [114] VOGEL, H.J.: Digital unbiased estimation of the euler-poincare characteristic in different dimensions. In: *Acta stereologica* 16 (1997), S. 97–104

- [115] WATSON, J.D. ; CRICK, F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (1953), S. 737–738
- [116] WIECH, T. ; TIMME, S. ; RIEDE, F. ; STEIN, S. ; SCHURICKE, M. ; CREMER, C. ; WERNER, M. ; HAUSMANN, M. ; WALCH, A.: Human archival tissues provide a valuable source for the analysis of spatial genome organization. In: *Histochem. Cell Biol.* 123 (2005), S. 229–238
- [117] WINKLER, R. ; PERNER, B. ; RAPP, A. ; DURM, M. ; CREMER, C. ; GREULICH, K.-O. ; HAUSMANN, M.: Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and near-field optical microscopy. In: *J. Microsc.* 209 (2003), S. 23–33
- [118] YAMADA, H.: Complete euclidean distance transform by parallel operation. In: *7th International Conference on Pattern Recognition* (1984), S. 336–338
- [119] YOKOTA, H. ; ENGH, G. van d. ; HEARST, F.E. ; SACHS, R.K. ; TRASK, B.J.: Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus. In: *J. Cell Biol.* 130 (1995), S. 1239–1249
- [120] YOUNG, IT: Proof without prejudice: Use of the kolmogorov–smirnov–test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. In: *J. Histochem. Cytochem.* 25 (1977), S. 935–941
- [121] ZERGEROGLU, S. ; GÜNGÖR, T. ; AKSAKAL, O.S. ; PARLAKYIGIT, E. ; KMEN, O.G.: Bcl2 expression in carcinoma of the uterine cervix and its relationship with prognostic variables. In: *Turk. J. Med. Sci.* 31 (2001), S. 401–404
- [122] ZINK, D. ; CREMER, T. ; SAFFRICH, R. ; FISCHER, R. ; TENDELENBURG, M.F. ; ANSORGE, W. ; STELZER, E.H.: Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. In: *Hum. Genet.* 102 (1998), S. 241–251
- [123] ZORN, C. ; CREMER, C. ; CREMER, T. ; ZIMMER, J.: Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. In: *Exp. Cell Res.* 124 (1979), S. 111

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformeln der Purin- und Pyrimidinbasen und der Desoxyribosen	1
1.2	Bildung des DNA-Doppelstrangs mittels Watson-Crick-Bindungen	2
1.3	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chromatin	3
1.4	Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphase-Chromosoms	3
1.5	Schematische Darstellung des Zellzyklus	4
1.6	Schematische Darstellung des erweiterten ICD-Modells	6
1.7	Schematische Darstellung der Chromatinstruktur und deren experimentelle Befunde	7
1.8	Schematische Darstellung der FISH-Methode	8
1.9	Darstellung der chemischen Struktur eines PNA-Strangs	9
1.10	Schematische Gegenüberstellung von COMBO-FISH und herkömmlicher FISH	11
1.11	Gegenüberstellung der mittels FISH und LTFISH markierten q12-Region von Metaphase-Chromosomen	12
1.12	Sequenz der Zentromer 9 PNA-Sonde	13
1.13	Schematische Gegenüberstellung der Definition der radialen Position in unterschiedlichen Zellkernformen	15
1.14	Schematische Darstellung der unterschiedlichen Zellkernkartierungen zur relativen radialen Positionierung	16
2.1	Jablonski-Termschema zur Veranschaulichung der Absorption und Emission von Molekülen	22
2.2	Schematische Darstellung des CLSM	23
2.3	Laterale und axiale PSF des CLSM	27
4.1	Relative radiale Abstände	40
4.2	Schwerpunktbasierte, relative radiale Positionierung in einem Zellkern	41
4.3	Beispiel für eine schwerpunktbasierte, relative radiale Positionierung von Objekten	42
4.4	Randbasierte, relative radiale Positionierung in einem Zellkern	43
4.5	Beispiel für eine randbasierte, relative radiale Positionierung von Objekten	44
4.6	Positionierung eines Gens relativ zur Chromosomenoberfläche	44
4.7	Vergleich zwischen schwerpunktbasierter und randbasierter, relative radialer Positionierung	45
4.8	Absolute euklidische Distanz zweier Objekte	46
4.9	Beispiel für die Anwendung der normierten Distanzen	47
4.10	Verdeutlichung der Eulerzahl	50
4.11	Vergleich zweier Strukturen mittels MF	51

4.12	Abschätzung der Fluorophorverteilung	52
5.1	Erklärung von Grauwerthistogrammen	57
5.2	Veranschaulichung der Hintergrundreduzierung an einem Beispiel	58
5.3	Aus der Anwendung von Binomialfiltern resultierende Grauwerthistogramme	59
5.4	Zellkerne und Chromosomenterritorien vor und nach der Anwendung von Binomialfiltern	60
5.5	Lokale und globale Hintergrundreduzierung	61
5.6	Funktionsweise des Isodataverfahrens	63
5.7	Veranschaulichung der Funktionsweise des globalen und lokalen Isodataverfahrens	64
5.8	Zellkerne und Chromosomenterritorien vor und nach der Anwendung eines aus dem Isodataverfahren resultierenden Schwellwerts	65
5.9	Veranschaulichung des Verfahrens nach Otsu	67
5.10	Filtermakse des Tophatfilters	69
5.11	Funktionsweise des Tophat Filters	70
5.12	Schwerpunktbasierte Zellkernkartierung	74
5.13	Filtermasken der Chamfer DT	75
5.14	Funktionsweise der Chamfering DT	76
5.15	Funktionsweise der Chamfering DT(1)	77
5.16	Filtermasken der euklidischen DT	78
5.17	Funktionsweise der euklidische DT	80
5.18	Marching Cube Methode	85
5.19	Spezifische Oberflächendichte	86
5.20	Eulerzahl	88
6.1	Bild der Mikroinjektionsanlage	93
6.2	Bild der AIS2 Bedieneroberfläche	94
6.3	Schematische Darstellung des Injektionvorgangs	96
6.4	Spektren der verwendeten Fluorophore	97
6.5	Darstellung von mikroinjizierten T-Lymphozyten, in welchen das Zentromer 9 mittels vCF markiert wurde	98
6.6	Darstellung der Metaphase-Chromosomen des Kolokalisationsexperiments	99
6.7	Darstellung von T-Lymphozyten in Interphase, in welchen das Zentromer 9 mittels vCF und FISH markiert wurde	99
6.8	Anzahl der Zentromer 9 Bindungen pro Zelle nach vCF	100
6.9	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen Position von Zentromer 9 und der absoluten Distanzen zwischen den Zentromeren 9, welches mittels vCF und FISH markiert wurde	101
7.1	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen, Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Volumens für das Chromosomenterritorium 18	110
7.2	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen, Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Volumens für das Chromosomenterritorium 19	111
7.3	Differenz zwischen den randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position des gleichen Chromosomenterritoriums	114

7.4	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Ergebnisse der KS-Tests der schwerpunkt-basierten und randbasierten, relative radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19	116
7.5	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Ergebnisse der KS-Tests des Vergleiches der Chamfering DT und euklidischen DT	118
7.6	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und der randbasierten, relative radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 in angepaßten Ellipsoiden und Fiborblastenzellkernen, Ergebnisse der KS-Tests, Mittelwerte und Standardabweichungen der Anpassungseffizienzen	121
7.7	Verhältnisse der MF der Chromosomenterritorien 19 zu 18	123
7.8	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der absoluten Distanzen der BCL2 Gene von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt.	128
7.9	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen Meßwerte der absoluten Distanzen der BCL2 Gene von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte in allen untersuchten Cervix-Gewebeschnitten.	129
7.10	Resultate der statistischen Untersuchung der absoluten Distanz der BCL2 Gene von der Oberfläche der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschnitten mittels KS-Test.	130
7.11	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt.	134
7.12	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes und in allen untersuchten Cervix-Gewebeschnitten.	135
7.13	Resultate der statistischen Untersuchung der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschnitten mittels KS-Test.	136
7.14	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt.	137
7.15	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen des Karzinomgewebes und in allen untersuchten Cervix-Gewebeschnitten.	138
7.16	Resultate der statistischen Untersuchung der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 in Zellkernen der Cervix-Gewebeschnitten mittels KS-Test.	139
7.17	Differenz der randbasierten und schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position des gleichen Chromosomenterritoriums 18 und des gleichen BCL2 Gens	142
7.18	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschnitt.	144

7.19	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen des Cervix-Karzinomgewebes und in allen untersuchten Cervix-Gewebeschichten.	145
7.20	Resultate der statistischen Untersuchung der randbasierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test.	146
7.21	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunktba- sierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der apikalen, intermediären und basalen Cervix-Gewebeschicht.	147
7.22	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Häufigkeitsverteilungen der Meßwerte der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen des Karzinomgewebes und in allen untersuchten Cervix-Gewebeschichten.	148
7.23	Resultate der statistischen Untersuchung der schwerpunkt-basierten, relativen radialen Position der BCL2 Gene in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test.	149
7.24	Distanzen und Schwerpunktwinkel zwischen den Chromosomenterritorien 18	152
7.25	Distanzen und Schwerpunktwinkel zwischen den BCL2 Genen	153
7.26	Resultate der statistischen Untersuchung der absoluten und normierten Distan- zen und der Schwerpunktwinkel zwischen den BCL2 Genen und zwischen den Chromosomenterritorien 18 der BCL2 Gene in Zellkernen der Cervix-Gewebeschichten mittels KS-Test.	154
7.27	Modell der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene auf Basis der schwer- punkt-basierten relativen randbasierten Positionierung	156
7.28	2D Projektionen und 3D Rekonstruktionen von Zellkernen, Chromosomen- territorien 18 und BCL2 Genen des Cervix-Gewebes	157
7.29	Modell der Chromosomenterritorien 18 und BCL2 Gene auf Basis der randba- sierten, relativen radialen Positionierung	158
7.30	Mittelwerte, Standardabweichungen und Häufigkeitsverteilungen der lateralen und axialen PSF-Messungen	162
7.31	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Ellipsoid- und Kugelvolumina des SNRPN Gens	165
7.32	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Kompaktierung des SNRPN Gens innerhalb eines Ellipsoid- und Kugelvoluminens	166
7.33	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der randbasierten, relativen radia- len Position der SNRPN Gene	169
7.34	normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Mittelwerte der Kugel- und Ellipsoidvolumina des zweiten Experimentes	172
7.35	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen und Mittelwerte der Kompaktie- rungen des zweiten Experimentes	173
7.36	Vergleich der Volumina der SNRPN Gene des zweiten Experimentes, welche sich aus den zwei Meßmethoden ergeben	174
7.37	Normiert kumulierte Häufigkeitsverteilungen der Volumenmessung mit Schwell- wert	175
7.38	Modell des SNRPN Gens aus dem ersten und zweiten Experiment	177
8.1	Immunohistochemische Färbung des BCL2 Proteins im normalen Cervix-Gewebe.	196
8.2	Topologisches Modell des Chromosom 18 und BCL2 Gens in Cervix-Gewebe.	197

8.3	Position der von K.Teller, J.Rauch und Y.Weiland verwendeten DNA-Sonden auf Chromosom 15	201
-----	---	-----

Tabellenverzeichnis

6.1	Meßergebnisse der randbasierten, relativen radialen Positionierung und absoluten Distanzen der Zentromere 9	102
6.2	Ergebnisse des statistischen Vergleichs der Topologie der Zentromere 9 mittels KS-Tests	102
7.1	Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Volumenanteile der Chromosomenterritorien 18 und 19	107
7.2	Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunktbasierten und randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 und 19 . . .	113
7.3	Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten Distanzen der Chromosomenterritorien 18 und 19 vom Zellkernrand	117
7.4	Mittelwerte und Standardabweichungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18 (n=56) und 19 (n=68) in Zellkernen und Ellipsoiden	119
7.5	Verhältnisse der MF für die experimentellen Chromosomenterritorien 19 zu 18 .	122
7.6	Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten Distanz des BCL2 Gens von der Oberfläche des Chromosomenterritoriums 18	126
7.7	Mittelwerte und Standardabweichungen der randbasierten, relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18	131
7.8	Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunktsbasierten relativen radialen Position der Chromosomenterritorien 18	131
7.9	Mittelwerte und Standardabweichungen der randbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens	140
7.10	Mittelwerte und Standardabweichungen der schwerpunktbasierten, relativen radialen Position des BCL2 Gens	140
7.11	Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten und normierten Distanzmessung und der Schwerpunktswinkelmessung zwischen den BCL2 Genen . . .	150
7.12	Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten und normierten Distanzmessung und der Schwerpunktswinkelmessung zwischen den Chromosomenterritorien 18	150
7.13	Ergebnisse der PSF-Messungen	161
7.14	Mittelere PSF-Halbwertsbreiten	161
7.15	Ergebnisse der Volumen und Kompaktierungsmessung am SNRPN Gen des ersten Experiments	163
7.16	Ergebnisse der randbasierten, relativen radialen Position des SNRPN Gens . . .	167
7.17	Ergebnisse Volumen und Kompaktierungsmessung am SNRPN Gen	170
7.18	Ergebnisse der Volumenmessung am SNRPN Gen mit Schwellwert	171