

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen

Gesamtfakultät

der Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Matthias Krufczik

aus Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.7.2017

**Reaktionen der Genomarchitektur auf ionisierende
Strahlung: Quantitative Analyse mittels neuer
Konzepte zur hochauflösenden
Lokalisationsmikroskopie**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Hausmann
Prof. Dr. Rainer H. A. Fink

Reaktion der Genomarchitektur auf ionisierende Strahlung: Quantitative Analyse mittels neuer Konzepte zur hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie

Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie ist zur Analyse der Zellkernstrukturen ein bewährtes Mittel. Nanometergroße DNA-Strukturen können durch die beugungsbegrenzte Auflösung konventioneller Mikroskope allerdings quantitativ nicht untersucht werden. Dazu müssen Methoden wie die hier verwendete Lokalisationsmikroskopie genutzt werden, die die optische Unterscheidung von Fluorophoren mit einem Mindestabstand von ca. 10 nm erlaubt und Strukturmessungen in solchen Größenordnungen damit ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ganze Vorgehen von der Zellkultur bis zur Datenauswertung für Lokalisationsmikroskopie optimiert, um die potentiell mögliche Präzision dieser Technik voll auszunutzen. Dazu wurden strukturbereinflussende Schritte bei der Präparation verringert und bei der Auswertung Filterungs- und Normierungsverfahren zur Angleichung der nicht vermeidbaren Fluoreszenzunterschiede entwickelt. Für die gemessenen molekularen Lokalisationsdaten wurden Cluster- und Distanzanalysen zur Erkennung und Quantifizierung von Strukturen verwendet. Ein gänzlich neuer Ansatz zur Strukturanalyse basierend auf persistenter Topologie wurden etabliert. Dies ermöglichte neue wissenschaftliche Perspektiven auf die hier behandelten strahlenbiophysikalischen Fragestellungen.

Die Untersuchung der Genomarchitektur nach Exposition mit ionisierender Strahlung zeigte, dass der Anteil an verpacktem Heterochromatin im Zellkern sich nach Bestrahlung ändert. Es konnte zum ersten Mal lokalisationsmikroskopisch bestätigt werden, dass DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturzentren durch die Nähe zu Heterochromatin strukturell beeinflusst werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Alu-DNA-Sequenzen fest, jedoch exkludierend, mit Heterochromatin assoziiert sind und eine genomstrukturierende Wirkung haben. Der deutlich messbare Einfluss von Bestrahlung auf diese DNA-Abschnitte kann für eine biologische Dosimetrie verwendet werden.

Response of genome architecture to ionizing radiation: quantitative analysis using new concepts for high resolution localisation microscopy

Light and fluorescence microscopy is a well-established tool for investigating the structure of the cell nucleus. However, nanometer-sized DNA structures cannot be quantitatively examined by diffraction-limited resolution of conventional microscopes. Localization microscopy as being used here permits the optical separation of fluorophores with a minimum distance of approximately 10 nm, so that structures of these orders of magnitude can be measured.

To get full benefit of the potentially possible precision the whole procedure from cell culture to data analysis was optimized for localisation microscopy. For this purpose, structure-influencing steps of the preparations were reduced. Filtering and normalization methods of computing were developed for the adaptation of the unavoidable fluorescence differences. Cluster and distance analyses were used to identify and quantify molecular structures. A completely new approach to structure analysis based on persistent topology was established. This has offered new scientific perspectives concerning the questions of radiation biophysics.

The study of genome architecture after exposure to ionizing radiation showed that the amount of densely packed heterochromatin in the nucleus changes. For the first time, it was confirmed by localization microscopy that DNA double strand break repair centres are structurally influenced by the proximity to heterochromatin. Furthermore, it was shown that Alu-DNA sequences are exclusively associated with heterochromatin and are responsible for genome-structuring. The measurable effect of radiation on these DNA segments can be used for biological dosimetry.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Mikroskopie	5
2.1.1	Geometrische Optik	5
2.1.2	Beugung	6
2.1.3	Auflösungslimit	7
2.1.4	Fluoreszenzmikroskopie	9
2.1.4.1	Fluoreszenz	10
2.1.4.2	Weitere Fluoreszenzphänomene - reversibles Photobleichen	10
2.1.4.3	Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie	12
2.1.4.4	Hochauflösende Mikroskopie	14
2.1.5	Lokalisationsmikroskopie	15
2.1.5.1	Funktionsprinzip	15
2.1.5.2	Punktlokalisierung	17
2.2	Biologische Grundlagen	20
2.2.1	Zellkern	20
2.2.2	Zellzyklus	20
2.2.3	Genomstruktur	21
2.2.3.1	Verpackung der DNA im Zellkern	21
2.2.3.2	Hetero- und Euchromatin	26
2.2.3.3	Chromosomenterritorien	28
2.2.4	Schäden der DNA	28
2.2.5	Alu-Sequenz	30
3	Grundlegende Methoden	33
3.1	Präparationsmethoden	33
3.1.1	Zellkultur und Bestrahlung	33
3.1.2	Fixierung	35
3.1.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	36

3.1.4	Immunofluoreszenz	37
3.1.5	Gegenfärbung und Einbettung	39
3.2	Mikroskopie	41
3.2.1	Mikroskopaufbau	41
3.2.2	Aufnahme von Lokalisationsrohdaten	43
3.2.3	Positionsbestimmung aus Lokalisationsrohdaten	43
3.2.4	Erstellung von Bildern aus Lokalisationsdaten	46
4	Optimierung der Präparationen zur nanoskaligen Chromatinstruktur-	
	analyse	51
4.1	Immunofluoreszenz	51
4.2	Combo-FISH	53
4.3	Kombination der Protokolle - Postfixierung	56
5	Entwicklung einer quantitativen Datenanalyse der Genomarchitektur	59
5.1	Motivation	59
5.2	Filterung und Normierung	60
5.3	Clusteranalyse	64
5.4	Distanzanalyse	67
5.5	Dichteanalyse	69
5.6	Bewertung der Güte von Daten	70
5.7	Mehrkanalanalyse	72
5.8	Topologische Datenauswertung	74
6	Automatisierte Auswertetoolbox	81
6.1	Chromatinanalyse	81
6.2	Chromatinanalyse-Erweiterungen	88
6.2.1	Fit-Optimierung	88
6.2.2	NearestNeighbour(NN)-Analyse	90
6.2.3	Dichte-Analyse	90
6.3	Overlay	91
6.4	Overlayanalyse	93
7	Analyse der Chromatinstruktur nach Strahlenexposition	95
7.1	Potential der Lokalisationsmikroskopie	95
7.2	Experimente	97
7.2.1	HeLa H2B GFP-Transfektion und Heterochromatin-	
	Immunofluoreszenz	97
7.2.2	SKBR3 Heterochromatin-Immunofluoreszenz nach Bestrah-	
	lung	97
7.2.2.1	Synchronisation in Zellphase G2 während und	
	nach der Bestrahlung	99
7.2.2.2	Synchronisation in Zellphase G2 während der	
	Bestrahlung	99

7.2.2.3	Kombination mit γ H2AX-Immunofluoreszenz	101
7.2.2.4	Kombination mit Alu-Combo-FISH	101
7.3	Lokalisationsmikroskopische Untersuchung	101
7.3.1	Vorbereitung der Daten	101
7.3.1.1	Filterung	101
7.3.1.2	Normierung	102
7.3.2	Analyse der H2B-Verteilung	102
7.3.3	Vergleich der Heterochromatin-Verteilung bei HeLa- und SKBR3-Zellen	102
7.3.4	Analyse der Heterochromatinverteilung nach Bestrahlung	104
7.3.4.1	Einfluss der DNA-Reparatur auf den Heterochromatinanteil in der G2-Phase	106
7.3.4.2	Einfluss der DNA-Reparatur auf den Heterochromatinanteil	110
7.3.5	DNA-Doppelstrangbrüche	112
7.3.5.1	Heterochromatinstruktur um γ H2AX-Reparaturzentren	112
7.3.5.2	Topologische Analyse der Struktur von γ H2AX-Reparaturzentren	121
7.3.6	Alu-DNA-Sequenzen nach Bestrahlung	128
7.3.6.1	Einfluss der Bestrahlung auf die Anzahl der Alu-Sequenzen	128
7.3.6.2	Strukturelle Zusammenhänge von Alu und Heterochromatin	131
8	Abschließende Betrachtung	139
8.1	Zusammenfassung	139
8.2	Diskussion	140
8.3	Fazit	145
9	Danksagung	147
A	Literaturverzeichnis	151
B	Abbildungsverzeichnis	167
C	Tabellenverzeichnis	171
D	Datenblätter	173
D.1	Zelllinie SKBR3	173
D.2	EM-CCD-Kamera	177
E	Publikationen	185
F	Konferenzbeiträge	187

Einleitung und Fragestellung

Der erwachsene menschliche Körper besteht aus mehr als 10^{14} Zellen, die einzeln oder im Verbund zahllose unterschiedliche Aufgaben erledigen, um das Überleben des Organismus' und das Fortbestehen der Gattung zu gewährleisten. Letztendlich basiert jede unserer Leistungen auf dem Funktionieren einzelner Zellen. Hierfür zwingend notwendig ist die Speicherung und Weitergabe von Information, die den *Bauplan des Lebens* enthält.

Für die Physik ist das Speichern von Informationen sowohl durch definierte Einheiten als auch durch strukturierte Anordnung solcher Einheiten ein bekanntes Konzept. Erwin Schrödinger prägte, noch bevor der Aufbau von Chromosomen und Zellkernchromatin molekularbiologisch und röntgenkristallographisch bekannt war, den Begriff des *aperiodischen Kristalls* als Träger des Lebens [1]. Heute wissen wir, dass die Erbinformation in riesigen Biomolekülen gespeichert wird, die auf komplexe Art im Zellkern strukturiert werden und dessen kleinste Einheit — in gewisser Weise dessen Einheitskristall, gebildet aus einem kleinen Ausschnitt des Biomoleküls und einem Proteinkomplex — das Nukleosom ist [2]. Moderne Mikroskopiemethoden erlauben tiefere Blicke in die Anordnung der Nukleosomen als jemals zuvor und trotzdem sind zentrale Fragen noch völlig unbeantwortet. Wie und nach welchen Kriterien die Erbinformation im Zellkern strukturiert wird und wie diese Struktur auf äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung reagiert — die Frage nach der Genomarchitektur und ihrer Organisation — ist eine dieser Fragen.

Im Jahr 1873 postulierte Ernst Abbe einen Mindestabstand von etwa 200 nm, den zwei Objekte beugungsbedingt haben müssen, um per Lichtmikroskopie noch unterschieden werden zu können [3]. Die Beugungsbegrenzung lässt sich bei der Fernfeldmikroskopie durch technische Verbesserungen prinzipiell nicht umgehen. Da Aperturwinkel in ihrer Öffnung an das Maximum des technisch

Machbaren gestoßen sind, bleiben noch Verfahren mit mehreren Objektiven wie 4Pi-Mikroskopie [4] zur beugungsbegrenzten Auslösungsverbesserung, die allerdings in der praktischen Handhabbarkeit gerade bei biologischen Objekten schnell an ihre Grenzen stoßen. Trotzdem ist es möglich, Fluoreszenzmoleküle voneinander zu unterscheiden, die einen beugungsbegrenzten Mindestabstand unterschreiten. Um von der Beugung unabhängig zu werden, können neben den Eigenschaften der Optik zusätzlich die der Fluoreszenzfarbstoffe berücksichtigt werden. Zum heutigen Zeitpunkt ist bereits eine beeindruckende Grenze gefallen, da die Positionen von Fluorophoren mit einer Genauigkeit von einem Nanometer bestimmt werden konnten [5] und somit der Ångström-Bereich betreten wird. Der Nobelpreis im Jahr 2014 für hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie zeigt die generelle Bedeutung dieser Methoden für die moderne Wissenschaft.

Diese beeindruckenden Technologien hochauflösender Fernfeld-Lichtmikroskopie können ihr Potential bisher nur bedingt in der biophysikalischen Forschung ausnutzen. Inhomogenitäten der zu untersuchenden Zellen und mit optimalen optischen Bedingungen inkompatible Präparationsmethoden schränken die Möglichkeiten der hochauflösenden Mikroskopieverfahren ein. Vielleicht das zentrale Problem dieses Bereichs ist der Mangel an Methoden, die hochaufgelösten Mikroskopiedaten für quantitative biophysikalisch interpretierbare Analysen zu nutzen: Welche Möglichkeiten existieren, um nanometergenau wiedergegebene biologische Strukturen quantitativ zu analysieren? Wie können diese Methoden für die Analyse der Genomarchitektur genutzt werden? Welche Fragen können damit für das biologische System beantwortet werden?

Seit das Wort Chromatin erstmal erwähnt wurde (ca. 1880) [2] ist die Frage nach der Strukturierung der DNA im Zellkern eine Frage der aktuellen Forschung. Viele Ideen wurden in den letzten hundert Jahren entwickelt, verworfen und wiederbelebt, so z.B. die *Chromosomenterritorien*, die nach aktuellem Stand der Wissenschaft existieren [6]. Die *nukleare Matrix* eine Art Gerüst, das für die Strukturierung der DNA sorgen soll, hingegen wird derzeit als ein überholtes Konzept angesehen [7]. Ob und wie die DNA in einem 30 nm-*Filament* angeordnet ist, ist bis zum heutigen Tag umstritten. Trotz aller Ungewissheiten ist eindeutig klar, dass die Strukturierung der DNA nicht willkürlich ist und einen erheblichen Einfluss auf die Funktionen des Zellkerns hat. Wie reagiert diese Struktur auf Schäden der DNA? Wie wird mit Schäden umgegangen, die sich in besonders dicht verpacktem Chromatin ereignen? Wenn die Strukturierung nicht durch eine nukleare Matrix geleistet wird, existieren dann Sequenzen der DNA selbst (z. B. repetitive Elemente), die eine solche Funktion übernehmen?

Im folgenden Kapitel 2 werden die notwendigen theoretischen Grundlagen zur Mikroskopie, zur Funktion der hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie sowie zur Genomstrukturierung vorgestellt. Kapitel 3 widmet sich den grundlegenden Fluoreszenzmarkierungsverfahren und dem Mikroskopaufbau. In Kapitel 4 werden die für nanoskalige Analysen notwendigen Optimierungen der Fluoreszenzmarkierungen vorgestellt. Dazu gehört zuvorderst die Vermeidung von genomstrukturverändernden Präparationsschritten. Kapitel 5 stellt Algorithmen

und Methoden, die zur quantitativen Analyse der nanoskaligen Genomarchitektur verwendet, verbessert und neu entwickelt wurden, vor. Auswertesysteme, wie Cluster-, Dichte- und Distanzanalysen werden im Hinblick auf ihre Stärken und Schwächen untersucht. Filterungs- und Normierungsverfahren wurden entwickelt, um nicht vermeidbare Inhomogenitäten der Fluoreszenz auszugleichen, und ein gänzlich neuer Ansatz zur Analyse von hochaufgelösten Daten mit Hilfe von persistenter Topologie wurde etabliert. Kapitel 6 beschreibt eine entwickelte automatisierte Auswertetoolbox, die Werkzeuge zur Filterung, Normierung, Bewertung, Strukturierung und Analyse von Daten zur Verfügung stellt. Kapitel 7 widmet sich den gewonnenen Resultaten zur Analyse der Genomarchitektur und ihrer Veränderung nach Exposition mit ionisierender Strahlung. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an verpacktem Heterochromatin sich nach Bestrahlung ändert. Die Rolle von Alu-DNA-Abschnitten und Heterochromatin bei der Genomstrukturierung wurde untersucht. Die lokalisationsmikroskopische Untersuchung von DNA-Reparaturzentren zeigt neue Ergebnisse im Hinblick auf das Verhältnis der Reparaturzentren und Heterochromatin. Darüber hinaus wird gezeigt, dass die Struktur dieser Reparaturzentren durch die Nähe zu Heterochromatin verändert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit geleistete Pionierarbeit erweitert die Anwendungen der hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie für die Strahlenbiophysik. Sie zeigt aber auch allgemein, welches Potential in der Kombination aus Lokalisationsmikroskopie, optimierter Präparation und quantitativer Analyse für vielfältige Untersuchungen nanoskaliger Strukturen und molekularer Organisationen steckt.

2.1 Mikroskopie

Die Erforschung der Genomarchitektur — des molekularen Aufbaus und der nanoskaligen Strukturierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. deoxyribonucleic acid) im Zellkern — und ihrer Reaktion auf DNA-Schäden ist ein zentrales Thema gegenwärtiger strahlenbiophysikalischer Forschung. Mit Hilfe von konventionellen biologischen Methoden konnten große Fortschritte hinsichtlich der epigenetischen Fragen und der involvierten Proteine gemacht werden. Methoden der konventionellen Licht-/Fluoreszenzmikroskopie haben ein umfassendes Bild über Aufbau und Funktion von Zellen geliefert. Will man jedoch auf die Analyse von supramolekularen Strukturen von Genomen im Zellkern ganz im Sinne des Schrödinger'schen aperiodischen Kristalls eingehen, sind Auflösungen von ca. 10 nm nötig. Dies ist mit konventioneller Mikroskopie nicht mehr erreichbar. Dafür sind Nanoskopieverfahren nötig, die das klassische Auflösungslimit der Beugung überwinden. Eine solche Methode, die den Charme besitzt, mittels etablierter optischer Komponenten und prinzipiell etablierter biologischer Präparationsverfahren dieses Ziel zu erreichen, ist die Lokalisationsmikroskopie, die im Folgenden beschrieben werden soll.

2.1.1 Geometrische Optik

Die geometrische Optik betrachtet Strahlbündel elektromagnetischer Wellen (z. B. Licht) und wie diese durch optische Elemente (z. B. Linsen) auf ihrem Weg beeinflusst werden (siehe dazu Abbildung 2.1). Diese Betrachtung ist aber nur innerhalb bestimmter Randbedingungen richtig. Wenn die Größe der betrachteten Objekte und die Wellenlänge des Lichtes in der gleichen Größenordnung liegen,

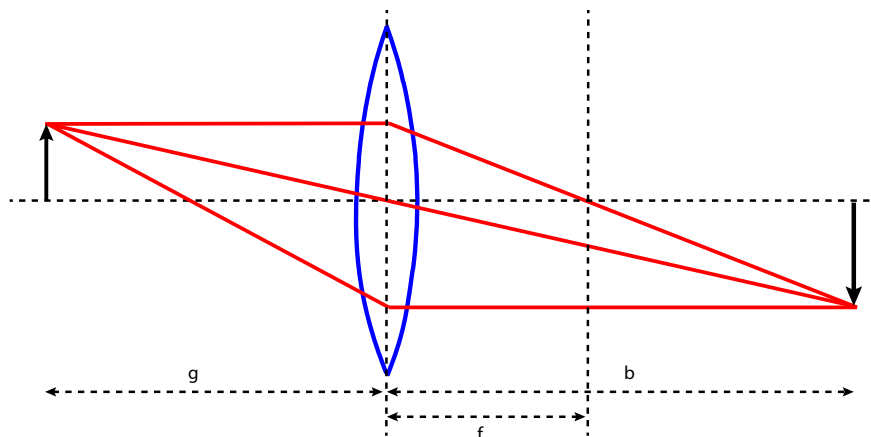


Abbildung 2.1: Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle gemäß der geometrischen Optik. Nach diesem Modell wird jede Punktquelle auch wieder als Punkt auf dem Bild dargestellt. (g : Abstand der Lichtquelle von der Linse. f : Brennweite der Linse. b : Abstand des Bildes von der Linse).

dann liefert die geometrische Optik keine ausreichenden Beschreibungen der Phänomene mehr, da Beugung nicht mehr vernachlässigt werden kann [8].

2.1.2 Beugung

Hochauflösende Mikroskopie bewegt sich in Größenordnungen, in denen die geometrische Optik kein ausreichendes Modell mehr darstellt, da die Auflösungsgrenze durch die Beugungseffekte begrenzt wird. Zur Vereinfachung wird hier zunächst das Bild einer Linse, die eine punktförmige Lichtquelle auf einem Schirm abbildet, betrachtet (siehe Abbildung 2.1).

Nach dem Huygens-Fresnelschen Prinzip [9] ist jeder Punkt, der von einer Wellenfront erreicht wird, Ausgangspunkt einer neuen kugelförmigen Elementarwelle, die miteinander interferieren. Das Bild einer punktförmigen Quelle wäre somit entgegen der Voraussage der geometrischen Optik kein Punkt, sondern stellt das Beugungsbild der Linse dar. Für einen einzelnen infinitesimalen Punkt nennt man die auf dem Schirm dargestellte Abbildung die Punktbildfunktion (PSF, engl. Point Spread Funktion). Die Intensitätsverteilung des Bildes für eine punktförmige Quelle abgebildet durch eine Linse kann somit wie folgt dargestellt werden [10] (siehe dazu auch Abbildung 2.2):

$$I(r) = I_0 \left[\frac{2J_1\left(\frac{2\pi ar}{\lambda f}\right)}{\frac{2\pi ar}{\lambda f}} \right]^2 \quad (2.1)$$

in lateraler Richtung mit J_i : Besselfunktion erster Ordnung. λ : Wellenlänge des Lichtes. f : Brennweite der Linse. $NA \approx n \frac{a}{f}$. r : Abstand vom Zentrum der PSF in der Abbildungsebene. a : Radius der Linse.

$$I(u) = \frac{\pi^2 a^4}{\lambda^2 f^2} \left[\frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right]^2$$

in axialer Richtung, wobei $u = \frac{2\pi}{\lambda} a^2 \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z}\right)$. z : Abstand der Linse zur Bildebene.

Ein System aus Punktquellen wird nicht als Punkte abgebildet, sondern durch ein System aus PSFs, die sich überlagern und somit ein verschmiertes Bild des ursprünglichen Systems aus Punktquellen zeigen (siehe dazu auch Abbildung 2.2).

2.1.3 Auflösungslimit

In der Mikroskopie versteht man unter Auflösung den kleinsten Abstand, den zwei Strukturen voneinander haben müssen, um noch unterschieden werden zu können. Neben technischen Einschränkungen der Auflösung (z. B. niederqualitative Linsen) existiert, wie oben beschrieben, eine Begrenzung der Auflösung durch die Beugung. Wenn zwei PSF sich zu stark überlagern, dann können sie nicht mehr unterschieden werden. Welchen minimalen Abstand müssen demnach zwei Punktquellen haben, damit sie noch aufgelöst werden können?

Dies wurde durch Ernst Abbe im Jahre 1873 untersucht [3]. Er beleuchtete senkrecht Strichgitter und stellte fest, dass das Mikroskopobjektiv neben dem Hauptmaximum des Beugungsmusters mindestens das erste Nebenmaximum (siehe dazu auch Abbildung 2.2, da dargestellt für Punktquellen) auffangen muss, damit die beiden Striche noch unterschieden werden können und nicht als ein Strich dargestellt werden. Demnach ist für die maximale Auflösung der Öffnungswinkel des Mikroskopobjektivs bedeutsam, was wiederum aufgrund der Brechung an den Grenzflächen auch vom Brechungsindex des Materials zwischen Objektiv und Probe abhängig ist (siehe Abbildung 2.3). Abbe hat dazu den Begriff der numerischen Apertur eingeführt, der definiert ist als:

$$NA = n \cdot \sin(\alpha)$$

α : halber Öffnungswinkel des Objektivs, n : Brechungsindex zwischen Objektiv und Probe.

Da die PSF außerdem von der Wellenlänge des Lichtes λ abhängig ist, ergibt sich für den minimalen Abstand D zweier Linien, die noch aufgelöst werden können:

$$D = 0,5 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

Für maximale Auflösung muss demnach die numerische Apertur entsprechend groß sein und die Wellenlänge des verwendeten Lichts möglichst klein sein. Fällt das Licht des ersten Nebenmaximums nicht mehr in das Objektiv, so können

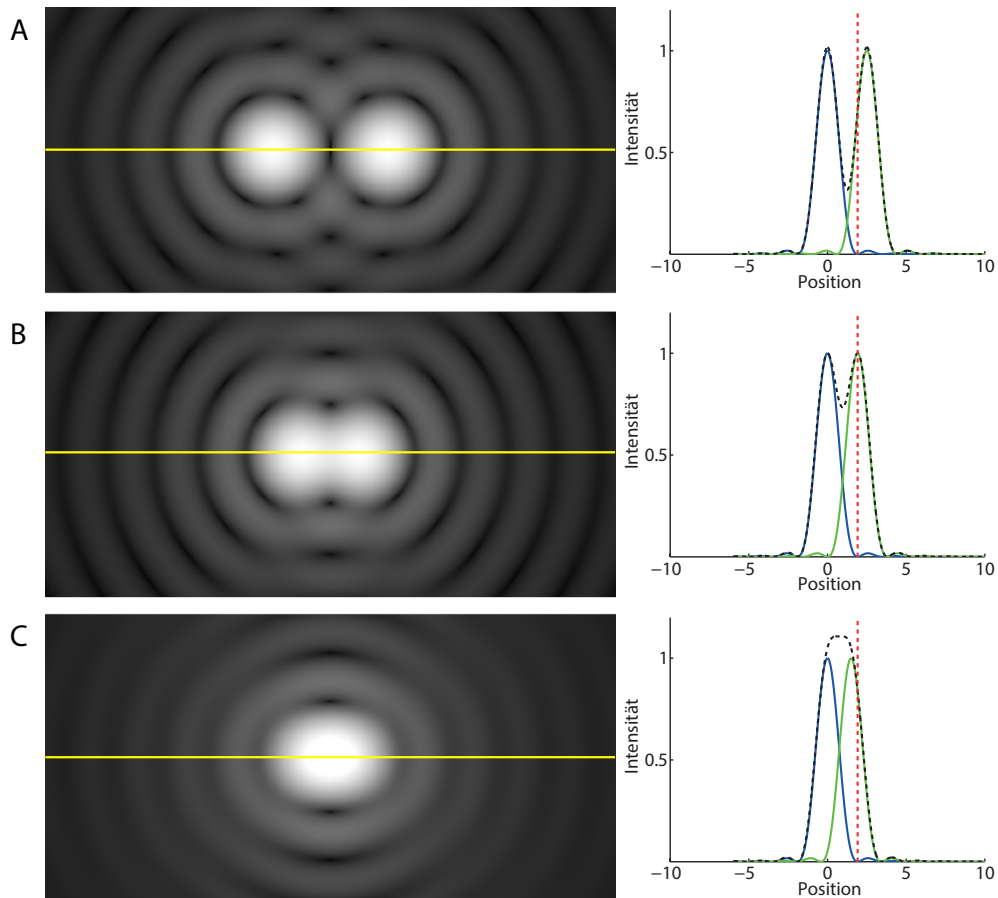


Abbildung 2.2: Abbildung von zwei punktförmigen Quellen durch eine Linse. Die linke Spalte zeigt das Bild der Punktquellen, wie es z. B. von einer Kamera dargestellt werden würde. Wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, ist das Bild kein Punkt, sondern die in Gleichung (2.1) beschriebene PSF. Die rechte Spalte zeigt die Intensitätsverteilung entlang der eingezeichneten gelben Linie. In Blau und Grün werden die beiden PSFs der Punktquellen dargestellt. In Rot ist zur besseren Übersichtlichkeit das erste Minimum der linken PSF markiert. Die schwarze Linie stellt die Summe der beiden PSFs dar und somit das beim Betrachter entstehende Bild. A: Abstand der Punktquellen ist deutlich größer als der kleinste noch auflösbare Abstand. B: Abstand der beiden Punktquellen entspricht genau dem Rayleigh-Kriterium (siehe Abschnitt 2.1.3). Die PSFs überlagern sich, aber das Maximum der PSF des einen Punktes liegt im ersten Minimum des zweiten Punktes und somit sind die beiden PSFs noch unterscheidbar. C: Der Abstand der beiden Punktquellen ist kleiner als der durch das Rayleigh-Kriterium als Mindestabstand vorgegebene Abstand, die PSFs überlagern sich so stark, dass sie nicht mehr unterscheidbar sind.

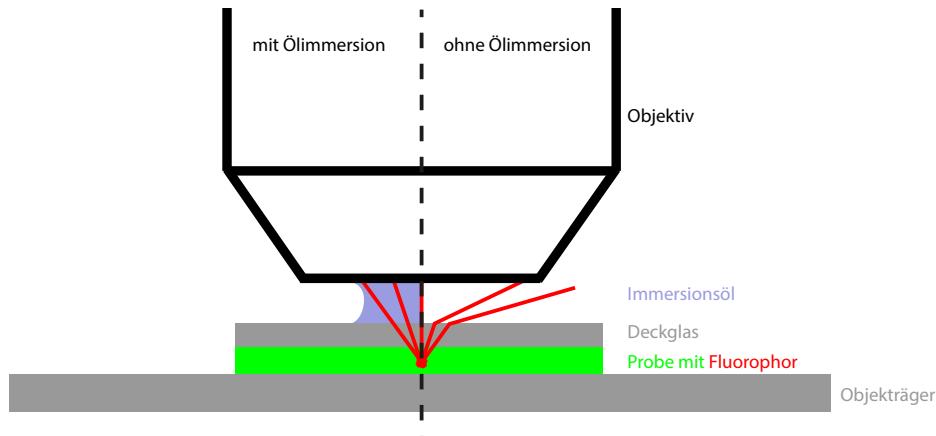


Abbildung 2.3: Darstellung eines Objektträgers mit Mikroskopobjektiv. Die linke Seite zeigt die Wirkung von Ölimmersion und zeigt, dass durch Angleichung des Brechungsindex zwischen Objektiv und Deckglas Brechung verhindert werden kann und somit Photonen eingefangen werden können, die sonst am Objektiv vorbeigebrochen worden wären.

die entsprechenden Linien nicht mehr aufgelöst bzw. unterschieden werden. Abbe betrachtete Linienmuster, die durch eine Lichtquelle angestrahlt wurden. Moderne Fluoreszenzmikroskopie aber verwendet selbstleuchtende Fluorophore, sodass sich die Gesetzmäßigkeiten ändern. Diese werden durch das Rayleigh-Kriterium beschrieben. Dieses besagt, dass zwei Punkte dann noch auflösbar sind, wenn das Maximum des einen Punktes im ersten Minimum des anderen Punktes liegt (siehe Abbildung 2.2). Dabei muss beachtet werden, dass es sich dabei um Konvention handelt und nicht um ein absolutes Kriterium. Es ergibt sich für den Mindestabstand:

$$D = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

2.1.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bei ursprünglichen Mikroskopieverfahren wurde die Probe beleuchtet und das durchgelassene bzw. reflektierte Licht wurde aufgefangen. Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Verwendung von Farbstoffen, die nach Anregung selbst leuchten. Spezielle molekularbiologische Verfahren erlauben es, die Farbstoffe an spezifische Orte in biologischen Strukturen zu bringen (z. B. Immunofluoreszenz- und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, siehe Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4). Da die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Strukturen dadurch selbst leuchten, stellt die Fluoreszenzmikroskopie eine erhebliche Weiterentwicklung dar, ohne die die moderne biologische Forschung und medizinische Diagnostik nicht vorstellbar wäre. Einerseits kann dies ausgenutzt werden, um zu überprüfen, ob ein gesuchtes Objekt sich überhaupt im Präparat befindet, und andererseits ermöglicht der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen eine erhebliche Kontraststeigerung bei quanti-

tativen Analysen, da alle nicht markierten Objekte vollständig separiert werden können. Durch den Einsatz von Filtern und somit der Abbildung von Licht nur bestimmter Wellenlängen, können markierte Objekte spezifisch voneinander differenziert werden, deren Unterscheidung sonst nicht möglich wäre.

2.1.4.1 Fluoreszenz

Fluoreszierende Moleküle können durch Absorption eines Photons der passenden Wellenlänge in einen angeregten Zustand überführt werden. Aus diesem angeregten Zustand kehren die Moleküle in der Regel durch Emission eines Photons wieder in den Ausgangszustand zurück. Dem Jablonski-Termschema (Abbildung 2.4) kann der Vorgang detailliert entnommen werden. Durch Absorption eines Photons geht das Molekül in einen angeregten Zustand (S1) über (siehe Abbildung 2.4 A). Die angeregten Moleküle verteilen sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedlichen vibronischen Zustände des angeregten Zustandes (S1) und gehen in nicht strahlenden Übergängen in den tiefsten vibronischen Zustand des angeregten Zustandes (S1) über. Von dort kommt es zum strahlenden Übergang in den Grundzustand (S0) (siehe Abbildung 2.4 B), meist in einen vibronisch höher gelegenen Zustand, wobei es erneut zu nicht strahlenden Übergängen in den vibronisch niedrigsten Zustand kommt. Die vibronischen Übergänge führen dazu, dass die emittierten Photonen weniger energiereich sind (d. h. eine größere Wellenlänge haben) als die Absorbierten. Diese Veränderung der Wellenlänge wird als Stokes-Shift bezeichnet und erlaubt die Unterscheidung von Anregungs- und Emissionsphotonen. Durch Einsatz von Filtern kann daher erreicht werden, dass nur das Emissionslicht abgebildet wird (siehe dazu auch Abbildung 2.5).

2.1.4.2 Weitere Fluoreszenzphänomene - reversibles Photobleichen

Neben den oben beschriebenen Übergängen, die sehr schnell ablaufen (ca. 10^{-15} s für die Absorption und 10^{-9} s für die Emission) sind auch langlebigere Zustände möglich [11]. Dies kann u. a. beim Intersystem Crossing (ISC) vorkommen, bei dem ein elektronischer Anregungszustand in einen anderen mit anderer Multiplizität strahlungslos übergeht [12, 13]. Z. B. kann der kurzlebige S1-Zustand in den langlebigeren T1-Zustand (ca. 10^{-3} s) übergehen, der seinerseits strahlungslos in den S0-Grundzustand übergeht (siehe Abbildung 2.4 D). Dies ist ein bei vielen Fluorophoren beobachtetes Phänomen und führt zu einem Effekt, der sich reversibles Photobleichen nennt, da die Fluorophore nur für einen kurzen Zeitraum in einen Dunkelzustand übergehen. Die Lebensdauer dieses Dunkelzustandes ist allerdings zu kurz, um das sogenannte „Blinkverhalten“ der Fluorophore zu erklären. [14, 15, 16, 17, 18]. Wie diese weiteren Dunkelzustände (siehe Abbildung 2.4 D1) zustande kommen, ist bisher nicht für alle Fluorophore völlig verstanden und könnte je nach Fluorophor durch unterschiedliche Effekte begründet sein [19].

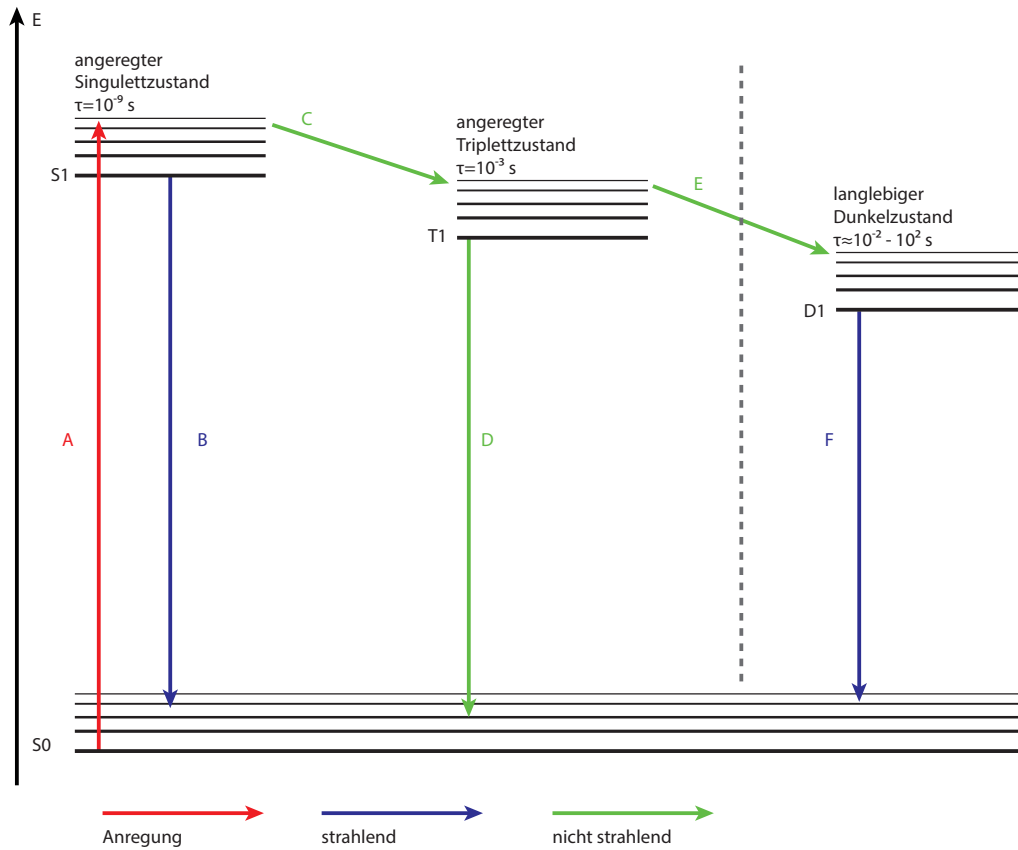


Abbildung 2.4: Jablonski-Diagramm eines Fluorophores. Die Absorption eines Photons und der Übergang vom Zustand S0 zum Zustand S1 (A) mit anschließender Rückkehr in den S0-Zustand unter Aussendung eines Photons (B) sind die Übergänge mit der größten Wahrscheinlichkeit. In einem Bruchteil der Fälle kann es zum sogenannten Intersystemcrossing kommen und zu einem nicht-strahlenden Übergang vom S1-Zustand in den T1-Zustand (C). Von dort ist die nicht-strahlende Rückkehr in den S0-Zustand (D) möglich. Unter speziellen Bedingungen kann der hier als D1 bezeichnete Zustand erreicht werden (E). Diese langlebigen Zustände haben bei den einzelnen Fluorophoren unterschiedliche Ursachen und treten unter unterschiedlichen Bedingungen auf.

In [18] wird beschrieben, dass die längerlebigen Dunkelzustände aus der Entstehung geladener Radikale resultieren. Dies konnte gezeigt werden, indem den Fluorophoren Reduktionsmittel, Oxidationsmittel und Mittel, die Reduktions- und Oxidationsmittel (ROXS-Mittel) gleichermaßen sind, zugegeben wurden. Die ersten beiden Versuche zeigten Blinkverhalten, wobei aufgrund der Zeitkonstanten des Blinkens der Übergang über den T1-Zustand nicht als Erklärung ausreichte. Beim dritten Experiment war kein Blinken zu beobachten, da die geladenen Radikale, auf denen die langlebigeren Zustände basieren, sofort wieder oxidiert oder reduziert wurden, anschließend in den Grundzustand S0 übergingen und damit wieder für eine Anregung in den Zustand S1 zur Verfügung standen. Von diesem können sie dann strahlend in den S0 Zustand übergehen. Durch Anwesenheit des ROXS-Mittels können die Radikale nicht lang genug existieren, um für ein reversibles Photobleichen der nötigen Dauer zur Verfügung zu stehen. Es kann daher auch kein Blinken beobachtet werden. Dieser Mechanismus könnte eine Reihe von langlebigeren Zuständen erklären.

In [20] werden die langlebigen Dunkelzustände des grün fluoreszierenden Proteins (GFP, engl. Green fluorescent protein) beschrieben. Diese entstehen durch den Wechsel eines Teils des Proteins von der cis- in die trans-Anordnung. Dieser Ansatz lässt sich auf viele weitere Fluoreszenzproteine übertragen, wobei allerdings noch nicht völlig verstanden ist, welche Anordnungen zu einem „reversibel gebleichten“ Zustand führen können.

2.1.4.3 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird der Stokes-Shift verwendet, um das emittierte Licht vom Anregungslicht zu unterscheiden (siehe dazu Abbildung 2.5). Im einfachsten Fall wird die gesamte Probe mit Licht der entsprechenden Wellenlänge beleuchtet, wobei alle Fluorophore innerhalb der Probe angeregt werden. Gemäß den genannten Auflösungskriterien (siehe dazu Abschnitt 2.1.3) ist eine Erhöhung der Auflösung durch Erhöhung der numerischen Apertur oder Verringerung der Wellenlänge möglich. Die Verwendung von beliebig kurzwelligem Licht ist aufgrund technischer Einschränkungen nicht möglich. Ultraviolettes Licht (Wellenlänge kleiner als 400 nm) wird von Glas absorbiert, das für die Herstellung von Objektiven verwendet wird, bedarf daher spezieller Linsen. Für noch niedrigere Wellenlängen (bis hin zu Röntgen) nimmt die Problematik der Linsen weiter zu, da für Sammellinsen in diesem Frequenzbereich bisher keine geeigneten Materialien verfügbar sind. Es werden daher sogenannte Zonenplatten verwendet, die anstatt auf Brechung, auf Beugung und Interferenz basieren.

Noch deutlich kürzere Wellenlängen können mit Elektronenmikroskopen erreicht werden. Allerdings sind für die Elektronenmikroskopie komplizierte und invasive Präparationsmethoden nötig. Z. B. sind als Farbstoffe nur Metalle geeignet. Außerdem können nur die Oberflächen der Proben analysiert werden [22].

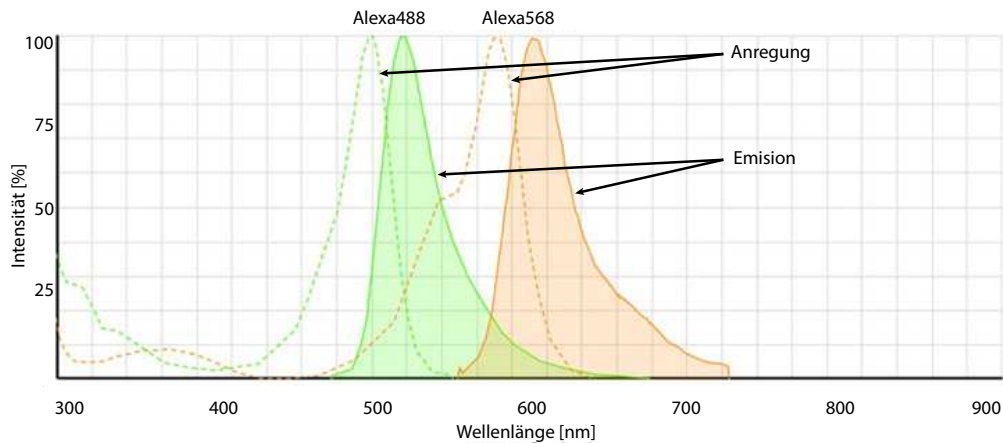


Abbildung 2.5: Anregungs- und Emissionsspektrum von zwei häufig eingesetzten Fluorophoren (Alexa 488 und Alexa 568). Die Emissionswellenlänge ist jeweils um einige Nanometer rotverschoben verglichen mit der Anregungswellenlänge (Stokes shift). Mit Hilfe von Filtern kann einerseits das Anregungs- vom Emissionslicht unterschieden werden, aber andererseits kann auch zwischen der Emission unterschiedlicher Fluorophore unterschieden werden. (Abbildung aus [21]).

Durch Verringerung der Wellenlänge lässt sich also der gewünschte Effekt der Auflösungsverbesserung nicht erreichen und außerdem bietet Lichtmikroskopie neben einer Sichtkontrolle durch den Experimentator den Vorteil etablierter Verfahren, sodass eine Vielzahl von Sonden zur Markierung zahlreicher unterschiedlicher Strukturen verfügbar sind. Des Weiteren ist der Einfluss der Präparationsmethoden auf die zu untersuchenden Strukturen im Vergleich mit den anderen Techniken minimal.

Eine Erhöhung der numerischen Apertur kann durch spezielle Objektive und Immersionsöle erreicht werden. Bei diesen Objektiven wird der Leerraum zwischen Objektiv und Deckglas durch Öl gefüllt (siehe dazu auch Abbildung 2.3). Wenn der Brechungsindex des Objektivs, des Öls und des Deckglases übereinstimmen, kann Brechung verhindert werden und somit mehr Licht vom Objektiv aufgefangen werden. Der Brechungsindex von Luft beträgt ca. 1, während Glas einen Brechungsindex von ca. 1,5 aufweist. Somit kann durch geeignete Immersionsöle eine Auflösungssteigerung von ca. 50% erreicht werden. Medien mit einem noch höheren Brechungsindex sind zwar bekannt, allerdings müssen auch entsprechende Objektive, Deckgläser, Objekträger und Einbettmedien zur Verfügung stehen und selbstverständlich muss auch der Brechungsindex der Probe dementsprechend sein. Die Lichtmikroskopie mit Ölimmersion und einem Brechungsindex von ca. 1,5 stellt damit das derzeitige Optimum der Auflösung für konventionelle Mikroskopie und einen guten noch tolerierbaren Kompromiss zu den optischen Eigenschaften eines biologischen Präparats dar. Damit können unter idealen Bedingungen Strukturen unterschieden werden, dessen

minimaler Abstand 200 nm nicht unterschreitet. Im Folgenden wird mit konventioneller Mikroskopie jene Mikroskopie bezeichnet, die bei diesem Abstand ihre Auflösungsgrenze hat.

2.1.4.4 Hochauflösende Mikroskopie

In den letzten Jahren wurden einige Methoden (z. B. Stimulated Emission Depletion (STED)-Microscopy [23, 24], Scanning Near-field Optical Microscopy (SNOM) [25], 4Pi-Microscopy [4], Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRF) [26], Structured Illumination Microscopy (SIM) [27]) entwickelt, die trotz Auflösungsgrenze Strukturen optisch unterscheiden können, deren Abstand kleiner als 200 nm ist [28]. Diese Verfahren werden als Nanoskopie oder hochauflösende Mikroskopie bezeichnet. Das vielleicht bekannteste Verfahren dieser Art ist die STED-Mikroskopie. Dabei handelt es sich um ein rasterndes Mikroskopieverfahren, d. h. nicht die gesamte Probe wird beleuchtet, sondern jeweils nur kleine Ausschnitte. Ziel ist es, einen möglichst kleinen Bereich zu beleuchten bzw. Fluoreszenz nur aus einem möglichst kleinen Bereich einzufangen.

STED-Mikroskopie nutzt eine spezielle Eigenschaft von bestimmten Fluorophoren. Wenn Fluorophore mit Licht ihrer Anregungswellenlänge λ_A beleuchtet werden, dann kommt es zu spontaner Emission (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.4.1). Werden sie aber zusätzlich mit Licht ihrer Emissionswellenlänge λ_E bestrahlt, so kann die spontane Emission unterdrückt werden und es kommt zu stimulierter Emission. Somit ist die Unterdrückung der spontanen Emission in einem bestimmten Bereich A einer Probe möglich, indem die gesamte Probe mit Licht der Wellenlänge λ_A und zusätzlich der Bereich A mit Licht der Wellenlänge λ_E bestrahlt wird.

Wenn nun ein kreisförmiger Bereich der Probe mit einem Laser der Wellenlänge λ_A bestrahlt wird und ein zweiter Laser λ_E mit einer kreisringförmigen Ausleuchtung die spontane Emission in diesem Kreisring unterbindet, so kann der Bereich, in dem noch spontane Emission stattfindet, kleiner gemacht werden, als dies aufgrund der Beugung für die Fokussierung mit Linsen eines Laserstrahls möglich wäre. Da nur ein sehr kleiner Ausschnitt des Präparats beleuchtet wird, verbessert dieses Verfahren die Auflösung und es ergibt sich für den Minimalabstand zweier auflösbarer Fluorophore:

$$D = \frac{\sqrt{8} \cdot \lambda}{2\pi n \cdot \sin(\alpha) \cdot \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}}$$

I : Intensität. I_{sat} : Intensität bei der die Wahrscheinlichkeit auf spontane Emission auf $\frac{1}{e}$ gefallen ist. (Weitere Angaben zum minimal auflösbaren Abstand zweier Fluorophore siehe Abschnitt 2.1.3).

Die Auflösung bei STED liegt bei einigen zehn Nanometern [29] und ist somit erheblich niedriger als bei konventioneller Mikroskopie. Allerdings bedarf diese Mikroskopie viel Geschick bei der Modifikation der Optik und funktioniert nur

mit wenigen Fluoreszenzfarbstoffen. Die im folgenden Abschnitt 2.1.5 vorgestellte Lokalisationsmikroskopie in der Variante Spectral Precision Distance Microscopy/Spectral Position Determination Microscopy (SPDM) [30] ist technisch weniger aufwendig und funktioniert mit zahlreichen Fluoreszenzfarbstoffen.

2.1.5 Lokalisationsmikroskopie

Lokalisationsmikroskopie kann die Positionen von einzelnen Fluorophoren mit einer Genauigkeit von ca. 10 nm bestimmen [31] und eröffnet neue Möglichkeiten der Analyse [32]. Dabei wird nicht die Auflösung des Mikroskops verbessert, wohl aber ergeben sich durch die verschiedenen lokalisationsmikroskopischen Ansätze Möglichkeiten, die Position des Fluorophores mit erheblich erhöhter Genauigkeit zu bestimmen, als das Abbe-Limit (ca. 200 nm) vermuten lassen würden.

Abbildung 2.6 zeigt die Vorteile im Vergleich zu konventioneller Mikroskopie. Um diese Genauigkeit zu erreichen, müssen Fluorophore voneinander separiert werden, deren PSFs (siehe Abschnitt 2.1.2) sich deutlich überlagern und deren Positionen bestimmt werden. Eine solche Positionsbestimmung kann deutlich genauer sein, als die optische Auflösung, die das System zulassen würde, wie bereits in [33] gezeigt. In Abschnitt 2.1.3 wird beschrieben, dass die Separierung von zwei PSFs, die sich über das erste Nebenmaximum hinaus überlagern, aufgrund der Beugung nicht möglich ist. Dieses Problem kann nur überwunden werden, wenn in einem auflösungsbeschränkten Bereich stets immer nur ein Fluorophor fluoreszent ist, dann kann aus der PSF dieses Fluorophores, die sich dann mit keiner anderen PSF überlagert, die Position des Fluorophors berechnet werden. Dies kann erreicht werden entweder durch photoschaltbare bzw. photoaktivierbare Fluorophore oder durch die Ausnutzung von langlebigen Dunkelzuständen, die bei bestimmten Fluorophoren (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.4.2) auftreten.

2.1.5.1 Funktionsprinzip

Es existieren Fluorophore, die zunächst Licht einer bestimmten Wellenlänge λ_{ein} benötigen, um „eingeschaltet“ zu werden und erst anschließend durch Licht einer Wellenlänge $\lambda \neq \lambda_{ein}$, angeregt werden können [34]. D. h. trotz Bestrahlung mit der dem Fluorophore entsprechenden Anregungswellenlänge λ bleiben die Fluorophore dunkel. Durch Zuschalten von Licht der Wellenlänge λ_{ein} werden Fluorophore fluoreszent, wobei die Anzahl der pro Zeit „eingeschalteten“ Fluorophore stochastisch ist, aber gleichzeitig mit der Intensität des Lasers λ_{ein} korreliert. Bei passender Einstellung des Laser λ_{ein} sind stets nur eine begrenzte Anzahl von Fluorophoren fluoreszent und ihr Abstand größer als das Auflösungs-limit. Eine Aufnahme über einen bestimmten Zeitraum ermöglicht dann, die einzelnen leuchtenden Fluorophore aufzuzeichnen und ihre Positionen aus den PSFs zu berechnen (siehe dazu auch Abbildung 2.7).

Andere Methoden (z. B. SPDM) verwenden eine Eigenschaft zahlreicher Fluorophore, die unter Abschnitt 2.1.4.2 beschrieben wurde. Das Auftreten langlebiger

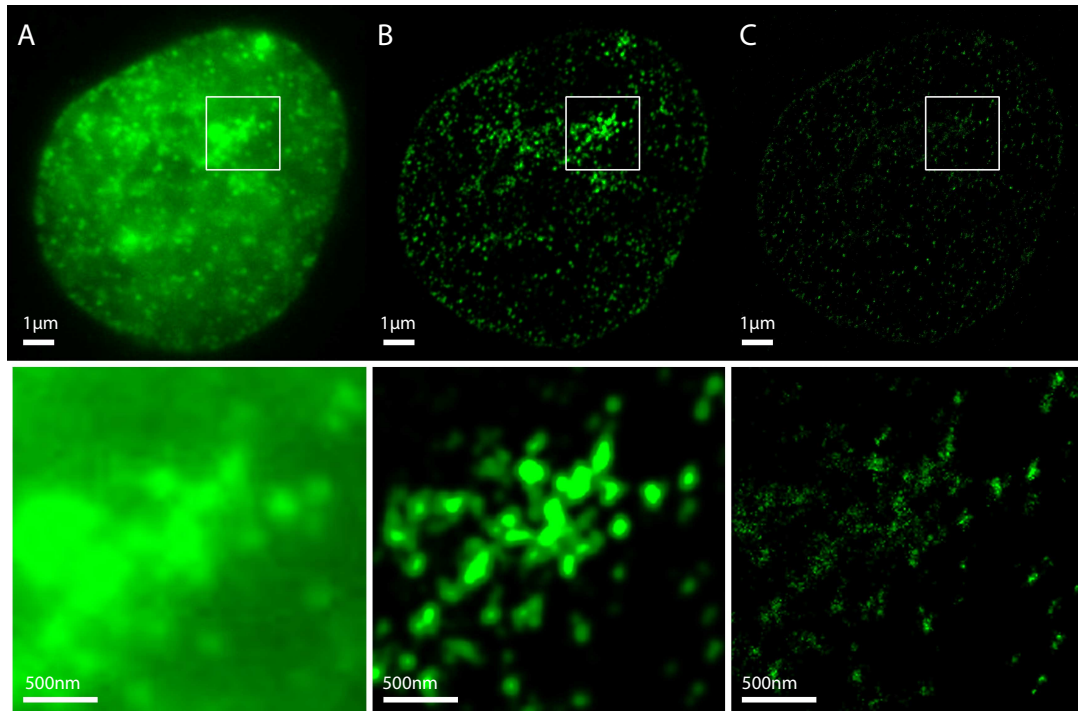


Abbildung 2.6: Darstellung einer Heterochromatin-Markierung in einem Zellkern (siehe Abschnitt 2.2). A: Konventionelle Mikroskopie. B: Lokalisationsmikroskopische Aufnahmen mit Gaußfilterung. C: Lokalisationsmikroskopische Aufnahme bei maximal erreichter Auflösung.

Dunkelzustände kann ausgenutzt werden, um die nötige Unterscheidung von Fluorophoren innerhalb der Auflösungsgrenze zu erreichen. Bei der richtigen Laserintensität (typischerweise einige kW/cm²) können Fluorophore in einen langlebigen Dunkelzustand übergehen. Da dieser Übergang mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und diese (bis zu gewissen Grenzen) durch die Laserintensität steuerbar ist, kann dieser Vorgang ausgenutzt werden, damit in einem auflösungsbeschränkten Bereich stets nur ein Fluorophor fluoreszent ist. Erneut muss das „Aufblinken“ der Fluorophore über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet werden, um anschließend die exakten Positionen der Fluorophore zu bestimmen (siehe dazu auch Abbildung 2.7). Der offensichtliche Vorteil dieser Methode im Vergleich zu den schaltbaren Fluorophoren ist, dass nur ein Laser benötigt wird und in der Regel viele gewöhnlich verwendete Fluorophore mit dieser Methode funktionieren, sodass viele gängige und funktionierende Präparationen verwendet werden können. SPDM hat verglichen mit STED (siehe Abschnitt 2.1.4.4) einige Vorteile, da sie Genauigkeiten im Bereich von 10 nm erreicht, keine speziellen Fluorophore nötig sind und durch den Einsatz nur eines Lasers der technische Aufwand für den Betrieb eines solchen Mikroskops begrenzt ist.

2.1.5.2 Punktllokalisierung

Die Rohdaten liegen nach der Mikroskopie in Form eines Bilderstapels (siehe Abbildung 2.7 B) vor. In jedem Bild des Bilderstapels sind nur Punkte sichtbar, deren Abstand größer als das Abbe-Limit ist (siehe Abbildung 2.7 C). Die Aufnahme des Bilderstapels passiert mit Hilfe von Kameras, bei denen jedem Pixel der Kamera ein bestimmter Teil des Objekts entspricht. Dadurch entspricht jedem Pixel auch eine bestimmte Größe des Objekts (Pixelgröße), die auf ihm abgebildet wird. Typische Werte bei Lokalisationsmikroskopen liegen im Bereich von ca. 80 nm pro Pixel. Jeder einzelne Punkt wird (wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben) nicht als Punkt dargestellt, sondern als PSF, deren Zentrum nun bestimmt werden kann (siehe Abbildung 2.7 D). Das Zentrum der PSF entspricht dann der Position des Fluorophores, womit eine viel höhere Präzision erreicht werden kann, als das ursprüngliche Signal des Mikroskops zulassen würde [36]. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung ist auch erheblich kleiner als die Pixelgröße der Mikroskopkamera. Die Ungenauigkeit der Position des Fluorophores hängt damit nur noch von der Positionsbestimmungsungenauigkeit Δx ($\hat{=}$ Lokalisationsungenauigkeit) ab, die ihrerseits in erheblichem Maß von der Anzahl der detektierten Photonen abhängt [37] (alle folgenden Betrachtungen werden zur besseren Übersichtlichkeit für den eindimensionalen Fall durchgeführt):

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2}{N}$$

s ist die Standardabweichung der PSF (z. B. angenähert durch eine Gaußfunktion) und N die Anzahl der gemessenen Photonen.

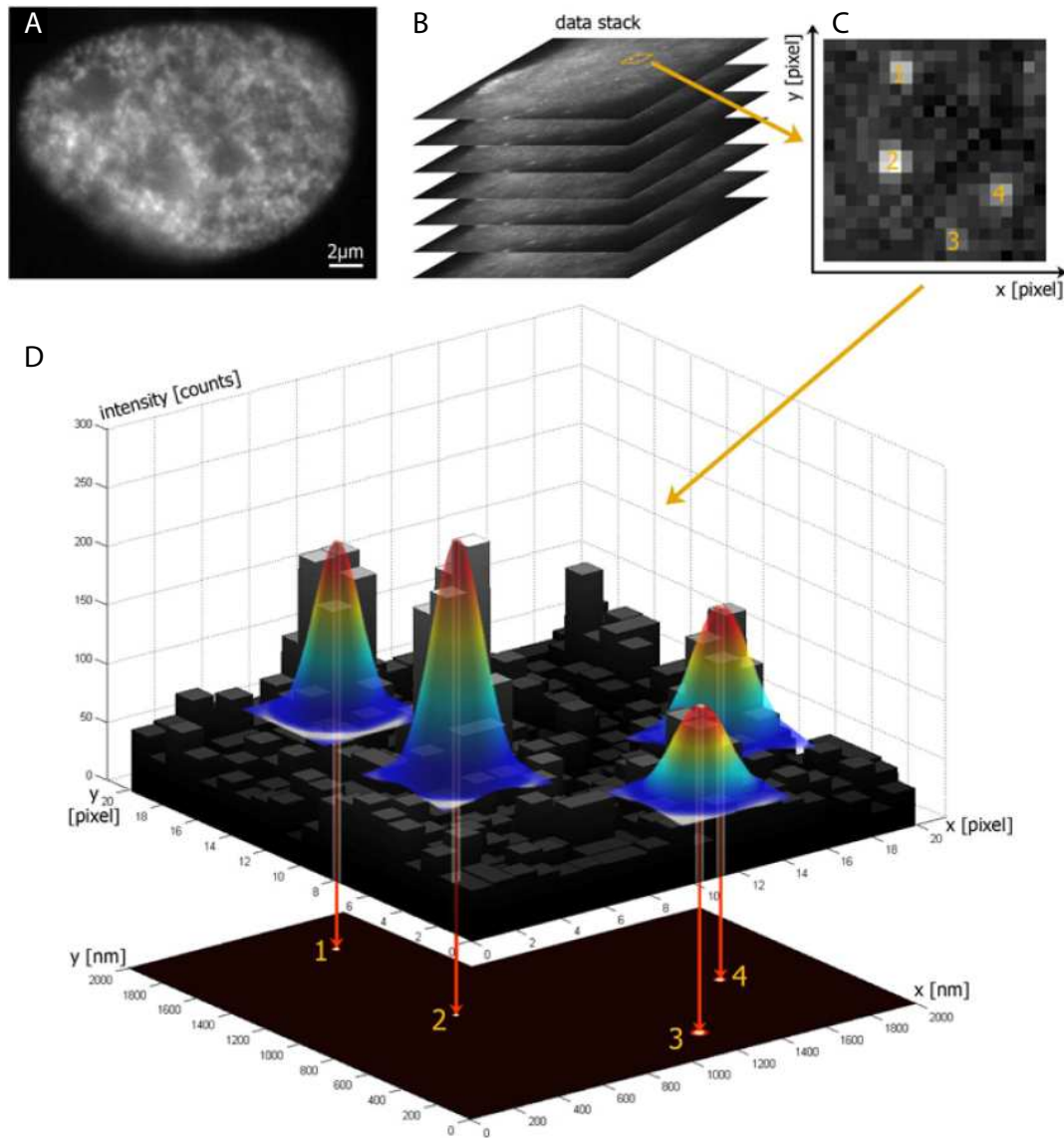


Abbildung 2.7: Funktionsprinzip von Lokalisationsmikroskopie. A: Die zu untersuchende Probe wird mit den entsprechenden Lasern bestrahlt. B: In festen Zeitabständen (typischerweise ≈ 100 ms) werden Bilder aufgenommen und zu einem Bilderstapel zusammengefügt. C: Wurden die Einstellungen der Laser entsprechend der Probe gewählt, dann sind auf jedem Bild des Bilderstapels im Mittel nur Fluorophore fluoreszent, deren Abstand größer als die Auflösungsgrenze des Mikroskops ist (d. h. die PSFs sind deutlich unterscheidbar, wie in 2.2 A dargestellt). D: Gemäß dem in Abschnitt 2.1.5.2 beschriebenen Verfahren kann dann aus der PSF die exakte Position des Fluorophores bestimmt werden (Abbildung aus [35]).

Hinzu kommen aber weitere Ungenauigkeiten durch die endliche Größe a der Pixel der Kamera, da zwar gemessen wird, welcher Pixel der Kamera das Photon aufgenommen hat, aber die Position des Photons innerhalb des Pixels nicht mehr messbar ist. Dies führt zu

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} \quad (2.2)$$

mit der Pixelgröße a .

Berücksichtigt werden muss auch das Hintergrundrauschen, das aus Photonen resultiert, die nicht von dem zu untersuchenden Fluorophor stammen. Zur Berechnung des erwarteten Einfluss des Hintergrundrauschen kann vom Kriterium für die Funktions-Anpassung nach dem Least-Square-Verfahren ausgegangen werden.

$$\chi^2 = \sum \frac{(y_i - N_i(x))^2}{\sigma_i^2}, \quad (2.3)$$

wobei x die Position des Fluorophores ist, i die Position des Pixels angibt, N_i die erwartete Anzahl der gemessenen Photonen und y_i die tatsächliche Anzahl Photonen darstellt. σ_i ist die erwartete Abweichung der Photonenzahl, wobei gilt:

$$\sigma_i^2 = N_i + b^2$$

mit dem Hintergrundrauschen b .

Für $d\chi^2/dx = 0$ ergibt sich aus (2.3):

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{1}{\sum N_i'^2 / \sigma_i^2} \quad (2.4)$$

mit der Ableitung von N_i an der Position des Fluorophors N_i' .

Wenn angenommen wird, dass für N_i gilt:

$$N_i = \frac{N}{\sqrt{2\pi s}} e^{-i^2/2s^2}$$

und dies (2.4) eingesetzt wird, dann ergibt sich für die erwartete Lokalisations-ungenauigkeit durch Hintergrundrauschen:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}$$

Zusammengenommen mit Gleichung (2.2) ergibt sich:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}$$

Die genauen Herleitungen und weitere Betrachtungen zum Einfluss der Photonenanzahl auf die Lokalisationsungenauigkeit finden sich in [37]. Eine detaillierte Beschreibung des verwendeten Computeralgorithmus zur Punkterkennung findet sich in Abschnitt 3.2.3.

2.2 Biologische Grundlagen

2.2.1 Zellkern

Die Zelle ist in der Lage Nährstoffe aufzunehmen, die darin gebundene Energie für sich nutzbar zu machen, Abfallprodukte auszuscheiden und sie kann auf äußere Reize reagieren. Je nach Zelltyp ist es ihr möglich, sich zu bewegen, sich durch Zellteilung zu vermehren, Gewebe zu bilden usw. Da die Substrukturen der Zelle allein nicht mehr über diese Fähigkeiten verfügen, wird die Zelle häufig als die kleinste Einheit alles Lebens bezeichnet. Zellen lassen sich in verschiedene Klassen einteilen, in die prokaryotischen und eukaryotischen Zellen. Zu den prokaryotischen zählen z. B. die Bakterien, zu den eukaryotischen die tierischen Zellen. Der wichtigste Unterschied zwischen diesen beiden Zelltypen ist die Existenz eines Zellkerns in eukaryotischen Zellen. Die eukaryotischen Zellen ihrerseits können wiederum in pflanzliche, tierische und Pilz-Zellen eingeteilt werden. Die Zelle ist aufgebaut aus verschiedenen abgegrenzten Strukturen und Komponenten, den Zellorganellen. Für diese Arbeit, die sich mit der Strukturierung der DNA befasst, ist daher das Organell „Zellkern“ relevant, da dieser die DNA enthält. Der Zellkern wird durch seine Kernmembran von den anderen Zellorganellen abgegrenzt.

2.2.2 Zellzyklus

Die meisten eukaryotischen Zellen sind in der Lage, sich zu teilen, um abgestorbene Zellen zu ersetzen. Dabei muss jeweils die ganze Erbinformation weitergegeben werden. Die Verdoppelung der Chromosomen ist damit ein zentraler Bestandteil der Zellteilung und passiert in der Interphase des Zellzyklus, der die untenstehenden Phasen G1, S und G2 umfasst.

- G0: In dieser Phase befindet sich die Zelle, wenn sie sich nicht teilt und auch nicht in Vorbereitung einer Zellteilung ist.
- G1: Die Vorbereitung der Zellteilung beginnt mit der G1-Phase. Die Zelle wächst in dieser Phase und erhöht den Anteil an bestimmten Zellorganellen und Proteinen
- S: In der S-Phase werden die Chromosomen verdoppelt, sodass bei der anstehenden Zellteilung jede neue Zelle einen vollständigen Satz Chromosomen erhält.

- G2: Nach Abschluss der Verdoppelung der Chromosomen geht die Zelle in die G2-Phase über und wird in dieser weiter wachsen sowie Proteine für die anstehende Zellteilung synthetisieren.
- M: In der M-Phase kommt es zur eigentlichen Zellteilung. Die Zellkernmembran wird aufgelöst und die Chromosomen werden auf die zwei neuen Zellen aufgeteilt. Anschließend befindet sich die Zelle wieder in der G0-Phase oder der G1-Phase (z.B. bei wachsenden Organen oder Tumoren).

2.2.3 Genomstruktur

Mit der Charakterisierung der Desoxyribonukleinsäure im Jahr 1953 durch Watson und Crick [38] (Nobelpreis im Jahr 1962) endete die Frühphase der Genetik und die molekulare Genetik begann. Seitdem wurden zahllose Erkenntnisse über den Zellkern, seinen molekularen Aufbau und seine molekularbiologische Funktion gewonnen. Dagegen steht die Erforschung der Genomarchitektur und wie diese durch die Zelle gemäß den anstehenden Aufgaben gesteuert wird noch am Beginn.

2.2.3.1 Verpackung der DNA im Zellkern

Die DNA ist ein in allen Lebewesen vorkommendes Biomolekül, das die Erbinformationen enthält und in der Regel als Doppelhelix vorliegt (siehe Abbildung 2.8). Seit der Entdeckung der DNA und ihrer Entschlüsselung ist viel in diesem Bereich geforscht worden und über die Organisation von Genen und den Aufbau der DNA herausgefunden worden. Die Genome konnten kategorisiert werden (u. a. Eukaryonten-, Prokaryonten-, Virus-Genome). Die Erforschung der DNA-Verpackung hat die Erstellung von Modellen ermöglicht, wie die DNA-Moleküle trotz ihrer Länge im Zellkern untergebracht werden können [40]. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen deuteten an, dass die DNA eine Art Perlenkette bildet (siehe Abbildung 2.9), deren Einheiten die Nukleosomen darstellen. Dabei ist die DNA um Histonoktamere gewickelt, die aus acht Histonproteinen bestehen. Die zur Bildung notwendigen Histonproteine tragen die Namen H2A, H2B, H3 und H4, wobei jedes jeweils doppelt zur Bildung eines Histonoktamers verwendet wird. Der molekulare Aufbau der Histonoktamere kann als fassähnlich bezeichnet werden. Um diese Proteinkomplexe ist die DNA zweimal gewunden ist [43] (siehe Abbildung 2.10).

Diese zwei Windungen umfassen 140-150 Basenpaare DNA, zusätzlich wird für die Verbindung zweier Histonoktamere ein Stück DNA (Linker-DNA) benötigt, das 20-60 Basenpaare lang ist. Somit werden pro Histonoktamer ca. 160-210 Basenpaare DNA gebunden (siehe Abbildung 2.10). Dieser Komplex wird als Nukleosom bezeichnet [44]. Für eine möglichst hohe Dichte der Histonoktamere sorgen die sogenannten Linker-Histone (Abbildung 2.9), wobei bisher noch nicht genau erforscht ist, wo und wie die Linker-Histone genau mit dem Nukleosom verbunden sind [39].

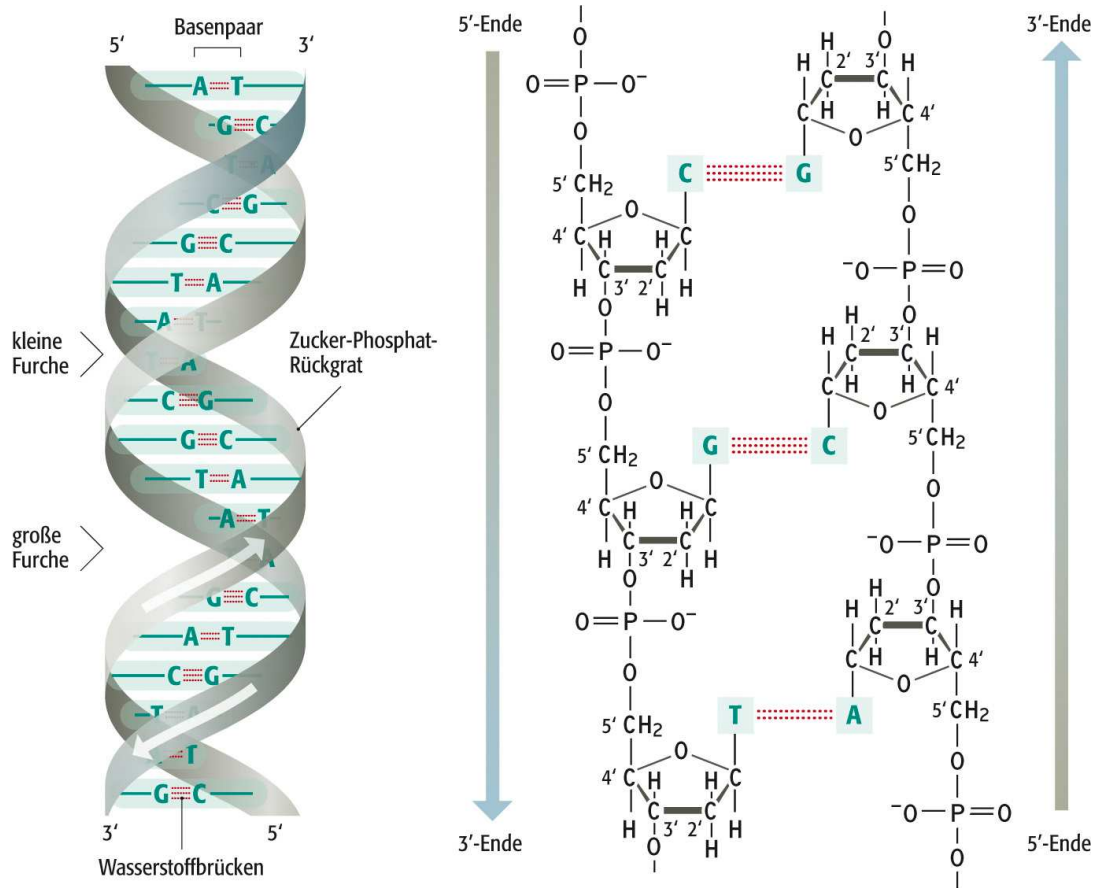


Abbildung 2.8: Ausschnittes des DNA-Moleküls. Die Erbinformation ist in Form von Basenpaaren aus Adenin und Thymin oder Guanin und Cytosin gespeichert. Diese Basenpaaren sind über kovalente Bindungen mit dem Zucker-Phosphat-Gerüst verbunden und bilden die DNA-Doppelhelix. In Abschnitt 2.2.3.1 wird dargestellt, wie dieses DNA-Molekül im Zellkern strukturiert wird (Abbildung aus [39]).

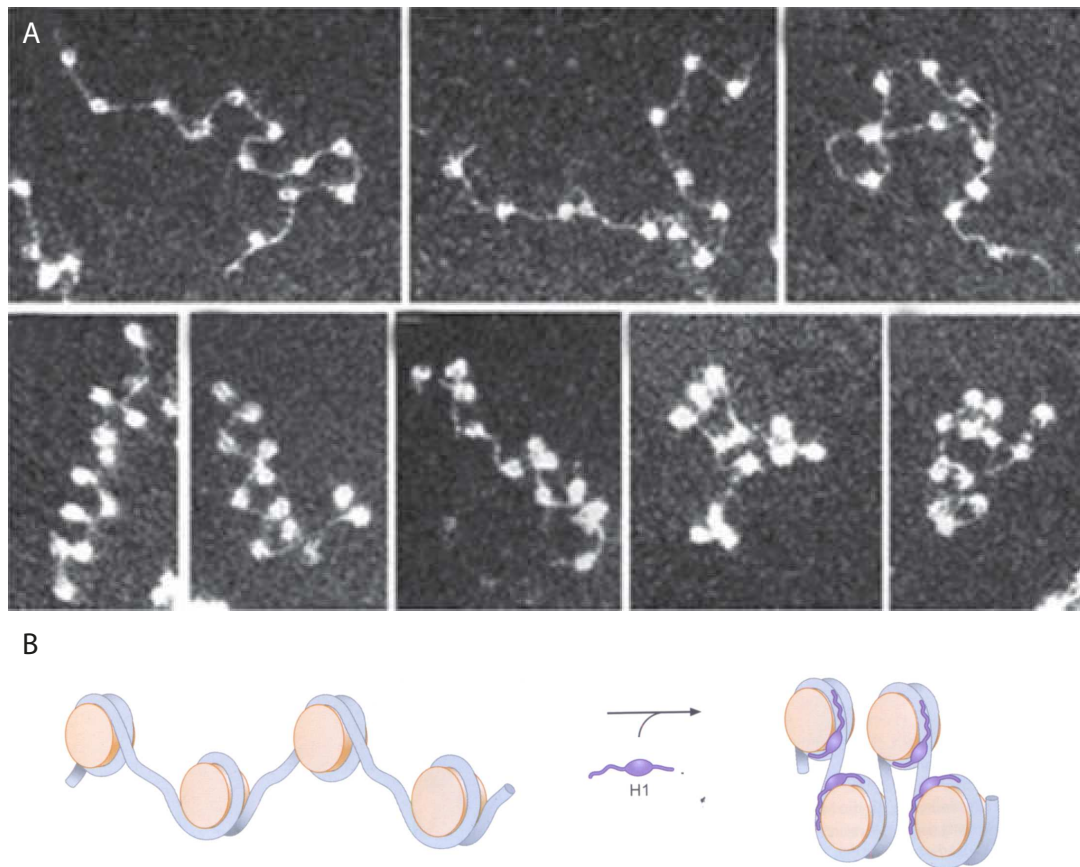


Abbildung 2.9: Darstellung des 10 nm-Filaments. A: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des in unterschiedlichen Dichten auftretenden 10 nm-Filaments. Dargestellt ist DNA, die um die Histone gewickelt ist. Siehe dazu auch Abbildung 2.10. Die unterschiedlichen Dichten des 10 nm-Filaments werden durch das Linker-Histon H1 bedingt. B zeigt schematisch die Wirkung des Histon H1 (Abbildungen aus [41] und [42]).

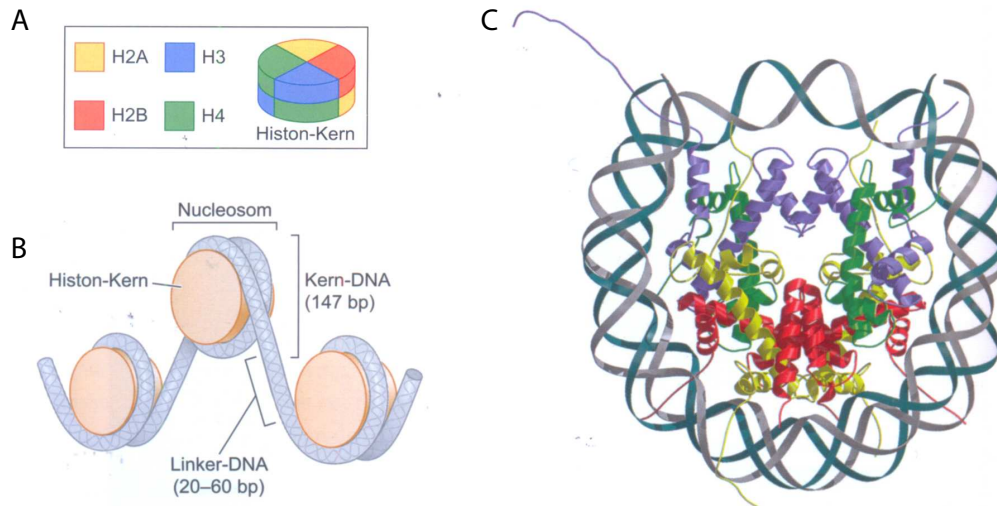


Abbildung 2.10: Nucleosom. A: Darstellung des Histons, das aus den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist. B,C: Darstellung, wie die DNA um die Histone gewickelt ist und wie viel DNA dabei gebunden wird. Das System aus Histon und DNA wird als Nucleosom bezeichnet (Abbildungen aus [42]).

Trotz Elektronenmikroskopie konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, wie die weiteren Verpackungsstufen der DNA aussehen. Angenommen wird, dass aus der Nucleosom-Kette das sogenannte 30 nm-Chromatinfilament gebildet wird [2] (Abbildung 2.11 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines solchen DNA-Stücks). In diesem Filament sind die Nucleosomen strukturierter und dichter angeordnet. Es existieren verschiedene Modelle, die die Anordnung des 30 nm-Filaments beschreiben.

Weiter wird angenommen, dass das 30 nm-Filament seinerseits gefaltet, um die großen DNA Moleküle im Zellkern unterzubringen. Dabei entsteht eine Art Schleifenanordnung (siehe Abbildung 2.12). Darüber hinaus unterliegt die Nucleosomanordnung ständiger Veränderung. Schäden beispielsweise können durch Histonvariationen markiert werden, sodass die entsprechenden Reparaturenzyme diese erkennen können. Da bestimmte Proteine nur mit histonfreier DNA wechselwirken können, muss selbst die übergangsweise Auflösung der Nucleosome in bestimmten Teilen der DNA möglich sein.

Weiterhin kann die Chromatinzugänglichkeit durch Modifikationen der Histonschwänze [45, 46] variiert werden. Histonschwänze ragen aus dem Histonoktamer hervor und können durch Anlagerung bestimmter Molekülgruppen modifiziert werden. Diese Modifikationen haben direkten Einfluss auf die Dichte der Verpackung und können darüber hinaus Ankerpunkt für weitere sich anlagernde Proteine sein. Gene, die transkribiert werden, tragen stets bestimmte Histonmodifikationen (u. a. H3 (tri methyl K4)), während andere Modifikationen (u. a. H3 (tri methyl K9)) die Transkription eindeutig hemmen [47, 48]. Die Histonschwanzmodifikationen entfalten ihre Wirkung durch die Veränderung



Abbildung 2.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines DNA-Stückes, das als 30 nm-Filament angenommen wird. Dabei handelt es sich nach dem 10 nm-Filament um die nächsthöhere Verpackungsstufe der DNA. (Abbildung aus [2]).

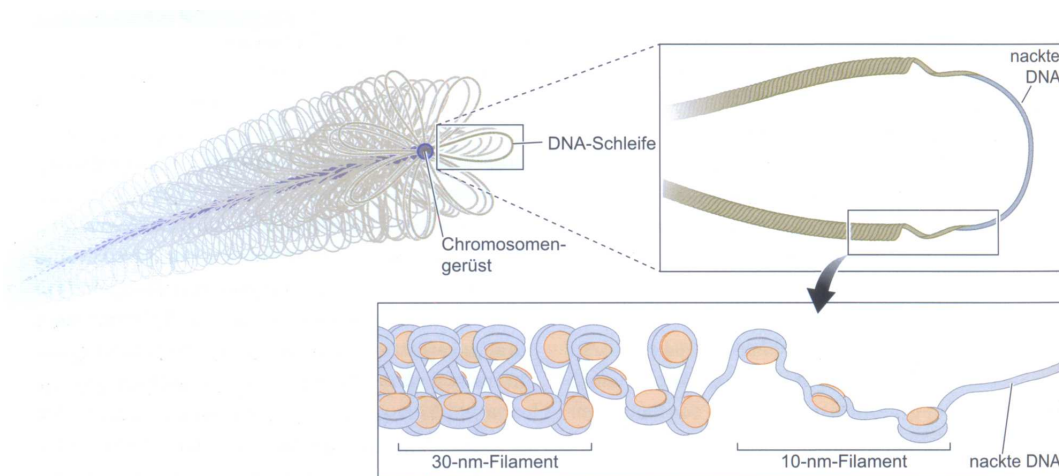


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Verpackungsstufen der DNA. (Abbildung aus [42]).

der Ladungsverteilung im Molekül und somit verändert sich auch die Affinität des Histons zur DNA. Darüber hinaus sind die Histonschwänze auch an der Bildung der 30 nm-Filamente beteiligt und somit haben Histonmodifikationen und die dadurch einhergehenden Ladungsänderungen Einfluss auf die Stabilität der 30 nm-Filamente [49]. Es ist somit leicht zu sehen, dass die Histonmodifikationen weitreichenden Einfluss auf die Genomorganisation haben [45] (siehe dazu auch Abbildung 2.13). Insgesamt scheinen Prozesse, die die Zugänglichkeit der DNA

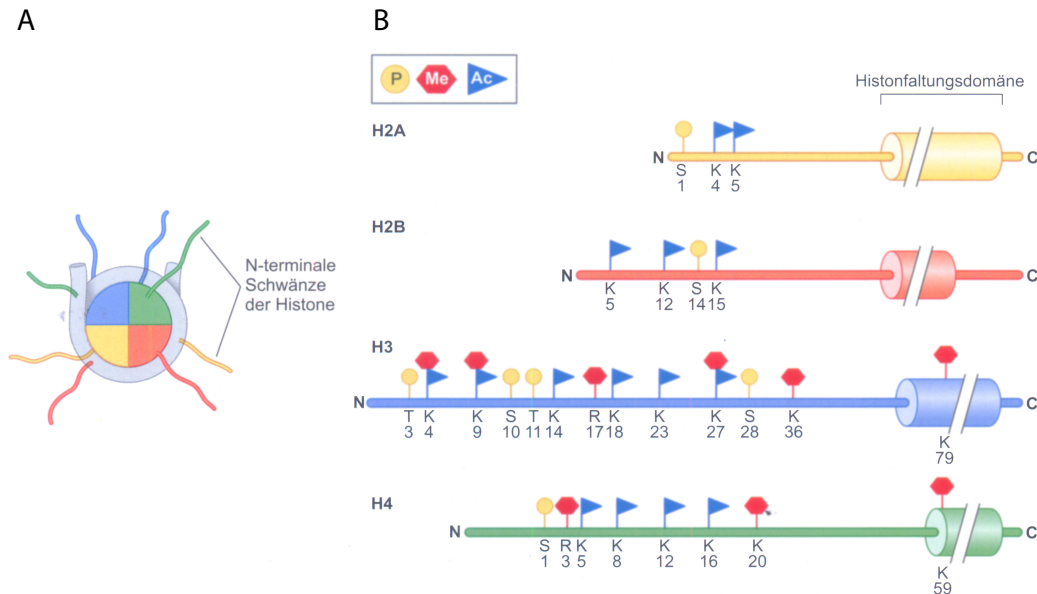


Abbildung 2.13: Histonschwanzmodifikationen. A: Jedes Histon hat an seinem N-Terminal einen sogenannten Histonschwanz, der Bindungsstellen für verschiedene Molekülgruppen hat. Über die Histonschwänze steuert die DNA in erheblichem Maße ihre Verpackungsdichte. Werden die Aminosäuren, aus denen die Histone hergestellt sind, von diesem N-Terminal an gezählt, so ergibt sich ein Koordinatensystem, mit dem die Histonmodifikationen beschrieben werden können. Z. B. ist die neunte Aminosäure des Histonschwanz 3 Lysin, welche mit K abgekürzt wird, und u. a. methyliert werden kann. In dem Koordinatensystem der Histonmodifikationen würde dies als H3 (mono methyl K9) bezeichnet werden oder alternativ H3K9me1. B zeigt die Histonschwänze mit den modifizierbaren Aminosäuren und den möglichen Modifikationen (P: phosphoryliert. Me: methyliert. Ac: acetyliert.) (Abbildung aus [42]).

steuern, zu lokal begrenzten Veränderungen der Struktur der Nucleosomen und der DNA zu führen [42, 50].

2.2.3.2 Hetero- und Euchromatin

Das Chromatin lässt sich in zwei große Gruppen einteilen: den Teil der DNA, der nur wenige Gene enthält bzw. aus anderen Gründen nur selten für die Transkri-

bierung benötigt wird und als Heterochromatin bezeichnet wird [48]. Im Heterochromatin ist die DNA maximal kondensiert und liegt als 30 nm-Filament [51] oder in höheren Verpackungsordnungen vor [52] (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Das Euchromatin hingegen ist deutlich weniger dicht gepackt (als 10 nm-DNA-Strang vorliegend [51] (siehe Abschnitt 2.2.3.1)) und genreich. Es wird somit regelmäßig für die Transkribierung benötigt [52, 53]. Teile der DNA im Euchromatin liegen daher auch histonfrei und einzelsträngig vor. Diese basale Einteilung in dicht und weniger dicht gepacktes Chromatin spielt für die funktionale Organisation [54] des Chromatins eine zentrale Rolle, z. B. für die Verhinderung der Transkription repetitiver Sequenzen und auch die Abgrenzung der einzelnen Chromosomen zueinander [55, 56].

Heterochromatin kann seinerseits nochmals in konstitutives und fakultatives Heterochromatin eingeteilt werden. Konstitutives Heterochromatin besteht vor allem aus repetitiven Sequenzen, deren Transkribierung für die Zelle unnötig ist bzw. deren Transkribierung der Zelle sogar schaden kann [57]. Durch einen hohen Verpackungsgrad wird die Erreichbarkeit dieser Chromatinbereiche verhindert [48]. Wenn bestimmtes Chromatin nur übergangsweise nicht benötigt wird, so wird es als fakultatives Heterochromatin bezeichnet. Dies kommt z.B. vor, wenn bestimmte Gene bei einem bestimmten Zelltyp nicht benötigt werden [48].

Darüber hinaus unterliegt die Verpackung der DNA ständigen Wandlungen und Umstrukturierungen um die Anforderungen der Zelle zu erfüllen, was über den gezielten Einsatz von regulatorischen Proteinen ermöglicht wird [58]. Euchromatin und Heterochromatin können prinzipiell ineinander überführt werden, wenn dies für bestimmte Vorgänge in der Zelle notwendig ist. Insgesamt muss auch das dicht gepackte Heterochromatin als ein dynamisches System angesehen werden, dessen Charakterisierung weit über die Einteilung in aktives und inaktives Chromatin hinausgeht [54, 59].

In heterochromatischen Teilen werden immer bestimmte Histonmodifikationen (siehe Abschnitt 2.2.3.1) gefunden. Ein häufig benutzter Indikator für Heterochromatin ist die Histonmodifikation H3 (tri methyl K9) [48, 60, 61]. Dies besagt, dass der Histonschwanz des Histon 3 (H3) am neunten Lysin (K9) ab dem N-Terminus des Histons dreifach methyliert (tri methyl) ist (siehe dazu auch Abbildung 2.13). Bereiche von konstitutivem Heterochromatin tragen stets die Histonmodifikation H3 (tri methyl K9), wobei sie auch in fakultativem Heterochromatin angetroffen werden kann [48, 62]. Eine Immunfärbung (siehe Abschnitt 3.1.4) dieser Histonmodifikation wird im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Heterochromatin mit Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, da diese Histonschwanzmodifikationen als spezifisch für Heterochromatin gilt [63]. Histonmodifikationen sind häufig Ankerpunkte für bestimmte Proteine, die das Chromatin und dessen Dichte modifizieren bzw. ihrerseits wiederum Ankerpunkte für weitere Proteinen sind, die diese Aufgaben übernehmen. Methylierungen am neunten Lysin des Histon 3 spielt dabei die zentrale Rolle als Ankerpunkt für die Bildung von Heterochromatin [58].

2.2.3.3 Chromosomenterritorien

Chromosomenterritorien wurden vor ca. 130 Jahren in der Wissenschaft erstmals erwähnt [64]. Seitdem wurde ihre Existenz immer wieder kritisch hinterfragt besonders als die ersten Elektronenmikroskopieexperimente (um 1950) sie nicht bestätigen konnten [65]. Lasermikrobestrahlungsexperimente (um 1970) haben dann erneut für distinkte Chromosomenterritorien gesprochen [65] und endgültig bestätigt werden konnten sie schließlich durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Experimente (um 1980) [66]. Mit Hilfe von FISH, hochauflösender Mikroskopie und Methoden wie Hi-C [67] konnte herausgefunden werden, dass die einzelnen Chromosomenterritorien ihrerseits wieder in transkriptiv aktive und inaktive Bereiche eingeteilt werden können. Bekannt ist, dass genreiche Regionen gleichmäßig über die einzelnen Chromosomenterritorien verteilt sind, wobei ein zu transkribierendes Gen an den Rand des Chromosomenterritoriums bewegt wird. Die Zugänglichkeit einzelner Gene wird demnach durch seine Position innerhalb des Kerns und des Chromosomenterritoriums gesteuert [68, 69]. Der Einfluss der Histonschwanzmodifikationen und die Rollen zahlreicher Proteine für die Architektur der Chromosomenterritorien sind mittlerweile bekannt [6]. Trotzdem bleiben diese Fragen und z.B. wie die Dynamik der Chromatindichte reguliert wird, was die Architektur der Territorien bedingt und wie die Interaktion zwischen den Chromosomenterritorien funktioniert zentrale Themen gegenwärtiger Forschung [6, 65, 70, 71]. Besonders die Frage wie die Organisationsebenen der unterschiedlichen Größenordnungen im Zellkern zusammenwirken, ist noch völlig unbeantwortet [6].

2.2.4 Schäden der DNA

Ionisierende Strahlung verursacht Schäden an der DNA, darunter auch Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche (DSB) [72]. Diese sind die Schäden mit der größtmöglichen Lethalität für die Zelle [51]. Im Prinzip kann ein einziger unreparierter DSB schon zum Tod der Zelle führen. Zellen verfügen daher über verschiedene Methoden einen DSB zu reparieren [42]. Besonders interessant ist die Frage, welche Chromatinstrukturänderungen ein DSB auslösen kann [73].

Die Ursache eines DSBs hat erheblichen Einfluss auf seine Struktur. Ein durch ein DNA-schneidendes Enzym ausgelöster DSB hat saubere Schnittkanten wohingegen ein durch Strahlung ausgelöster DSB ggf. freiliegende einzelsträngige DNA hat. In Abhängigkeit der Art der Strahlung und ihrer Stärke können in der Nähe der DSB Einzelstrangbrüche, Schäden an einzelnen Basen oder weitere DSB auftreten [72], sodass ein Schadenskomplex entsteht, der sich auf die Möglichkeit der Reparatur auswirken kann. Eukaryontische Zellen verfügen über vier Reparaturwege für DSB, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Die Schäden werden entweder durch die Homologe Rekombination (HR) fehlerfrei repariert oder unter Inkaufnahme von Fehler in der Sequenz durch nicht-homologes Endjoining (NHEJ), alternatives Endjoining (alt-EJ) oder Single Strand Annealing (SSA) repariert.

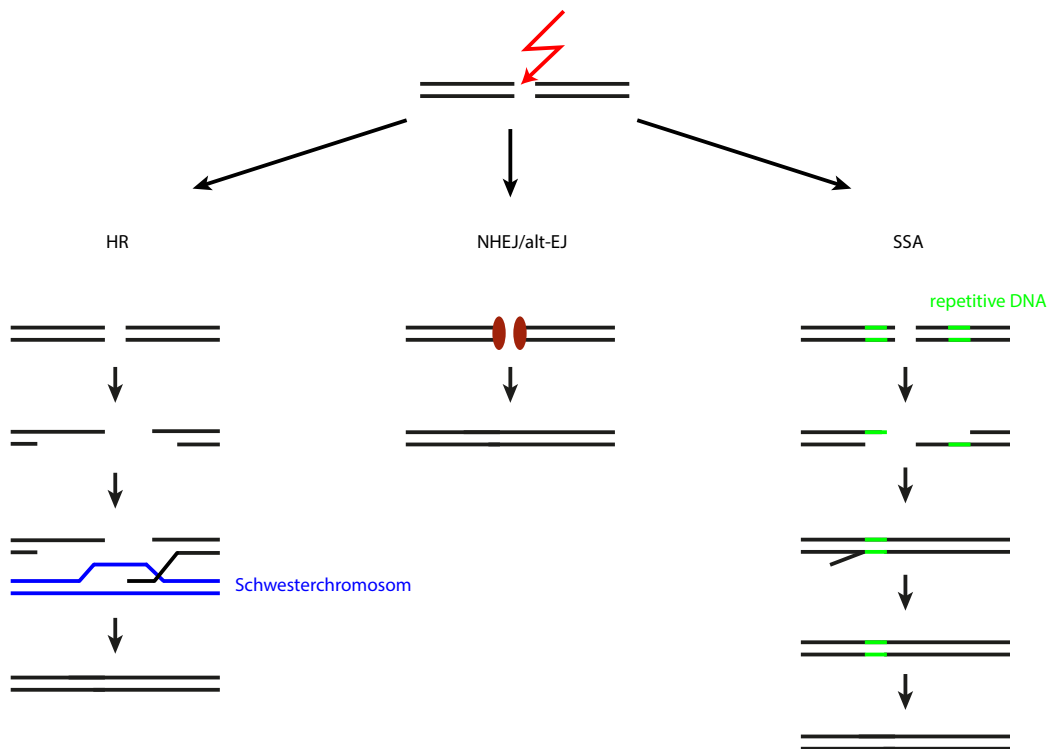


Abbildung 2.14: Mögliche Reparaturen von DNA-Doppelstrangbrüchen. HR: Schematisch dargestellt, wie nach einem DSB die Bruchenden vorbereitet werden und anschließend unter Zuhilfenahme der Chromosomkopie der Doppelstrangbruch fehlerfrei repariert wird. NHEJ/alt-EJ: An den Bruchstellen werden ggf. Basenpaare entfernt und anschließend werden die Bruchenden zusammengefügt. Beim NHEJ werden dabei wenige oder gar keine Basenpaare entfernt. Das alt-EJ hingegen führt meist zu größeren Sequenzfehlern. SSA: Wenn der DSB sich zwischen zwei repetitiven Sequenzen befindet, dann kann der Bruch unter Löschung des DNA-Abschnittes zwischen diesen repetitiven Sequenzen und eines repetitiven Elements wieder zusammengefügt werden.

Die HR ist fehlerfrei, da das Schwesterchromosom verwendet wird, um verlorengegangene Sequenzinformationen zu rekonstruieren. Aus diesem Grund ist dieser Reparaturweg hauptsächlich in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus (siehe dazu Abschnitt 2.2.2) möglich. Die HR ist verglichen mit den anderen drei Reparaturwegen ein aufwendiger und dementsprechend langsam ablaufender Prozess. In Abbildung 2.14 werden die unterschiedlichen Reparaturvorgänge schematisch dargestellt. Im Gegensatz dazu gehen bei den anderen drei genannten Methoden Sequenzinformationen verloren. Beim NHEJ vergleicht die Zelle zunächst die Überhänge der Einzelstränge, um so zu einer akkuraten Reparatur zu kommen. Falls so keine Reparatur möglich ist, werden ggf. Basen entfernt und der DSB wieder verbunden. Dieses Verfahren kann offensichtlich zu Fehlern in der Sequenz führen. Allerdings ist es ein sehr schnelles Reparaturverfahren. Darüber

hinaus kann die Zelle auf ein weiteres fehlerbehaftetes Verknüpfungsverfahren zurückgreifen. Das alt-EJ ist ein Ausweichverfahren, wenn HR und NHEJ z.B. aufgrund einer zu großen Zahl von Schäden versagen, und führt meist zu größeren Sequenzfehlern. Beim SSA können einige hundert Basenpaare verlorengehen und damit ganze DNA-Segmente. Der DSB muss dazu zwischen zwei repetitiven Sequenzen liegen. Die Sequenzinformation zwischen diesen beiden repetitiven Sequenzen wird dabei gelöscht. Bei der Reparatur von DSB besteht neben der Gefahr von Sequenzfehlern auch das Risiko von Translokationen, besonders wenn die Zahl der Schäden in einem kleinen Bereich groß ist. Es ist nicht genau erforscht, welche Bedingungen herrschen müssen, damit ein bestimmtes Verfahren verwendet wird. Die Komplexität des DSBs, die Position im Chromatin und der Zellzyklus haben einen bisher noch nicht verstandenen Einfluss auf die Auswahl des Reparaturweges [74].

Einen besonderen Einfluss auf die Reparatur hat der Verpackungsgrad der DNA. Dabei ist besonders der Fall des dichtgepackten Heterochromatins interessant (siehe Abschnitt 2.2.3.2), da die DNA für die Reparatur histonfrei vorliegen muss und außerdem für die Reparaturproteine zugänglich sein muss [51, 73, 75]. Es konnte gezeigt werden, dass Doppelstrangbrüche im Heterochromatin am Rand des heterochromatischen Chromatinbereichs repariert werden [76, 77]. Es sind demnach Umstrukturierungen innerhalb der heterochromatischen Bereiche nötig, um den Schaden für die Reparatur zugänglich zu machen.

An den verschiedenen Reparaturwegen sind zahlreiche Proteine beteiligt, allerdings ist für die Aktivierung stets die Phosphorylierung des Histons H2AX zu γ H2AX notwendig. Um DSB bilden sich sogenannten γ H2AX-Reparaturzentren (auch als γ H2AX-Foci bezeichnet, da sich dort dichte Ansammlungen von γ H2AX bilden) [78]. γ H2AX scheint die notwendige DNA-Änderung auszulösen, sodass es zur Anlagerung der Reparaturproteine kommen kann [73, 79]. Auch wenn die genaue Struktur des Nukleosoms (siehe Abschnitt 2.2.3.1), wenn es γ H2AX enthält, noch unbekannt ist, so scheint es für eine Verringerung der Dichte des umgebenden Chromatins zu sorgen, allerdings könnte auch der Bruch der DNA selbst schon für eine gewisse Relaxierung sorgen [73]. Bekannt ist außerdem, dass es nach Bildung eines DSB zu einer Chromatinrelaxierung kommt, die unabhängig von γ H2AX ist [54]. In der Nähe von durch Strahlung ausgelösten DSB finden wir ebenso stets Histonmodifikationen (siehe Abschnitt 2.2.3.1), die für die Relaxierung des Chromatins sorgen [75]. Die Fluoreszenzmarkierung von γ H2AX, um diese Foci sichtbar zu machen, ist ein gängiges und durch die erhöhte γ H2AX-Dichte praktikables Verfahren. Die Anzahl der auftretenden Foci korreliert zu der Anzahl von DSB [80].

2.2.5 Alu-Sequenz

Alu-Sequenzen sind eine Gruppe repetitiver DNA-Sequenzen, die in Genomen von Primaten auftauchen [81]. (Die Sequenz wurde 1978 von Catherine M. Houck im Menschen entdeckt [82] und ist ca. 300 bp lang. Benannt wurde die Alu-Sequenz

nach dem Restriktionsenzym AluI (aus *Arthrobacter luteus*), weil es diesen Abschnitt in zwei Teile auftrennt. Es entsteht ein 170 bp- und ein 130 bp-Element.) Sie gehören zu kurzen verteilten Nukleotidelementen (SINE, engl. Short Interspersed Nucleotide Elements). Alu-Sequenzen machen ca. 10 % des menschlichen Genoms aus [83]. Es existiert eine sogenannte Alu-Konsensus-Sequenz [83] und alle Sequenzen, die dieser ähnlich sind, gelten als zur Alu-Sequenz-Familie zugehörig. Eine genaue Definition dieser Ähnlichkeit existiert nicht, da verschiedene Alu-Sub-Familien existieren, die sich während der Evolution geändert haben und teilweise deutliche Unterschiede zur Konsensus-Sequenz aufweisen [84, 85]. Die Alu-Sequenzen scheinen das Genom in vielerlei Weise zu beeinflussen, u. a. durch Mutation, Rekombination, Genkonversion und Änderung der Expression, obwohl ihre genaue biologische Funktion nicht bekannt ist [81, 84, 86, 87, 88, 89, 90]. Sie spielen auch eine mögliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms und bei Reparaturprozessen [54]. Ihre Transkribierung scheint durch Zellstress (wie z. B. Hitze) beeinflussbar zu sein [79]. Bekannt ist, dass Alu-Sequenzen mit genreichen Regionen assoziiert sind [90, 91]. Im Besonderen schließen sich die Histon-Modifikation H3 (tri methyl K9) (siehe Abschnitt 2.2.3.1 und 2.2.3.2) und Alu-Sequenzen nahezu aus, während Alu-Sequenzen in Bereichen mit für Euchromatin typischen Histonmodifikationen (H3 (tri methyl K36), H3 (tri methyl K4), H3 (di methyl K4), H3 (mono methyl K27)) vermehrt auftauchen [90].

Die meiste Forschung zu Alu-Sequenzen fokussiert sich auf die Analyse der Position der Alu-Sequenzen in der DNA-Basensequenz, allerdings ist es ebenso notwendig die Verteilung und Struktur von Alu-Sequenzen im Zellkern zu untersuchen, um ihre Rolle für die Struktur des Chromatins zu verstehen. Bestimmte Regelmäßigkeiten innerhalb der Basenfolge, die mit Alu-Sequenzen assoziiert sind, sprechen für eine Art Strukturierung des Genoms durch Alu-Sequenzen [92]. Auch Experimente deuten auf eine Rolle der Alu-Sequenzen bei der Strukturierung des Chromatins hin [93]. Alu-Sequenzen scheinen über das ganze Genom verteilt zu sein und eine Art Netzwerk zu formen, wie z. B. auch das Heterochromatin.

Um dieses Netzwerk und die chromatinstrukturierende Wirkung zu analysieren, sind moderne hochauflösende Mikroskopiemethoden, wie die Lokalisationsmikroskopie notwendig (siehe Abschnitt 2.1.5).

3.1 Präparationsmethoden

3.1.1 Zellkultur und Bestrahlung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war es notwendig, lebende Zellen in Zellkultur zu halten und diese zu bestrahlen. Da der Gegenstand dieser Arbeit die Analyse der Genomstruktur ist, waren Zellen notwendig, die über einen Zellkern verfügen. Außerdem sollten die Zellen an medizinischen Bestrahlungsquellen bestrahlt werden und mussten dazu im lebenden Zustand transportiert werden, daher sollten sie möglichst wenig auf äußere Einflüsse reagieren. Zur Zellzyklussynchronisation sollten die Zellen den Zellzyklus schnell durchlaufen. Diese Bedingungen wurden durch zwei Zelllinien, die bereits in der Arbeitsgruppe in Verwendung waren, erfüllt. Die verwendeten Zelllinien und die entsprechenden verwendeten Zellkulturmedien sind untenstehend aufgelistet.

SKBR3

- McCoy's 5A (Modified) Medium, GlutaMAX Supplement¹
- + 100 g/L Penicillin-Streptomycin
- + 10 % Fetales Kälberserum

HeLa H2B-GFP

- RPMI 1640 Medium²
- + 100 g/L Penicillin-Streptomycin

¹Thermo Fisher Scientific Inc.

²Thermo Fisher Scientific Inc.

- + 2 nmol/L L-Glutamine
- + 10 % Fetales Kälberserum

Die Zelllinie SKBR3 ist aus menschlichem Brustkrebs gewonnene und kann kommerziell erworben werden³. Weitere Informationen zur Zelllinie SKBR3 finden sich im Anhang D.1 dieser Arbeit. Die Zellen der HeLa H2B-GFP-Zelllinie produzieren mit dem H2B-Protein (siehe Abschnitt 2.2.3.1) das Fluorophor „Grün fluoreszierendes Protein“ (GFP, engl. green fluorescent protein). Somit können die Zellen ohne weitere Fluoreszenzmarkierung direkt lokalisationsmikroskopisch analysiert werden und Probleme der Fluoreszenzmarkierung können ausgeschlossen werden. Die Zelllinie wird unter [94] beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen in der Zellphase G2 (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2) synchronisiert. Dies kann durch die Inhibition des Enzyms Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1, engl. Cyclin-dependent kinase 1) [95, 96] erreicht werden. CDK1 sorgt für den Übergang von der G2-Phase in die M-Phase [97, 98]. Zur Zellzyklussynchronisation wurde dem obenstehenden Zellkulturmedium ein reversibler CDK1-Inhibitor hinzugefügt, der eine Synchronisationsrate von ca. 95 % erreicht [95]. Spätestens 30 min nach Entfernung des CDK1-Inhibitors können die Zellen den Zellzyklus fortsetzen [95]. Als reversibler CDK1-Inhibitor wurde (5Z)-5-(6-Quinolinylmethylene)-2-[(2-thienylmethyl)amino]-4(5H)-thiazolone (Produktname RO 3306⁴) verwendet, das bei einer Konzentration von 28.5 mmol L⁻¹ in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde. Die Konzentration im Zellkulturmedium betrug 10 µmol L⁻¹.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen und Multiwell-Platten in einem Brutschrank (Temperatur: 37 °C, CO₂-Anteil: 5 %) inkubiert und wachsen in diesen Behältern auf Oberflächen fest. Mit Hilfe des untenstehenden Protokolls können sie von diesen abgelöst und dann in entsprechenden Zellkulturmedien auf andere Unterlagen aufgebracht werden, um dort wieder anzuwachsen und sich zu teilen.

Materialien

- Trypsin-EDTA (0.05 %) (37 °C)
- Deckgläser
- 6well Platten
- Zellkulturmedium (37 °C)

Durchführung

1. Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche entfernen
2. 0.5 ml Trypsin pro 25 cm² bewachsene Fläche in die Zellkulturflasche geben
3. 5 min inkubieren

³American Type Culture Collection (ATCC)

⁴Abcam plc.

4. 10 ml Zellkulturmedium hinzufügen
5. Die abgelösten und sich in Zellkulturmedium befindlichen Zellen können nun in entsprechender Menge in neue Zellkulturflaschen oder auf Deckgläser und Objektträger aufgebracht werden.

Für die Vorbereitung der Mikroskoppräparate mussten die Zellen (gemäß obenstehendem Protokoll) auf Deckgläsern oder Objektträgern (zum Aufbau eines Mikroskoppräparats siehe Abbildung 3.4) wachsen und dort eine bestimmte Dichte erreichen, damit sie für die Mikroskopie nutzbar sind. Dazu werden ca. 20 000 Zellen auf ein Deckglas aufgebracht. Die Zellen beider Zelllinien verdoppeln sich ca. nach 24 h und erreichen nach zwei Tagen die nötige Dichte auf dem Objektträger.

Bestrahlt wurden die Zellen mit 6 MeV-Photonen (Dosisleistung 3 Gy/min) an einem medizinischen Linearbeschleuniger (ARTISTE LB3⁵). Eine Übersicht der durchgeführten Bestrahlungsexperimente befindet sich in Abschnitt 7.2.2.

3.1.2 Fixierung

Für die Bearbeitung und Mikroskopierung müssen die lebenden Zellen einem Prozess unterzogen werden, der sich Fixierung nennt. Dabei werden die Zellen abgetötet und gleichzeitig ihre 3D-Struktur erhalten. Zu diesem Zweck wurde hier Formaldehydlösung verwendet, die Proteine durch Methylenbrücken und Schiff'sche Basen vernetzt.

Materialien

- 1xPBS + Mg/Ca (37 °C)
 - Natriumchlorid (NaCl): 155.172 mmol/L
 - Kaliumdihydrogenphosphat(KH₂PO₄): 1.059 mmol/L
 - Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄): 2.966 mmol/L
 - Magnesiumchlorid (MgCl₂): 0.901 mmol/L
 - Calciumchlorid (CaCl₂): 0.493 mmol/L
- Formaldehyd-Lösung (4 % in 1xPBS + Mg/Ca) (37 °C)
- Deckgläser (bewachsen mit Zellen)
- Wärmebad (37 °C)
- Rüttler (ermöglicht durch gleichmäßige Bewegung der Proben das Auswaschen von Reagenzien)

⁵Siemens AG, Medical Solutions

Durchführung

1. Zellkulturmedium entfernen
2. 1x in 37 °C 1xPBS+Mg/Ca spülen
3. in 4% Formaldehyd in 1xPBS+Mg/Ca für 10 min bei (37 °C) fixieren
4. 3x 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen

3.1.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, um Chromosome und einzelne Genregionen sichtbar zu machen [99]. Dazu werden DNA-Stücke mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die anschließend an dem komplementären Stück DNA innerhalb der Zelle binden. Erste Versuche mit dieser Technik wurden bereits vor 30 Jahren durchgeführt [100] und seitdem ist diese Technik stetig weiter entwickelt worden. Optimierungen der Präparationsprotokolle, kürzere Sonden usw. [101] haben die FISH zu einem sehr vielseitig einsetzbaren Werkzeug gemacht.

Hier wird eine durch Hausmann et al. [102] entwickelte Optimierung der FISH verwendet [103]. Die Combinatorial Oligo Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Combo-FISH) setzt besonders kurze Sonden ein (ein Review zur Technik mit einer Vielzahl von Anwendungen findet sich in [104]). Die für FISH verwendeten Sonden sind in der Regel mehrere tausend Basenpaare lang und machen bereits dadurch eine exakte Positionsbestimmung unmöglich [105, 106]. Combo-FISH-Sonden hingegen sind ca. 20 bp lang und ermöglichen in Kombination mit Lokalisationsmikroskopie exakte Lokalisation der gewünschten DNA-Sequenz. Die hier verwendete Alu-Sonde wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Aaron Sievers im Jahr 2014 entwickelt. Wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, existiert eine Alu-Consensus-Sequenz, die ca. 300 bp lang ist:

```
GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGG
CGGGCGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTG
AAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCGGGGCGTGGTGGCGCGC
GCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCC
GGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGG
GCGACAGAGCGGAGACTCCGTCTC
```

Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Alu-Elemente in ihrer Basenfolge. Damit die Sonde bindet, muss sie exakt zur Zielbasensequenz passen. Außerdem müssen Combo-FISH-Sonden eine Länge von ca. 20 bp haben. Per Computersuche wurde eine Sonde gefunden, die ca. 400 000 Bindungsstellen in verschiedenen Alu-Regionen hat und 17 bp lang ist. Abbildung 3.2 zeigt schematisch die Verteilung der untenstehenden Basenfolge der Alu-Sonde auf den menschlichen Chromosomen.

```
TAATCCCAGCACTTTGG
```

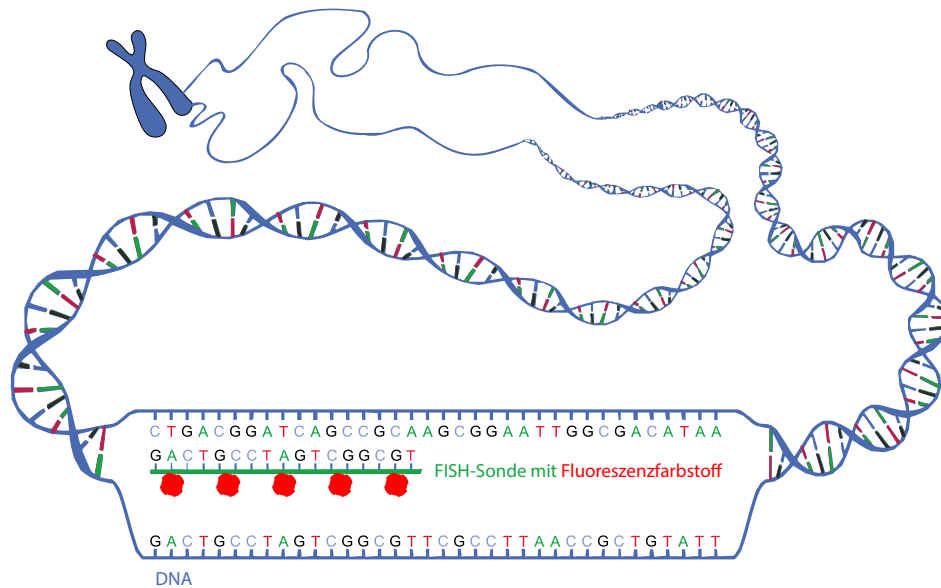


Abbildung 3.1: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die passende FISH-Sonde kann an die Einzelsträngige DNA binden, sie somit mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren und für die Mikroskopie sichtbar machen.

Es wurde außerdem überprüft, ob es zu Falschbindungen kommt, d. h. ob die Sonde an Stellen im Genom bindet, wo sich kein Alu-Element befindet. Nach erfolgter Prüfung wurde die Sonde gemäß den Vorgaben kommerziell⁶ hergestellt und dabei mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende ausgestattet.

Die bisher verwendeten Markierungsverfahren für Combo-FISH enthielten Präparationsschritte, die, z. B. durch hohe Temperatur, erheblichen Einfluss auf die Genomarchitektur hatten. Da hier die Genomarchitektur lokalisationsmikroskopisch analysiert werden sollte, sollten solche Präparationschritte so weit wie möglich reduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein für die Alu-Sonde optimiertes Protokoll entwickelt werden, das in Abschnitt 4.2 vorgestellt wird.

3.1.4 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzmarkierungen sind etablierte Standardverfahren [107], bei denen Antikörper eingesetzt werden, um bestimmte Bindungsstellen zu markieren. Die Antikörper können in zahlreichen Varianten kommerziell erworben werden, z. B. für Reparaturproteine (wie das in Abschnitt 2.2.4 beschriebene γ H2AX) oder Histonschwanzmodifikationen (wie etwa H3 (tri methyl K9)), siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3.2). In der Regel bindet ein primärer Antikörper an der zu untersuchenden Bindungsstelle und ein sekundärer Antikörper,

⁶IBA Lifesciences

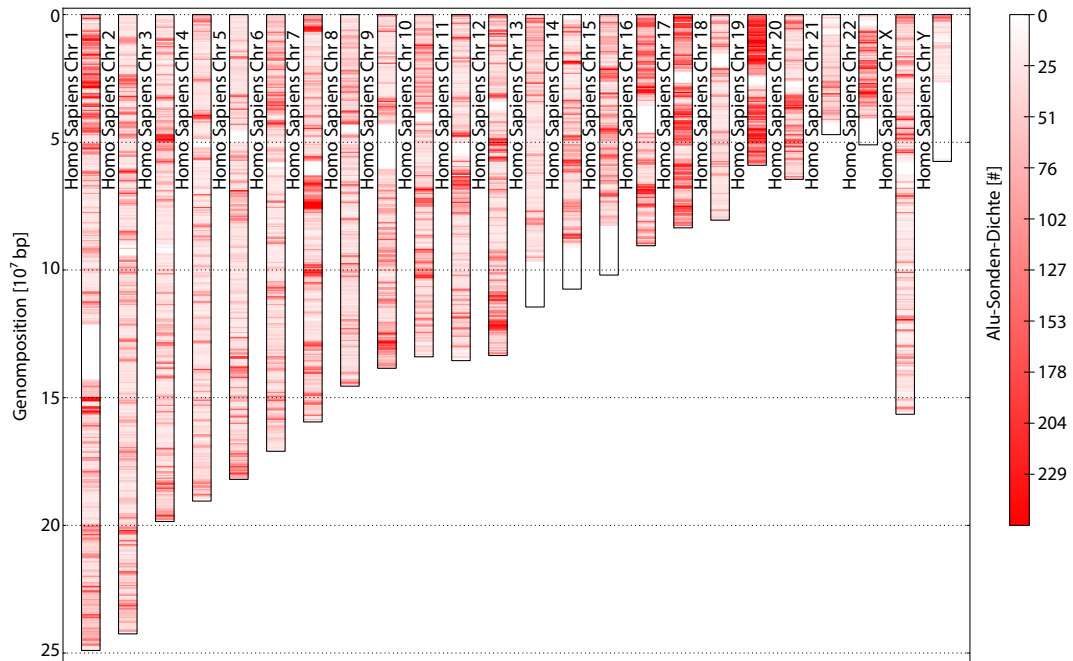


Abbildung 3.2: Bindungsstellen der Alu-Sonde. Die zu der Alu-Sonde gehörige Sequenz taucht im ganzen Genom in verschiedenen Dichten auf. Diese Verteilung wird für die einzelnen Chromosomen dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung von Aaron Sievers).

der den Fluoreszenzfarbstoff trägt, an dem primären Antikörper (siehe Abbildung 3.3). Ein für die lokalisationsmikroskopische Untersuchung optimiertes Immunofluoreszenz-Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und findet sich in Abschnitt 4.1.

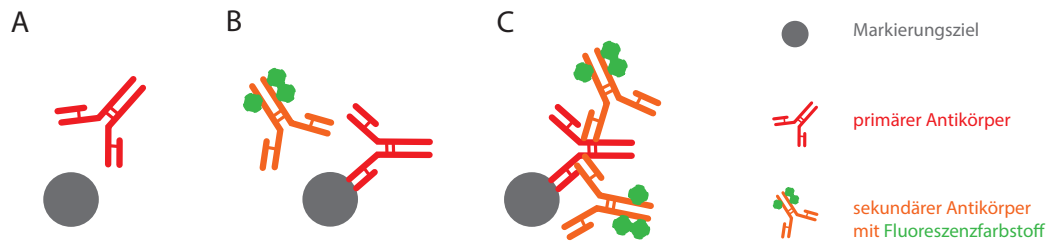


Abbildung 3.3: Immunofluoreszenz. A: Der Probe wurde der primäre Antikörper zugegeben, aber dieser ist noch ungebunden. B: Nach Bindung des primären Antikörpers wird der Probe der sekundäre Antikörper hinzugegeben. C: Der sekundäre Antikörper hat an dem primären Antikörper gebunden. Das gesuchte Markierungsziel kann somit per Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

3.1.5 Gegenfärbung und Einbettung

Nach Durchführung der in den obenstehenden Protokollen beschriebenen Markierungen müssen die Deckgläser, auf denen sich die Zellen befinden, noch mit Hilfe eines sogenannten Einbettmediums auf einen Objektträger aufgebracht werden (siehe dazu auch Abbildung 3.4). Das Einbettmedium erfüllt dabei mehrere Aufgaben. Es dient als Füllmaterial zwischen Objektträger und Deckglas und sorgt für eine möglichst ebene Auflage. Außerdem sind die chemischen Bedingungen im Einbettmedium für Fluoreszenz optimiert und verhindern, dass die Fluorophore in einen Dunkelzustand übergehen und nicht mehr anregbar sind.

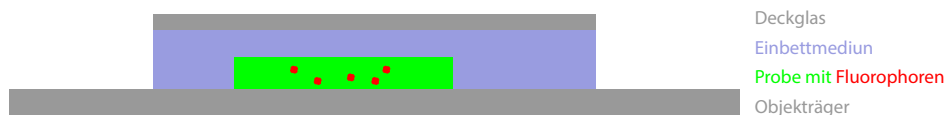


Abbildung 3.4: Objektträgeraufbau. Darstellung eines Objektträgers für die Fluoreszenzmikroskopie. Bei diesem Beispiel befinden sich die Zellen auf dem Objektträger. Durch das Einbettmedium und das Deckglas wird die Probe für ein Mikroskop mit einem Ölimmersionsobjektiv vorbereitet. Die Dicke des Deckglases muss auf das entsprechende Objektiv angepasst werden. Hier wurden Deckgläser der Dicke 0.16 bis 0.19 mm verwendet.

Neben der Einbettung wird stets auch eine sogenannte Gegenfärbung durchgeführt. Meist wird dazu eine 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Färbung verwendet. Dieses Färbemittel reichert sich bevorzugt in AT-reiche Regionen der

DNA an [108]. Es ist ein gängiges Standardverfahren [109] und ermöglicht z. B., die Grenzen des Zellkerns genau zu bestimmen. Abschließend wird der Bereich zwischen Deckglas und Objektträger noch mit Nagellack versiegelt. Folgende Präparationsschritte sind für eine DAPI-Färbung und Einbettung notwendig:

Materialien

- 1xPBS + Mg/Ca
 - Natriumchlorid (NaCl): 155.172 mmol/L
 - Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄): 1.059 mmol/L
 - Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄): 2.966 mmol/L
 - Magnesiumchlorid (MgCl₂): 0.901 mmol/L
 - Calciumchlorid (CaCl₂): 0.493 mmol/L
- DAPI-Lösung (100 ng/mL in 1xPBS)
- Objektträger
- ProlongGold (Einbettmedium)
- Deckgläser mit fixierten Zellen
- Parafilm⁷ (dehbare Verschlussfolie, aus Paraffin-Wachs und Polyethylen)
- Nagellack
- Rüttler (ermöglicht durch gleichmäßige Bewegung der Proben das Auswaschen von Reagenzien)

Durchführung

1. je Deckglas 100 µL DAPI-Lösung auf aufgespannten Parafilm auftropfen und Deckgläser auflegen
2. 5 min bei Dunkelheit inkubieren
3. 2x 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen
4. 15 µL ProlongGold auf Objektträger tropfen, das Deckglas blasenfrei auflegen
5. Deckglas mit Nagellack versiegeln
6. Vor der lokalisationsmikroskopischen Analyse das Präparat mindestens 12 h bei 4 °C dunkel lagern, da in diesem Zeitraum das ProLong-Gold ein Polymer bildet. Wird diese Wartezeit nicht eingehalten, kann es zu Artefakten kommen.
7. Bei 4 °C dunkel lagern

⁷Pechiney Plastic Packaging

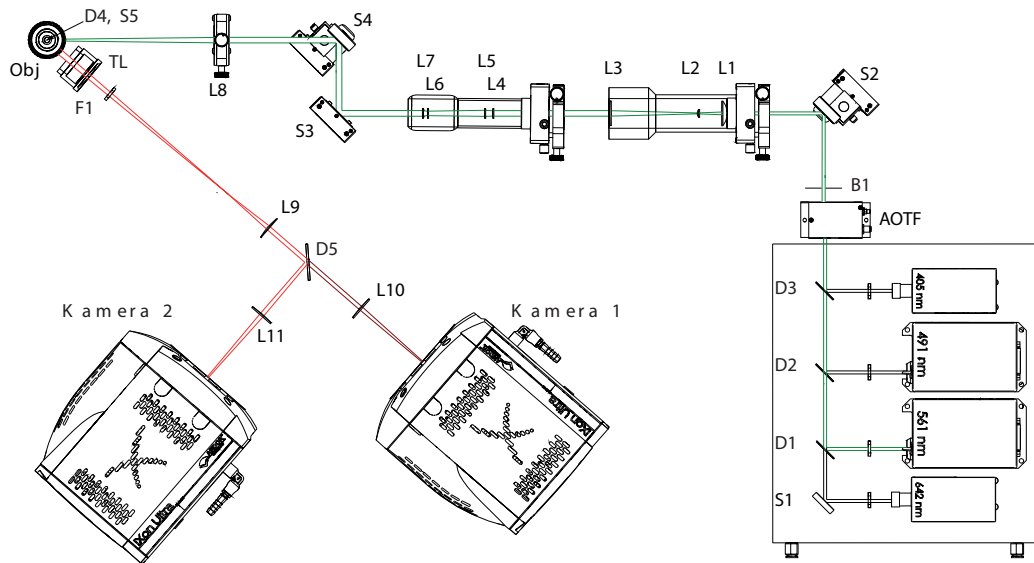


Abbildung 3.5: Aufbau des verwendeten Lokalisationsmikroskops. Schematisch dargestellt ist der Anregungsstrahlengang in Grün und der Detektionsstrahlengang in Rot. S: Spiegel, D: Dichroitische Spiegel, L: Linsen, TL: Tubuslinse, AOTF: akustooptischer abstimmbarer Filter (engl. Acousto-Optical Tunable Filter), Obj: Objektiv. (Mit freundlicher Genehmigung von Wladimir Schauffer).

3.2 Mikroskopie

3.2.1 Mikroskopaufbau

Das verwendete Lokalisationsmikroskop wird von der Light Microscopy Facility des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg betrieben. Abbildung 3.5 zeigt den schematischen Aufbau. Es stehen vier Laser mit den Wellenlängen 405 nm (120 mW), 491 nm (200 mW), 561 nm (200 mW) und 642 nm (140 mW) zur Verfügung.

Der Spiegel S1 (mit für die entsprechende Wellenlänge geeigneter Beschichtung) und die dichroitischen Spiegel D1, D2 und D3 bringen die vier Laser auf eine gemeinsame optische Achse. Dichroitische Spiegel haben für Licht unterschiedlicher Wellenlänge unterschiedliche Transmissions- und Reflexionseigenschaften.

Zur Auswahl der Laserwellenlänge und Einstellung der Intensität wird ein akustooptischer abstimmbarer Filter (AOTF, engl. Acousto-Optical Tunable Filter) verwendet. Da dieser im Gegensatz zu verstellbaren Filtern keiner mechanischen Bewegung bedarf, ist der Strahlengang auch beim Wechsel der Wellenlänge und Veränderung der Intensität sehr stabil. Dies verringert bei Messungen der gleichen Probe mit unterschiedlichen Lasern die in den aufgenommenen Bildern auftretenden Verschiebungen zwischen den Bildern auf ein Minimum. Ein AOTF erzeugt mit Hilfe von Piezoelementen und Radiofrequenzen in einem transparenten Kristall ein optisches Gitter und kann somit die Beugung von eintreffendem Licht beein-

flussen. So ist sowohl die Steuerung der Intensität als auch der durchgelassenen Wellenlänge möglich.

Die Linsen L1, L2 und L3 weiten den Strahl auf, da das nachfolgende Linsensystem zur Homogenisierung der Strahlintensität (bestehend aus den Linsen L4, L5, L6 und L7) einen Laserstrahl mit festem Durchmesser benötigt. Die Homogenisierung ist für Lokalisationsmikroskopie bedeutsam, da das reversible Fotobleichen (siehe Abschnitt 2.1.4.2) von der Laserintensität abhängig ist und daher eine homogene Ausleuchtung vorausgesetzt wird.

Diverse Spiegel S dienen der Richtungsänderung des Strahls. Das Objektiv steht senkrecht auf der „Papierebene“. Durch die Einfokussierlinse L8 und den Spiegel S5 wird der Strahl durch den dichroitischen Spiegel D4 in das Objektiv gelenkt. Der Spiegel reflektiert Licht der vier Laserwellenlängen, aber ist transparent für das stokesgeshiftete Emissionslicht. Somit sorgt der dichroitische Spiegel D4 hier auch für die Unterscheidung in Anregungs- und Emissionslicht. Eingesetzt wird ein 100fach Ölimmersionsobjektiv mit einer Numerischen Apertur von $NA=1.46$. Das durch das Objektiv aufgefangene Licht wird erneut durch den dichroitischen Spiegel D4 geleitet bevor es eine Tubuslinse TL und einen Sperrfilter F1 passiert. Die Tubus-Linse (sowie die zweite Kamera und der dichroitische Spiegel D5) war in dem verwendeten Aufbau noch nicht vorhanden. Der Sperrfilter ist undurchlässig für Licht der Anregungswellenlängen und verhindert, dass Streulicht aus dem Anregungsstrahlengang in den Emissionsstrahlengang gerät. Durch das Linsensystem L9 und L10 bzw. L9 und L11 und den dichroitischen Filter D5 gelangt das Licht in die Kamera. Durch das System kann ein Bereich von $40 \times 40 \mu\text{m}$ abgebildet werden.

Da die Genauigkeit der Positionsbestimmung von Fluorophoren erheblich von der Anzahl der detektierten Photonen abhängt (siehe dazu Abschnitt 3.2.3), sollten die verwendeten Kameras eine hohe Quantenausbeute haben und Einzelaufnahmen mit einer hohen Bildrate erstellen können. Die hier verwendete Electron Multiplying Charge-Coupled Device-Kamera (EMCCD-Kamera) erreicht Quantenausbeuten von bis zu 96% und eine Ausleserate bei Einzelaufnahmen von 10 ms. Das Datenblatt der Kamera befindet sich im Anhang D.2.

Die Aufnahme eines Lokalisationsbildes dauert in der Regel mehrere Minuten (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.2). Soll die Aufnahme in mehreren Farbkanälen aufgenommen werden, verlängert sich diese Aufnahmezeit entsprechend. Es muss daher garantiert werden, dass der Aufbau und der Strahlengang während der Aufnahme stabil sind. Erschütterungen werden durch einen schwingungsgedämpften Tisch und spezielle Halterungen für alle Mikroskopkomponenten unterbunden. Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen befindet sich das Mikroskop in einem klimatisierten Raum. Zusätzlich werden alle Komponenten mit einer Wasserkühlung gekühlt. Das Gerät sollte vor Beginn einer Messung ca. eine Stunde früher eingeschaltet werden, damit sich das benötigte Temperaturgleichgewicht zwischen Umgebungsluft, sich erwärmenden Mikroskopkomponenten (Spannungsversorgung, Laser usf.) und Wasserkühlung einstellen kann. Auch sollte der entsprechende Objektträger ins Mikroskop eingelegt werden, sodass

auch dieser sich mit den restlichen Komponenten im Temperaturgleichgewicht befindet.

3.2.2 Aufnahme von Lokalisationsrohdaten

Lokalisationsdaten werden aus einem Bilderstapel gewonnen (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.5.2). Neben diesem Bilderstapel wird stets auch eine konventionelle Mikroskopaufnahme erstellt, um diese später ggf. mit der Lokalisationsaufnahme zu vergleichen. In Abhängigkeit der verwendeten Fluoreszenzmarkierung müssen die Laserintensitäten bei der Aufnahme der konventionellen Aufnahmen angepasst werden, um einen optimalen Kontrast zu erreichen. Bei Lokalisationsaufnahmen wird stets die maximale Intensität verwendet. Für eine typische Fluoreszenzmarkierung mit zwei Farbstoffen in den Kanälen 491 nm und 561 nm, sowie einer DAPI-Gegenfärbung (siehe Abschnitt 3.1) soll im Folgenden der Ablauf einer Lokalisationsaufnahme beschrieben werden.

Zunächst wird ein geeigneter Zellkern unter Benutzung der DAPI-Färbung ausgewählt. Diese wird bei 405 nm angeregt. Um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu vermeiden, wird dabei die Laserleistung so niedrig wie möglich gehalten (ca. 1 bis 4 % der maximal möglichen Laserleistung). Anschließend werden von dem Zellkern in den gewünschten Kanälen konventionelle Aufnahmen erstellt. Danach folgen die Lokalisationsaufnahmen, jeweils immer zuerst das niederenergetische Licht. Für die Lokalisationsaufnahmen wird die maximal mögliche Laserleistung verwendet (491 nm: 2.52 kW/cm², 561 nm: 4.65 kW/cm² und 642 nm: 1.69 kW/cm²). Werden die Laser auf maximale Leistung gestellt, dann nimmt die Fluoreszenz zunächst stark zu bevor der größte Teil der Fluorophore reversibel gebleicht wird. In diesen ersten Sekunden würde die Kamera kein nutzbares Bild liefern. Daher wird vor jeder Lokalisationsaufnahme die Probe zunächst bei maximaler Laserleistung für 3 s bestrahlt bevor die Aufnahme mit der Kamera begonnen wird. Die Lokalisationsaufnahme besteht dann aus einem Bilderstapel mit der entsprechenden Anzahl von Bildern. Die entsprechenden Aufnahmen werden, wie in Tabelle 3.1 aufgeführt, erstellt. In den Bilderstapeln der Lokalisationsdaten werden dann die Blinkereignisse wie in Abschnitt 3.2.3 erkannt. Die Anzahl der Aufnahmen ist abhängig von dem entsprechenden Experiment. Die Anzahl der Blinkereignisse pro Aufnahme nimmt mit steigender Anzahl der Aufnahmen ab. Nach einigen Testaufnahmen kann so ein sinnvoller Wert für die Anzahl der Aufnahmen festgelegt werden.

3.2.3 Positionsbestimmung aus Lokalisationsrohdaten

Zur Erkennung von Punktsignalen (Blinkereignissen) und zur Bestimmung der zugehörigen Lokalisationsgenauigkeit aus den Lokalisationsbilderstapeln wurde der von Grüll et al. [110] entwickelte Algorithmus fastSPDM verwendet. Der Prozess wird in Abbildung 3.6 veranschaulicht und läuft in folgenden Schritten ab:

Wellenlänge [nm]	Intensität [% der Maximalintensität]	Anzahl Aufnahmen	Belichtungsdauer pro Bild [ms]
Konventionelle Aufnahmen			
561	8-12	1	100
491	3-6	1	100
405	2-4	1	100
Lokalisationsaufnahmen			
561	100	2000	100
491	100	2000	100

Tabelle 3.1: Übersicht der durchgeführten Aufnahmen, die zu einem Lokalisationsdatensatz in den Kanälen 561 nm und 491 nm gehören.

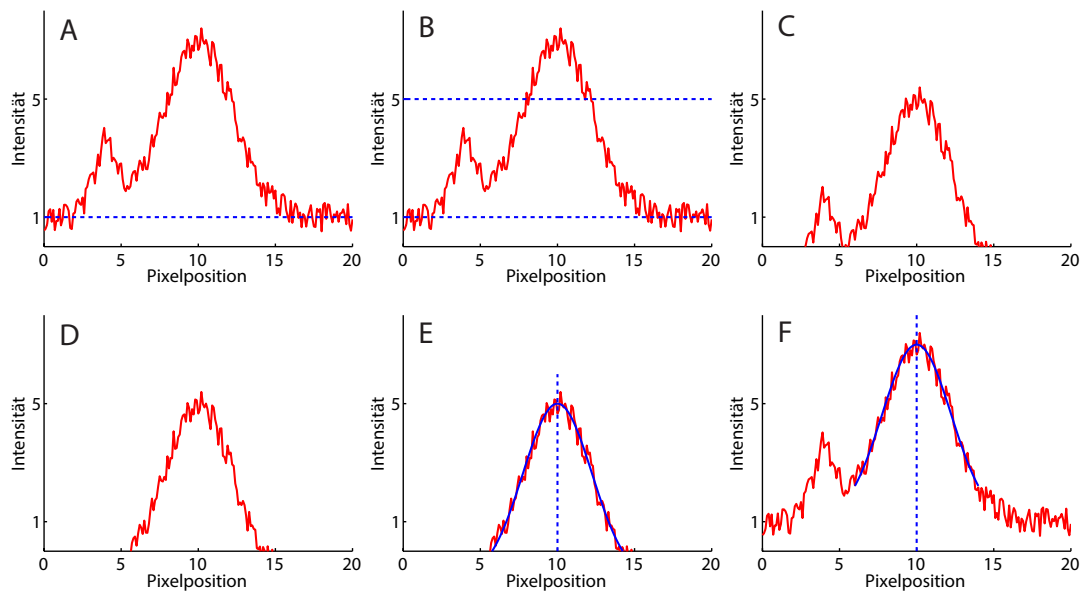


Abbildung 3.6: Positionsbestimmung aus der gemessenen Intensität. Zur besseren Übersicht wird die Positionsbestimmung hier in einer Dimension dargestellt und die Intensität als Vielfache der Hintergrundintensität angegeben. Dargestellt wird ein kleiner Ausschnitt aus einem fiktiven „1D“-Bild eines Bildes des Bilderstapels (siehe dazu Abschnitt 3.2.2). Die gemessene Intensität ist in rot dargestellt. A: Die Hintergrundintensität wird bestimmt. B: Aus der Hintergrundintensität ergibt sich die Schwellwert-Intensität, die ein Blinkereignis mindestens erreichen muss, um als solches erkannt zu werden. C: Von der Intensitätsverteilung wird die zweifache Hintergrundintensität abgezogen. D: Ausgehend vom Maximum wird nach lokalen Maxima gesucht und diese werden auf Null gesetzt. E: Mit einer Gaußfunktion wird eine Anpassung durchgeführt und so die Position des Maximum bestimmt. F: Darstellung der Gauß-Anpassungsfunktion in der ursprünglichen Intensitätsverteilung.

1. Zunächst wird die Intensität des Hintergrundes für jeden Layer des aufgenommenen Bilderstapels berechnet (siehe Abbildung 3.6 A). Die Inhomogenität des Hintergrundes bei einer komplexen Struktur wie einer Zelle kann vernachlässigt werden, da er sich verglichen mit den Blinkereignissen nur geringfügig ändert. Der Hintergrund folgt einer Poisson-Zufallsverteilung mit der Breite $\sigma_{N_B} = \sqrt{N_B}$. Für N_B gilt hierbei:

$$N_{B,t} = N_{B,t-1} + \frac{1}{N}(\min(Img_t - N_{B,t-1}, \sigma_{N_{B,t-1}}))$$

mit $N_{B,t}$: Hintergrundintensität im Bild t . Img_t : Intensität des Bildes t . $\sigma_{N_{B,t-1}}$: maximal zugelassener Anstieg des Hintergrundes. $\frac{1}{N}$: Glättungsfaktor der exponentiellen Glättung.

Die Werte werden exponentiell geglättet (Glättungsfaktor $\frac{1}{N}$, N sollte dabei größer sein, als die Anzahl von Bildern, in denen ein Blinkereignis durchschnittlich sichtbar ist). Der Anstieg des Hintergrundes ist auf σ_{N_B} begrenzt, damit die Blinkereignisse den Hintergrund nicht zu stark erhöhen.

2. Um als Blinkereignis erkannt zu werden, muss das Maximum der PSF den Hintergrund um $4\sigma_{N_B}$ übersteigen (siehe Abbildung 3.6 B). Außerdem muss das Maximum sich in einem quadratischen Bereich (im weiteren Verlauf als ROI bezeichnet) befinden. Die Größe der ROI kann entsprechend der Wellenlänge und Numerischen Apertur berechnet werden, da diese die Größe der PSF bestimmen (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.2). Innerhalb der ROI wird vom gemessenen Signal der Hintergrund abgezogen.
3. Die Größe der ROI hat einen Einfluss auf die Lokalisationsungenauigkeit. Daher wird von jedem Pixel nochmals der Wert $2\sigma_{N_B}$ abgezogen, wobei dann alle negativ gewordenen Werte auf Null gesetzt werden (siehe Abbildung 3.6 C). Dadurch wird eine verkleinerte und effektiv eine runde ROI erzeugt.
4. Je nach Dichte des Farbstoffes kann es passieren, dass zwei Blinkereignisse sich überlappen. Das würde zu einer fehlerhaften Lokalisation führen. Um das zu verhindern, wird in der ROI ausgehend vom Maximum nach lokalen Minima gesucht und alle folgenden Pixel auf Null gesetzt (siehe Abbildung 3.6 D). Eine Toleranzschwelle von σ_{N_B} verhindert, dass schon bloßes Rauschen als lokales Minimum erkannt wird.
5. Abschließend wird aus der ROI mit Hilfe einer Gaußverteilung der Schwerpunkt $\vec{\mu}$ und die Standardabweichung σ_x, σ_y des Signals bestimmt (siehe Abbildung 3.6 E). Außerdem die zugehörige Genauigkeit der Lokalisation über die untenstehenden Formeln berechnet (Q : Gesamtintensität, q_i : Intensität des Pixels i):

$$f(\vec{x}) = \frac{Q}{2\pi\sigma_x\sigma_y} e^{-\frac{(x-\mu_x)^2 + (y-\mu_y)^2}{2}}$$

$$Q = \sum q_i \quad \vec{\mu} = \sum \frac{q_i}{Q} \vec{x}_i \quad \sigma_x^2 = \sum (x_i - \mu_x)^2 \frac{q_i}{Q} \quad (3.1)$$

$$\Delta\mu_x = \sqrt{\frac{1}{12Q} + \sum \left(\frac{x_i - \mu_x}{Q}\right)^2 (q_i + N_B)}$$

Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [110].

3.2.4 Erstellung von Bildern aus Lokalisationsdaten

Die Lokalisationsdaten liegen nach der Punkterkennung (siehe Abschnitt 3.2.3 und 2.1.5.2) als Matrix mit Koordinaten (typischerweise in nm), den zugehörigen Ungenauigkeiten und weiteren Informationen vor (siehe dazu Tabelle 3.2). Im

Inhalt der Koordinatenmatrix	
1	Signalamplitude [# Photoelektronen]
2	laterale y-Koordinate [nm]
3	laterale x-Koordinate [nm]
4	Fehler der lateralen y-Koordinate [nm]
5	Fehler der lateralen x-Koordinate [nm]
6	Standardabweichung der Gaußfunktion y-Richtung [nm]
7	Standardabweichung der Gaußfunktion x-Richtung [nm]
8	Anzahl der Photoelektronen im Signal
9	Position im Bilderstapel, in dem das Signal detektiert wurde

Tabelle 3.2: Inhalt der Koordinatenmatrix. Ausgehend von dem Bilderstapel werden durch das in Abschnitt 3.2.3 beschriebene Vorgehen u. a. die Koordinaten der Fluorophore mit zugehörigen Fehlern berechnet.

Gegensatz dazu gibt konventionelle Mikroskopie als Resultat ein Bild aus. Bild-darstellungen werden allerdings auch in der Lokalisationsmikroskopie benötigt. Da es nicht nötig ist, die Bilddarstellung mit der maximal erreichten Genauigkeit zu generieren, muss zunächst entschieden werden, welche Größe einem Pixel entspricht. Typischerweise entsprechen einem Pixel 10 nm des zu erstellenden Bildes. Um nun aus den Lokalisationsdaten eine Bilddarstellung zu erhalten, existieren verschiedene Verfahren, die unterschiedliche Vor- und Nachteile haben und für verschiedene Aufgaben eingesetzt werden. Die vier wichtigsten Verfahren werden im Folgenden beschrieben.

- **Standardbild:** Zur Erstellung des Standardbildes wird zunächst ein Bildraster mit entsprechender Bild- und Pixelgröße erstellt. Jede gefundene Koordinate wird nun entsprechend in dieses Bildraster eingetragen. Der dem Pixel (d. h. einem Element des Rasters) zugeordnete Wert entspricht dann der Anzahl der Ereignisse, die sich in diesem Rasterelement befinden. Außerdem wird die Darstellung entsprechend der Lokalisationsgenauigkeit mit einem Gaußfilter verschmiert. Die Pixelgröße kann beliebig klein gemacht werden, sodass diese Darstellung es ermöglicht, die Auflösung eines Lokalisationsmikroskops auch bildlich darzustellen. Allerdings kommt dieser Vorteil bei der Betrachtung nur selten zum Tragen und kann sogar zu einem Nachteil werden, da die Bilder (siehe Abbildung 3.7 C) häufig aus voneinander separierten Pixeln bestehen und somit das Erkennen der Struktur erschwert wird. Unter bestimmten Bedingungen kann diese Darstellung hilfreich sein, z. B. wenn die Struktur eines Ausschnittes näher betrachtet werden muss (siehe dazu auch Abbildung 7.1).
- **Dichtebild:** Als Grundlage für ein Dichtebild dient ein Standardbild, denn auch hier muss zunächst ein Bildraster mit entsprechender Bild- und Pixelgröße erstellt werden. Die Berechnung der Dichte, die dem jeweiligen Pixel zugeordnet wird, passiert wie in Abschnitt 5.5 beschrieben wird. Die Erkennbarkeit von dichten und weniger dichten Bereichen wird durch die Darstellung vereinfacht. Darüber hinaus wird ein Gaußfilter verwendet, um durch Glättung und Weichzeichnung der Punkte zusammenhängende Strukturen noch deutlicher hervorzuheben. Jeder einzelne Pixel (x_i, y_i) mit einer Dichte $\rho_i > 0$ wird Ausgangspunkt einer Gaußverteilung mit vorgegebenem σ . Aus der Summe aller Gaußverteilungen ergibt sich das gaußgefilterte Dichtebild. Für zwei Dimensionen wird die Weichzeichnung wie folgt dargestellt:

$$h_i(x_i, y_i) = \rho_i \cdot \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{x_i^2 + y_i^2}{2\sigma^2}}$$

Durch die Bestimmung des Radius r zur Berechnung der Dichte und des σ des Gaußfilters kann die Darstellung für die entsprechende Anwendung optimiert werden. Dieses Verfahren nutzt nicht die volle Genauigkeit der Lokalisationsmikroskopie, aber macht das Erkennen größerer Strukturen, die ggf. zusammenhängend sind, möglich. Gaußgefilterte Dichtebilder sind ein wichtiges Werkzeug, um die Qualität einer Mikroskopaufnahme zu bewerten und zu entscheiden, ob sie für weitere quantitative Analysen genutzt werden kann (siehe Abbildung 3.7 B). Für alle weiteren Analysen, wie Distanz und Clusteranalysen, wird selbstverständlich wieder die Koordinatenmatrix mit Nanometergenauigkeit verwendet.

- Clusterbild: Das Clusterbild ist das bildliche Ergebnis der Clusteranalyse. Wie in Abschnitt 5.3 beschrieben wird, können in Lokalisationsdaten Cluster erkannt werden. In dem zugehörigen Clusterbild werden ausschließlich Clusterpunkte dargestellt, wobei die einzelnen Cluster darüber hinaus als zusammenhängende Fläche abgebildet werden. Diese Darstellung ist hilfreich, um die gewählten Clusterparameter zu überprüfen, z. B. indem Dichtebilder und Clusterbilder verglichen werden (siehe Abbildung 3.7 D).
- Übersichtsbild: Die oben genannten Darstellungen werden aus der Koordinatenmatrix generiert. Darüber hinaus werden am Lokalisationsmikroskop stets auch sogenannte Übersichtsbilder erstellt, die dem Bild eines konventionellen Mikroskops entsprechen. Sie sind ein hilfreiches Werkzeug, um die Güte des Lokalisationsbildes zu bewerten (siehe Abbildung 3.7 A).

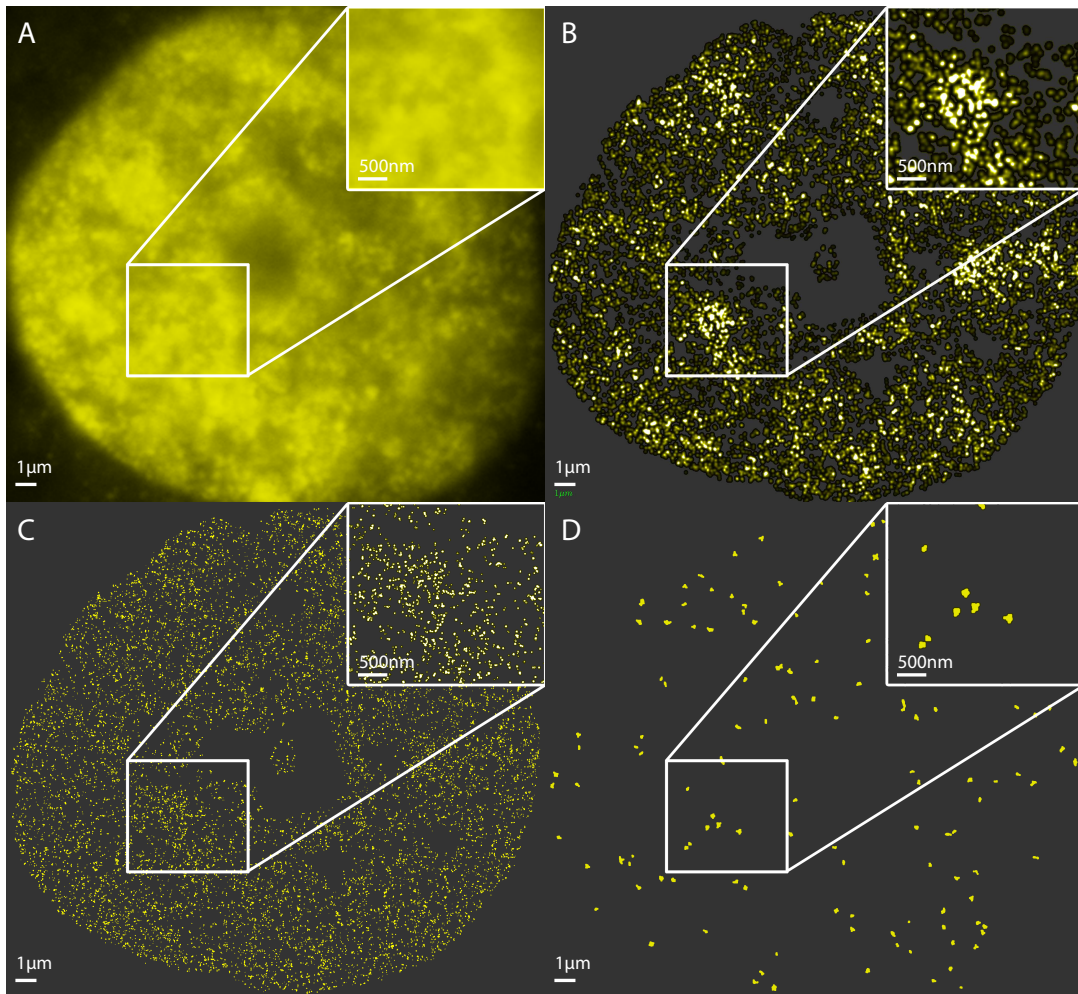


Abbildung 3.7: Bilderstellung aus Lokalisationsdaten. A: Übersichtsbild. Dabei handelt es sich um ein konventionelles Mikroskopbild, das am Lokalisationsmikroskop zusätzlich zum Bilderstapel aufgenommen wird. Es dient vor allem zum Vergleich mit den Lokalisationsbildern. B: Dichtebild. Dichtebilder verwenden nicht die volle Auflösung der Lokalisationsdaten und durch Weichzeichnerfilter gehen Details verloren, aber sie erleichtern es so erheblich zusammenhängende Strukturen zu erkennen. Auch sind sie bei entsprechenden Einstellungen der Filter konventionellen Mikroskopbildern ähnlich und erlauben einen Vergleich. C: Standardbild. Standardbilder können (prinzipiell) die nanometergenaue Auflösung eines Lokalisationsmikroskops auch wiedergeben. Allerdings ist dies mit einem hohen Rechenaufwand verbunden. D: Clusterbild. Clusterbilder zeigen nur die Bereiche, die bestimmten Clusterparametern genügen. Diese Bilddarstellung ist vor allem bei der Überprüfung der Auswahl von Clusterparametern nützlich.

Optimierung der Präparationen zur nanoskaligen Chromatinstrukturanalyse

Je genauer die mikroskopische Analyse einer Struktur sein soll, desto exakter muss auch die Markierungsmethode sein, die die entsprechende Struktur sichtbar macht. Bei konventioneller Mikroskopie, dessen Genauigkeitslimit 200 nm beträgt, wird stets eine gewisse Menge von Fluorophoren durch Überlagerung der PSFs als zusammenhängende Fläche abgebildet (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.2). Somit ist diese Mikroskopie in einem gewissen Rahmen unempfindlich gegen Fluorophore, die falsch gebunden haben oder ungebunden sind, da sie das wahrnehmbare Ergebnis nur bedingt beeinflussen. Lokalisationsmikroskopie hingegen bildet Einzelmoleküle ab und ist dadurch empfindlich für alle Fehlmarkierungen und ungebundenen Fluorophore. Auch sind nicht alle Fragestellungen auf Nanometergenauigkeit angewiesen. Hier aber soll die Genomarchitektur untersucht werden, daher sollte der Einfluss der Präparationsschritte auf diese möglichst gering gehalten werden. Die Optimierung der Präparation umfasste einerseits die Veränderung der Präparationsprotokolle sowie die Prüfung, bei welchem der Schritte eine besonders präzise Einhaltung der Vorgaben nötig ist. Darüber hinaus wurden Möglichkeiten etabliert, mehrere Markierungen an einem Präparat durchzuführen.

4.1 Immunofluoreszenz

Kommerzielle erhältliche Antikörper für die Immunofluoreszenz (siehe Abschnitt 3.1.4) und die mitgelieferten Präparationsprotokolle sind in der Regel für konventionelle Mikroskopieverfahren entwickelt und optimiert. Dennoch stellen diese Protokolle eine gute Grundlage dar. Untenstehend befindet sich das für Lokali-

sationsmikroskopie optimierte Protokoll und in Tabelle 4.1 eine Übersicht der verwendeten Konzentrationen und Markierungsbedingungen, die für gleichbleibende Ergebnisse unbedingt eingehalten werden müssen.

Materialien

- 1xPBS + Mg/Ca
 - Natriumchlorid (NaCl): 155.172 mmol/L
 - Kaliumdihydrogenphosphat(KH_2PO_4): 1.059 mmol/L
 - Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4): 2.966 mmol/L
 - Magnesiumchlorid (MgCl_2): 0.901 mmol/L
 - Calciumchlorid (CaCl_2): 0.493 mmol/L
- Blocker-Lösung (2 % Bovines Serumalbumin (BSA) in 1xPBS + Mg/Ca)
- Permeabilisierungspuffer (0.2 % Octoxinol 9 (Triton-X) in 1xPBS+Mg/Ca)
- Deckgläser mit fixierten Zellen
- Parafilm¹ (dehnbare Verschlussfolie, aus Parafin-Wachs und Polyethylen)
- Rüttler (ermöglicht durch gleichmäßige Bewegung der Proben das Auswaschen von Reagenzien)
- Wärmeschrank (37 °C) mit hoher Luftfeuchtigkeit
- Kühltisch (4 °C) mit hoher Luftfeuchtigkeit
- Primärer Antikörper in Blockerlösung (siehe Tabelle 4.1)
- Sekundärer Antikörper in Blockerlösung (siehe Tabelle 4.1)

Durchführung

1. Deckgläser mit fixierten Zellen in Permeabilisierungspuffer für 3 Minuten inkubieren, um die Membranen für die Antikörper durchlässig zu machen.
2. 3x 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen, um den Permeabilisierungspuffer von den Zellen zu entfernen.
3. 30 min in Blocker-Lösung inkubieren, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren.
4. Primäre Antikörper-Lösung auf aufgespannten Parafilm tropfen und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auflegen. Für 24x24mm Deckgläser 100 µL Antikörperlösung verwenden.

¹Pechiney Plastic Packaging

Markierungsmittel	Konzentration	Färbedauer	Temperatur
Primäre Antikörper			
H3 (tri methyl K9)	1.4 mg/L	0.5 h	37 °C
γ H2AX	2 mg/L	12 h	4 °C
Sekundäre Antikörper			
Alexa488	4 mg/L	0.5 h	37 °C
Alexa568	4 mg/L	0.5 h	37 °C

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper und zugehörige Färbebedingungen

5. Abhängig vom Antikörper unter den in Tabelle 4.1 angegebenen Bedingungen inkubieren
6. 3x 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.
7. Sekundäre Antikörper-Lösung auf aufgespannten Parafilm tropfen und die Deckgläser mit den Zellen nach unten auflegen. Für 24x24mm Deckgläser 100 μ L Antikörperlösung verwenden.
8. Abhängig vom Antikörper unter den in Tabelle 4.1 angegebenen Bedingungen inkubieren
9. 3x 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

4.2 Combo-FISH

Typischerweise werden Combo-FISH-Sonden eingesetzt um z. B. einzelne Gene zu markieren bzw. per Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Dazu werden mehrere ca. 20 bp lange Sonden benötigt, die alle in der gewünschten Region binden, sodass ein sichtbares (d. h. sich deutlich vom Hintergrund) abhebbendes Fluoreszenzsignal entsteht. Das vereinzelt Binden von Sonden außerhalb der gewünschten Region kann dabei vernachlässigt werden. Ein solches Sonden-set wird durch spezielle Genomdatenbanksuchen mit Hilfe eigens dafür entwickelter Algorithmen erstellt. Genaue Beschreibungen der Methoden zur SONDENSUCHE finden sich in [102, 106].

Dieses Verfahren erlaubt zwei Varianten der Hybridisierung. Einerseits können die Combo-FISH-Sonden per Watson-Crick-Bindung an einzelsträngige DNA binden. Andererseits können Sonden erstellt werden, die an den DNA-Doppelstrang binden und somit einen Tripelstrang bilden [111, 112].

Da Combo-FISH-Sonden häufig nur wenige Bindungsstellen haben, ist eine hohe Markierungseffizienz (d. h. ein hoher Anteil der möglichen Bindungsstellen muss durch Sonden erreicht werden) nötig, um ein wahrnehmbares Fluoreszenzsignal zu erreichen. Üblicherweise sind daher für Combo-FISH-Markierungen

Präparationsschritte nötig, die einen erheblichen Einfluss auf die Struktur der DNA haben, um diese für die Sonden zugänglich zu machen. Dazu gehören z. B. Schritte, die bei hohen Temperaturen (90 °C) ablaufen (thermische Denaturierung). Da hier die Struktur der DNA untersucht werden sollte, werden in dem optimierten Protokoll DNA-Struktur-beeinflussende Schritte möglichst vermieden.

Die hier verwendete Alu-Sonde (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.3) hat 400 000 Bindungsstellen und es kann zugunsten der verringerten strukturellen Veränderung der Genomarchitektur auf Markierungseffizienz verzichtet werden. Das untenstehende Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Alu-Combo-FISH-Sonde entwickelt und stellt eine erhebliche Verbesserung zur traditionellen Combo-FISH-Präparation dar. Es basiert auf der Annahme, dass doppelsträngige und einzelsträngige DNA sich in einem Gleichgewicht befinden [113] und somit bei der hier verwendeten Sonde mit einer großen Zahl von Bindungsstellen auf DNA beeinflussende Denaturierungsschritte verzichtet werden kann. Dies kann besonders für die sich in der Nähe von Genen befindlichen Alu-Sequenzen angenommen werden.

Grundlage war das in der Arbeitsgruppe bestehende Combo-FISH-Protokoll, das zunächst auf die grundlegenden Schritte (Permeabilisierung der Membranen, sodass die Sonden diese durchdringen können; Einbringen der Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen; Auswaschen der ungebundenen Sonden) reduziert wurde. Anschließend wurden Schritte hinzugefügt, die sich für das Funktionieren des Protokolls notwendig zeigten. Einige weitere Schritte wurden dann hinzugefügt, die die Markierungseffizienz steigerten oder für gleichbleibendere Resultate sorgten. Das untenstehende Protokoll stellt das Minimalprotokoll dar, das für Combo-FISH der Alu-Sequenz notwendig ist, und hat somit einen minimalen Einfluss auf die zu untersuchende Genomstruktur. Besonders wichtig war es dabei, Präparationsschritte, die einen besonders massiven Einfluss auf die 3D-Struktur der DNA haben, zu vermeiden. Dazu gehören z. B. Schritte, die bei hohen Temperaturen ablaufen, Proteine in erheblichen Maße zerteilen und die Struktur dehydrieren. Es zeigte sich, dass auf diese Schritte bei der Alu-Sonde gänzlich verzichtet werden kann.

Materialien

- 0.1 mol/L Salzsäure (HCl)
- 1xPBS + Mg/Ca
 - Natriumchlorid (NaCl): 155.172 mmol/L
 - Kaliumdihydrogenphosphat(KH₂PO₄): 1.059 mmol/L
 - Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄): 2.966 mmol/L
 - Magnesiumchlorid (MgCl₂): 0.901 mmol/L
 - Calciumchlorid (CaCl₂): 0.493 mmol/L

- 2xSSC
 - Natriumchlorid (NaCl): 0.3 mol/L
 - Natriumcitrat: 30 mmol/L
- 50 % Formamid in 2xSSC
- 20 mmol/L Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(TRIS)-Lösung, mit Salzsäure (HCl) auf pH7.4 eingestellt.
- 20 µL Combo-FISH-Lösung in TRIS-HCl, Konzentration der Sonden: 10 mg/L
- 0.05 % Octoxinol 9 (Triton-X) in 1xPBS+Mg/Ca
- Objektträger
- Deckgläser mit fixierten Zellen
- Rüttler (ermöglicht durch gleichmäßige Bewegung der Proben das Auswaschen von Reagenzien)
- Wärmeschrank (37 °C) mit hoher Luftfeuchtigkeit
- Fixogum² (Markenname für einen auf Naturkautschuk und organischen Lösungsmitteln basierender Kleber. Er wird hier als übergangsweise und leicht wieder entfernbare Versiegelung verwendet.)

Durchführung

1. Deckgläser mit 0.1 mol/L HCl spülen
2. für 10 min in 0.1 mol/L HCl zur chemischen Denaturierung der DNA inkubieren. Obwohl dieser Schritt die Struktur der DNA beeinflussen kann, konnte nicht völlig auf ihn verzichtet werden, da er für das Funktionieren des Protokolls unumgänglich ist. Es konnte aber ein geringer destruktiver Effekt als bei thermischer Denaturierung erzielt werden.
3. 3x 5 min in 0.05 % Triton-X in 1xPBS+Mg/Ca waschen. Mit diesem Schritt wird die Salzsäure aus der Präparation ausgewaschen. Das in der Lösung enthaltene Triton-X sorgt darüber hinaus für die Permeabilisierung der Membran.
4. 5 min in 2xSSC equilibrieren. Dies dient zur Vorbereitung der im nächsten Schritt verwendeten Formamid-Lösung.
5. 30 min in 50 % Formamid in 2xSSC inkubieren. Formamid bindet an den Basen der DNA und verringert die Bindungskräfte dieser. So werden sie leichter zugänglich für die Sonden.
6. 20 µL Sondenlösung auf Objektträger auftropfen

²Marabu GmbH & Co. KG

7. Deckglas vorsichtig auf Sondenlösung legen und mit Fixogum versiegeln
8. 24 h im Wärmeschrank (bei 37°C) inkubieren
9. Fixogum entfernen und Zellen sofort 3x 10 min in 2x SSC bei 37°C waschen, um ungebundene Sonden zu entfernen.
10. 5 min in 1xPBS+Mg/Ca equilibrieren

4.3 Kombination der Protokolle - Postfixierung

Die Kombination von Färbeprotokollen, um in einem Zellkern mehrere Strukturen sichtbar zu machen, ist stets eine Herausforderung und dies im Speziellen bei FISH-Färbungen [114, 115]. Bei der Überarbeitung der hier (siehe Abschnitt 3.1.4 und 3.1.3) verwendeten Protokolle wurde stets der Aspekt beachtet, dass sie als Kombinationsprotokolle verwendet werden müssen. Diese Optimierungen ermöglichen es nun, auch Kombinationsexperimente aus mehreren Immunfärbungen oder Immunfärbungen und Combo-FISH-Färbungen durchzuführen.

Ein dafür notwendiger Schritt ist die sogenannte Postfixierung. Dazu werden die Proben nach der Combo-FISH- oder Immunfluoreszenz-Markierung nochmals fixiert (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.2). Nach einer Postfixierung können weitere Präparationen oder die Gegenfärbung und Einbettung folgen (siehe Abschnitt 3.1.5).

Bei Kombinationsexperimenten müssen immer zunächst die Immunfluoreszenzmarkierungen durchgeführt werden, da alle zugehörigen Präparationsschritte nur einen geringen DNA-strukturverändernden Einfluss haben. Jede Färbung muss durch eine Postfixierung abgeschlossen werden. Wird dies berücksichtigt, so können Immunfluoreszenz- und Combo-FISH-Markierungen kombiniert werden.

Inwieweit die Kombination von Präparationen die Einzelpräparation beeinflusst, muss jeweils geprüft werden. Dazu werden Einzelexperimente der entsprechenden Markierungen durchgeführt und diese mit den Resultaten der Kombinationsexperimente verglichen. Wie bei der Bewertung der Güte von Messdaten vorgegangen werden kann, wird unter Abschnitt 5.6 beschrieben.

Die obenstehenden Protokolle sind auch über die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet worden und zeigen, dass sie für eine Vielzahl von Markierungsmitteln und Kombinationsexperimenten geeignet sind.

Für eine Postfixierung sind folgende Schritte notwendig:

Materialien

– 1xPBS + Mg/Ca

Natriumchlorid (NaCl): 155.172 mmol/L

Kaliumdihydrogenphosphat(KH₂PO₄): 1.059 mmol/L

Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄): 2.966 mmol/L

Magnesiumchlorid (MgCl_2): 0.901 mmol/L

Calciumchlorid (CaCl_2): 0.493 mmol/L

- Formaldehyd-Lösung (2% in 1xPBS + Mg/Ca) (37°C)
- Deckgläser mit fixierten Zellen
- Wärmebad (37°C)
- Rüttler (ermöglicht durch gleichmäßige Bewegung der Proben das Auswaschen von Reagenzien)

Durchführung

1. in 2% Formaldehyd in 1xPBS+Mg/Ca für 10min bei 37°C postfixieren
2. 5 min in 1xPBS+Mg/Ca waschen

Entwicklung einer quantitativen Datenanalyse der Genomarchitektur

5.1 Motivation

Konventionelle Mikroskopie erzeugt als Resultat ein Bild, das dann für weitere Auswertungen genutzt wird. Bei Lokalisationsdaten hingegen ist die Grundlage nicht wie üblich ein Bild, sondern eine Matrix mit Koordinaten (und den zugehörigen Ungenauigkeiten) der detektierten Fluorophore. Lokalisationsmikroskopie bietet verglichen mit konventioneller Mikroskopie eine erheblich höhere Genauigkeit. Dieser Vorteil kann zur Erstellung von hochauflösenden Bildern genutzt werden. Um die Bilder übersichtlicher und den üblichen Mikroskopbildern ähnlicher zu machen, wird bei der Erstellung von Bildern bewusst auf die volle Lokalisationsgenauigkeit im Bereich einiger Nanometer verzichtet (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4).

Ein typischer Lokalisationsdatensatz eines Zellkerns einer Heterochromatinfärbung (siehe Abschnitt 2.2.3.2) besteht aus zehntausenden von Koordinaten. Viele übliche Mikroskopieanalyseverfahren sind für die Lokalisationsmikroskopie nur sehr bedingt geeignet, da sie für die Analyse von Bilddaten mit einer Genauigkeitsbeschränkung von 200 nm gedacht sind. Die Entwicklung und Weiterentwicklung bestehender oder eigens entwickelter Auswerteverfahren ist Grundvoraussetzung, um die Vorteile von Lokalisationsmikroskopie, über die bloße Bilderstellung hinaus, zu nutzen.

Die Nanometergenauigkeit von Lokalisationsmikroskopie ermöglichte bereits neue Einblicke in die Struktur des Genoms. Unter Benutzung des Combo-FISH-DNA-Markierungsverfahrens konnten einzelne Gene sichtbar gemacht und das Auftreten repetitiver Abschnitte innerhalb dieser untersucht werden [111]. Diese

Genauigkeit der Lokalisationsmikroskopie soll hier für die Analyse der Genomstruktur nutzbar gemacht werden. Diese Aufgabe unterscheidet sich von der Untersuchung einzelner Genregionen dadurch, dass nicht die DNA, sondern die Histonverteilung, die einen erheblichen Anteil an der Strukturierung der DNA hat (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3), betrachtet wird.

Die avisierte quantitative Analyse der Daten setzt einerseits eine große Menge an aufgenommenen Datensätzen voraus und andererseits die systematische Überprüfung jedes einzelnen Datensatzes, bevor er in weitere Auswertungen übernommen werden kann. Typischerweise werden 30 bis 40 Zellkerne für eine Messreihe aufgenommen. Ein Experiment, das aus mehreren Messreihen besteht, enthält hunderte aufgenommener Zellen, deren Datensätze ihrerseits wieder zehntausende Koordinaten enthalten und umfasst ca. 1 TB an Daten. Zur Handhabung dieser Datenmenge war es notwendig, standardisierte Auswerteverfahren zu entwickeln und diese zu (teil)automatisieren (siehe dazu auch Kapitel 6). Darüber hinaus wurden die Programme zur einfachen Handhabung mit grafischen Benutzeroberflächen ausgestattet und geben die wichtigsten Ergebnisse direkt als Diagramme aus. Alle Programme verfügen neben Daten-Ein- und -Ausgabe über Parameter- und Metadaten-Export-Funktionen, sodass anhand dieser das Auswertevorgehen nachvollzogen werden kann oder diese Daten in andere Programme übernommen werden können. Ohne Funktionen dieser Art wäre der halbautomatische Auswertebetrieb, der für Chromatinstrukturanalyse nötig ist, nicht möglich. Die umrissenen Automatisierungen und Überprüfungen hinsichtlich der Qualität der Daten war mit den bisher vorhandenen Programmen nicht möglich.

5.2 Filterung und Normierung

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen haben stets ein gewisses Maß an Hintergrundrauschen. Ein geeigneter Filter zur Reduzierung des Hintergrundrauschens ist die Bestimmung der Dichte an jedem Punkt des Lokalisationsbildes (siehe Abschnitt 5.5). Anschließend werden alle Punkte entfernt, deren zugeordnete Dichte einen bestimmten Schwellwert unterschreitet. Auf den Abbildungen 5.1 A (ungefiltert) und B (gefiltert) ist erkennbar, dass dabei Signale aus dem Bereich, der eindeutig außerhalb des Zellkerns liegt, entfernt werden. Der Einfluss auf die Erkennbarkeit der weiteren Struktur ist minimal. Dies zeigen auch die nebenstehenden Dichteansichten.

Ein typisches Problem bei Fluoreszenzmikroskopie ist Inhomogenität der Fluoreszenz zwischen den einzelnen Messungen, da die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen stets ungleichmäßig ist. Dies lässt sich auf vielerlei Faktoren zurückführen. Als biologisches System ist jede Zelle ein Unikat und weist deutliche Inhomogenitäten der Form, Größe und der (Protein- und Salz-)Konzentrationen innerhalb der Zelle auf. Solche Inhomogenitäten können das Blinken beeinflussen (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.4.2). Weitere Inhomogenitäten entstehen beim

Einbetten der Zellen mit den speziellen Einbettmedien (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.5). Konventionelle Mikroskopie stellt Fluorophore, deren Abstand kleiner als 200 nm ist, stets als zusammenhängend dar. Dies ist das durch Beugung (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.2) bedingte Auflösungslimit. Innerhalb solcher Zusammenhänge spielen erst deutliche Unterschiede in der Dichte der Fluorophore eine Rolle. Bei Lokalisationsmikroskopie wird jedes Fluorophor einzeln abgebildet, jeder Dichteunterschied wird sichtbar gemacht und wirkt sich auf die folgenden Analysen aus. Inhomogenitäten der Markierung, die bei konventioneller Mikroskopie einfach durch die begrenzte Genauigkeit verschwinden, können bei einer Methode wie der Lokalisationsmikroskopie, die Analysen auf Einzelmolekülniveau zulässt, deutliche Unterschiede hervorrufen. Diese Inhomogenitäten, die auf Mikroskopbildern konventioneller Mikroskope kaum wahrnehmbar sind, führen bei Lokalisationsmikroskopie zu erheblichen Unterschieden bei der Anzahl der gemessenen Blinkereignisse pro Messung. Vereinzelt tauchen Messungen auf, die erheblich in beiden Richtungen um den Mittelwert schwanken. Diese können teilweise zehnmal mehr oder weniger Blinkereignisse haben als der Mittelwert. Durch das vereinzelt Auftreten dieser Abweichungen ist es möglich, diese einfach auszusortieren. Allerdings sind auch nach Aussortierung dieser Ausreißer die Schwankungen ggf. noch immer zu groß, sodass die Daten nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software entwickelt, die Lokalisationsdaten (in gewissen Grenzen) normieren kann.

Der Normierungsalgorithmus arbeitet wie folgt: Aus den gemessenen Lokalisationspunkten wird ein Bild erstellt. Auf dieses wird ein Raster A mit einer bestimmten Rastergröße a gelegt und anschließend wird die Anzahl N_{ij} der Ereignisse $E_{ij,k}$ in einem Raster-Element A_{ij} (wobei ij für die Position des Rasterelements steht und $E_{ij,k}$ das k -te Ereignis in dem Rasterelement repräsentiert) berechnet. Daraus werden Listen L_m mit Ereignissen $E_{ij,k}$ erstellt, für die $N_{ij} = N_m$ und $1 \leq N_m \leq \text{Maximum}(N_{ij})$ gilt. Soll nun die Gesamtzahl der Ereignisse um einen bestimmten Anteil (z. B. 10%) reduziert werden, so werden aus jeder Liste L_m zufallsverteilt 10% der Einträge entfernt. Durch dieses Verfahren wird die Punktreduzierung auf dichte und weniger dichte Bereiche (entsprechend ihres Auftretens) verteilt. Die Abbildungen 5.1 und 5.2 zeigen Beispielbilder des Normierungsvorgangs.

Auf den Abbildungen 5.1 und 5.2 ist zu erkennen, dass sich die Darstellung des Zellkerns auf den Bildern 5.1 A (Rohdaten, 53 000 Punkte), B (gefiltert, 47 000 Punkte) und C (Normierung auf 30 000 Punkte) kaum verändert. Erst auf Abbildung 5.1 D (Normierung auf 10 000 Punkte) sind Unterschiede zu erkennen, allerdings wurden hier bereits über 80% der Punkte entfernt. Die Abbildungen 5.2 E (Normierung auf 5000 Punkte) und F (Normierung auf 1000 Punkte) zeigen deutliche Abweichungen, allerdings wurden hier bereits über 90% bzw. über 98% der ursprünglichen Punkte entfernt. Neben der relativen Menge an entfernten Punkten muss auch immer berücksichtigt werden, ob die absolute Zahl an verbliebenen Punkten für eine angemessene Darstellung ausreicht. Der Wert

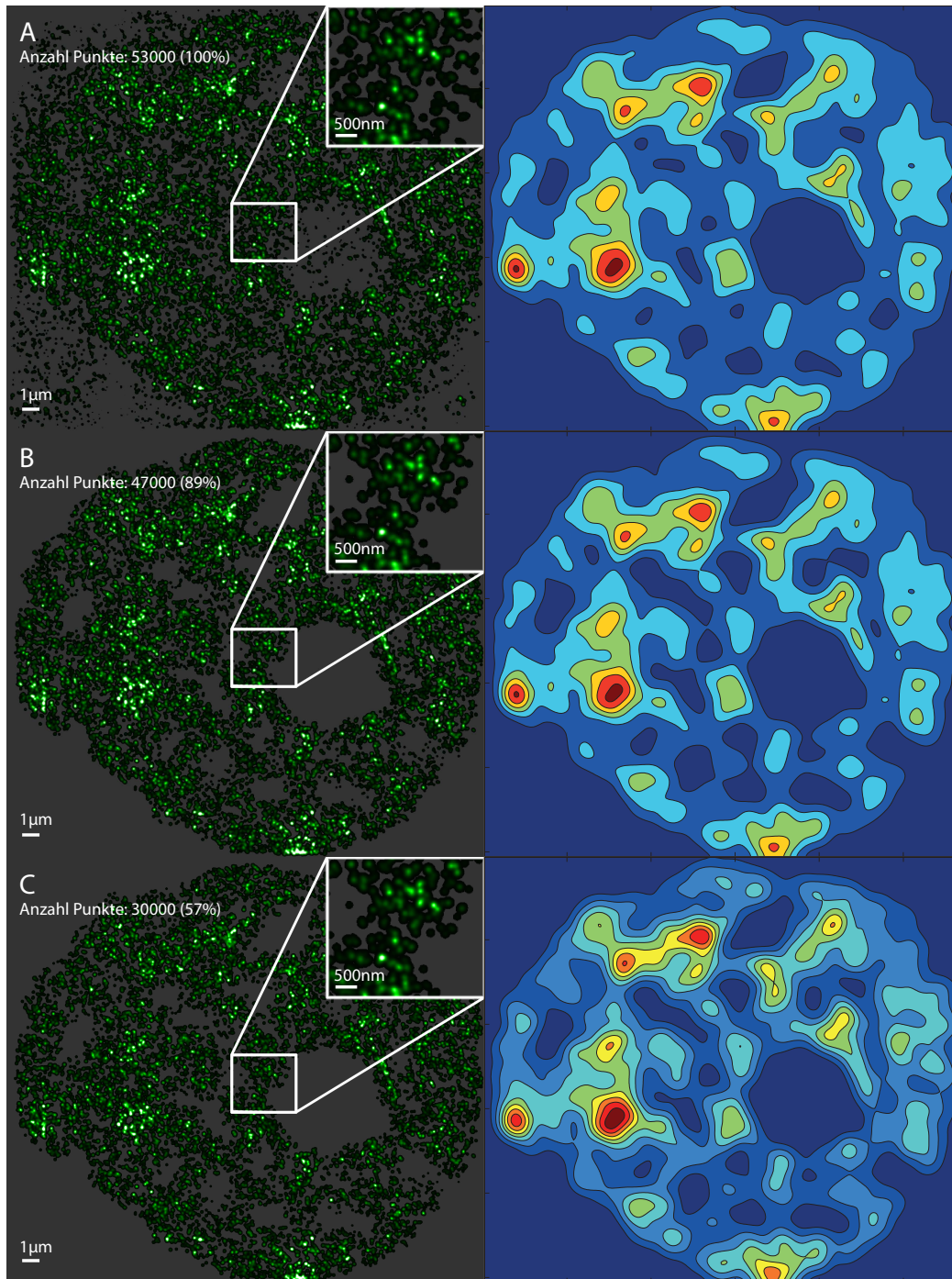


Abbildung 5.1: Normierung und Filterung. Dargestellt sind Dichtebild (Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm) und schematische Dichteverteilung (aus Gründen der besseren Übersicht wurde hierzu die Pixelsize auf 100 nm/px erhöht, Radius=1000 nm). In der schematischen Dichteverteilung ist Farbskalierung jeweils auf das Dichtemaximum des jeweiligen Bildes skaliert. Zusätzlich angegeben ist, wie viel Prozent der ursprünglichen Punkte noch in dem Bild enthalten sind. A: Rohdaten (53 000 Punkte). B: gefiltert (47 000 Punkte). C: normiert 30 000 Punkte.

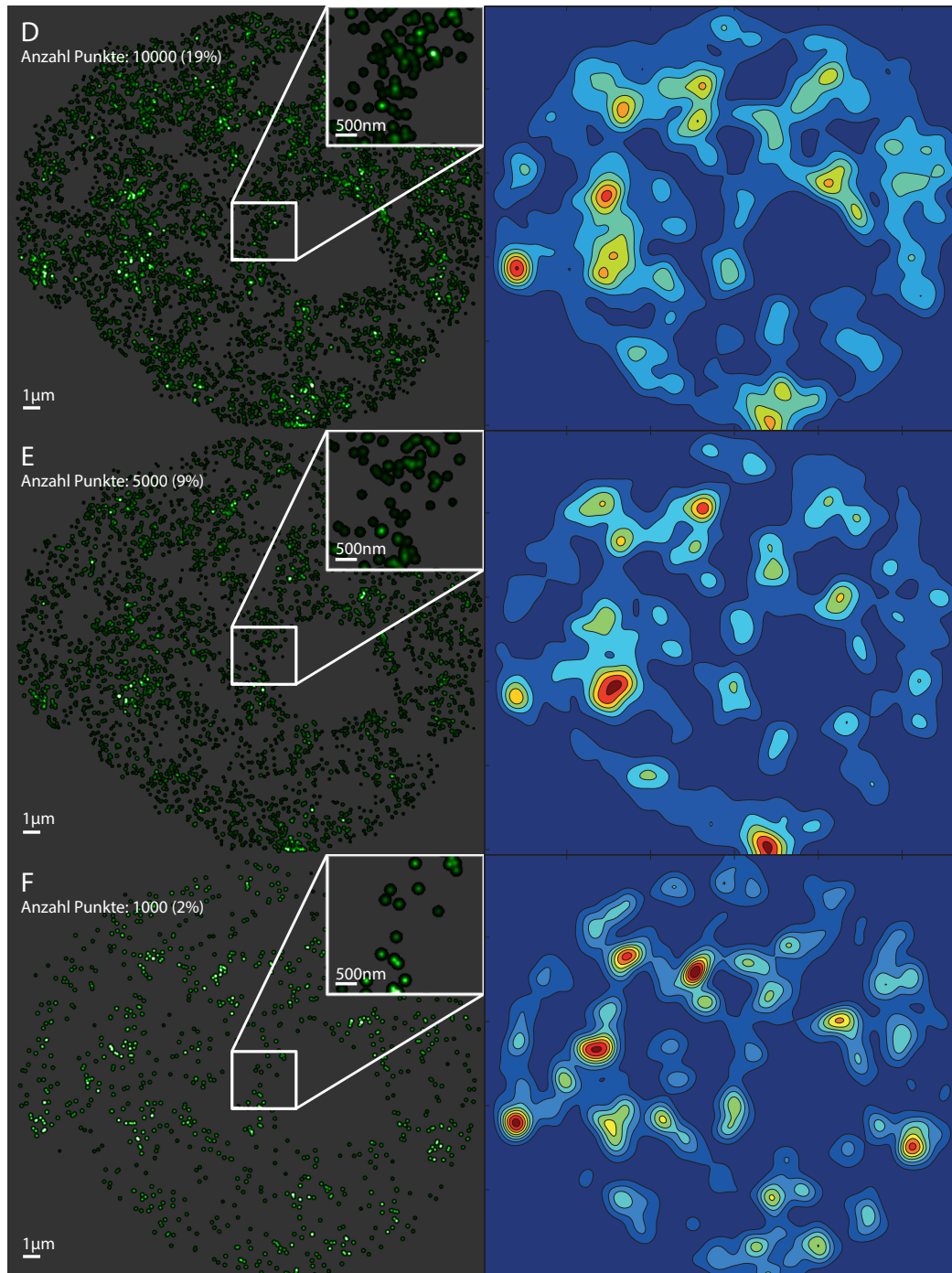


Abbildung 5.2: Normierung und Filterung (Fortsetzung). D: normiert 10 000 Punkte. E: normiert 5000 Punkte. F: normiert 1000 Punkte.

der notwendigen Minimalpunktzahl ist dabei abhängig von der im Experiment durchgeführten Fluoreszenzmarkierung.

Die hier vorgestellten Normierungs- und Filterungsmechanismen sind eine notwendige Grundlage, um Lokalisationsdaten für weitere Analysen zu verwenden. Sie erlauben, Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Messungen herzustellen, was wiederum für die angestrebte quantitative Analyse der Daten notwendig ist. Erst diese quantitativen Analysen ermöglichen, das Potential der Lokalisationsmikroskopie auszunutzen.

5.3 Clusteranalyse

In vielen Fällen bilden Proteine kleine Regionen deutlich höherer Dichte. Dies kann z. B. bei γ H2AX (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4) beobachtet werden, aber auch bei zahlreichen anderen Proteinen. Ab einem bestimmten Dichteunterschied können solche Regionen höherer Dichte mit Hilfe von Algorithmen erkannt werden und vom Hintergrund unterschieden werden. Sie werden dann häufig als Cluster bezeichnet. Clustererkennungsalgorithmen sind in der Mikroskopie ein wichtiges Werkzeug, da viele Proteine in Clustern auftreten und sie einer computergestützten Erkennung zugänglich sind. Lokalisationsmikroskopie bietet, verglichen mit konventionellen Mikroskopiemethoden, die Möglichkeit, Strukturen auf Einzelmolekülniveau zu unterscheiden. Somit ist bei diesem Verfahren eine besonders präzise Clustererkennung möglich, allerdings auch ein anderer Ansatz der Clustererkennung nötig.

Zur Clustererkennung wurde in dieser Arbeit der Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise-Algorithmus (DBSCAN) verwendet [116]. Es handelt sich dabei um einen weitverbreiteten Algorithmus zur Clustererkennung, der dichtebasiert funktioniert und sich für Daten, die aus einzelnen Punkten bestehen, verwenden lässt.

Dem Algorithmus müssen zwei Parameter übergeben werden: ϵ und N_{min} . Er arbeitet dann wie folgt: Um jeden Punkt P_i wird die Anzahl der weiteren Punkte N_i im Radius ϵ bestimmt und mit N_{min} verglichen. Ist $N_i \geq N_{min}$, dann gilt der Punkt P_i als sogenannter Kernpunkt. Alle Punkte P_i , deren Abstand zu einem Kernpunkt kleiner als ϵ ist, aber für die $N_i < N_{min}$ gilt, sind sogenannte dichte-erreichbare Punkte. Alle anderen gelten als Rauschen (siehe dazu auch Abbildung 5.3). Alle Kernpunkte und dichte-erreichbaren Punkte sind somit Teil eines Clusters. Der Algorithmus kann in einem Punktdatensatz mehrere Cluster erkennen, daher müssen die Kernpunkte und alle dichte-erreichbaren Punkte den einzelnen Clustern C zugeordnet werden. Folgendes Kriterium gilt hierbei: befindet sich um einen Kernpunkt P_i ein weiterer Kernpunkt P_j in einem Abstand kleiner als ϵ , so gelten diese beiden Punkte einem Cluster C zugehörig. Dieses Verfahren wird entsprechend wiederholt, bis alle Kernpunkte entsprechend dem Abstand ϵ den Clustern zugeordnet sind. Alle dichte-erreichbaren Punkte, deren Abstand zu einem der Kernpunkte des Clusters C kleiner als ϵ ist, gehören

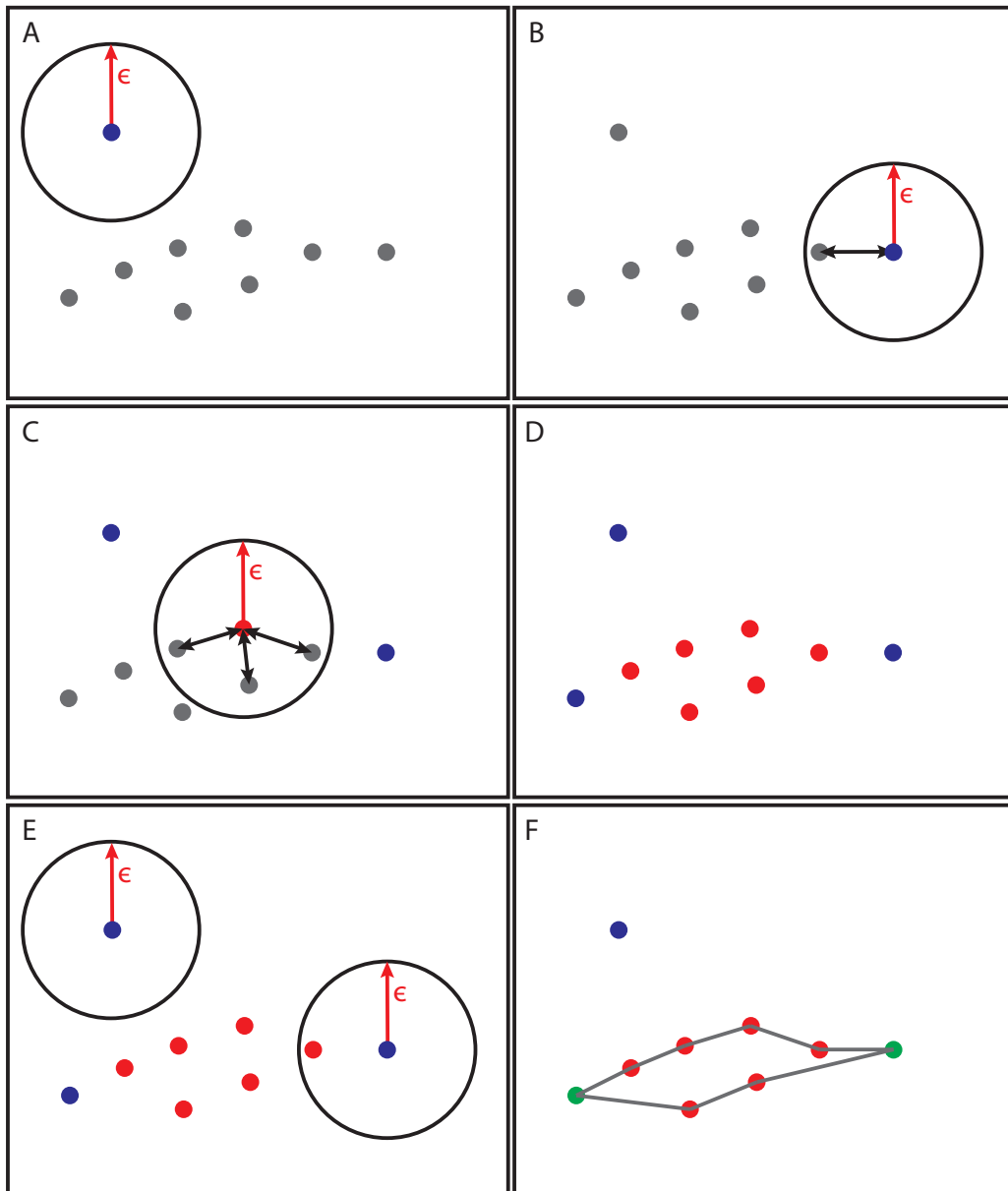


Abbildung 5.3: DBSCAN-Algorithmus. A, B: Im Radius ϵ um jeden Punkt wird die Anzahl der Punkte bestimmt. Ist diese kleiner als N_{min} so gilt der Punkt als Rauschpunkt (blau). C, D: Ist die Anzahl der gefundenen Punkte größer oder gleich N_{min} gilt der Punkt als Kernpunkt (rot). E: Wenn alle Kern- und Rauschpunkte bestimmt sind, wird für jeden Rauschpunkt überprüft, ob er zu einem Kernpunkt einen Abstand kleiner als ϵ hat. F: Ist der Abstand eines Rauschpunktes kleiner ϵ , so gilt er als dichteerreichbarer Punkt (grün). Ein Cluster besteht aus Kernpunkten und dichteerreichbaren Punkten.

ebenfalls zu dem Cluster C .

Die erkannten Cluster und die damit generierten Bilder wurden anschließend mit den Dichtebildern und Übersichtsbildern (siehe Abschnitt 3.2.4) der Zellkerne verglichen, um die Parameterwahl der Clustersuche zu prüfen.

Es existieren zahlreiche Implementierungen des DBSCAN-Algorithmus in verschiedenen Programmiersprachen. Hier wird die unter [117] verfügbare Implementierung in MATLAB verwendet und im Rahmen dieser Arbeit in ein Programm integriert, das aus den erkannten Clustern ein Clusterbild erstellt (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4) und außerdem folgende Charakteristika der Cluster berechnet:

- Clusterschwerpunkt
- Anzahl der Punkte im Cluster
- Clusterfläche
- Anzahl der Cluster in der Zelle
- Umfang des Clusters
- Quadratisches Mittel der Distanzen zwischen den Punkten der konvexen Hülle (die konvexe Hülle wird durch die Punkte repräsentiert, die die Außengrenze des Clusters darstellen, siehe Abbildung 5.3 F, die grauen Linien stellen die konvexe Hülle des Clusters dar)
- Maximale Distanz zwischen den Punkten der konvexen Hülle

Die Clusterfläche wurde mit Hilfe der Gaußschen Trapezformel [118] aus den Punkten der konvexen Hülle des Clusters bestimmt. x_i und y_i stehen für die Koordinaten der Punkte der konvexen Hülle.

$$A = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^{N-1} (x_i y_{i+1} - x_{i+1} y_i)$$

Unter Benutzung der berechneten Fläche kann dann der Schwerpunkt des Clusters wie folgt berechnet werden.

$$x_s = \frac{1}{6A} \sum_{i=0}^{N-1} (x_i + x_{i+1})(x_i y_{i+1} - x_{i+1} y_i)$$

$$y_s = \frac{1}{6A} \sum_{i=0}^{N-1} (y_i + y_{i+1})(x_i y_{i+1} - x_{i+1} y_i)$$

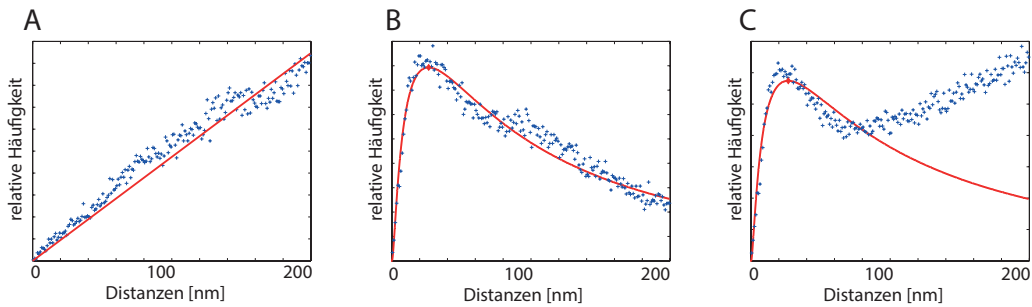


Abbildung 5.4: Typische Distanzverteilungen. (Blau: Messpunkte, rot: mögliche Anpassungsfunktion). Typischerweise treten drei Verteilungen bei Distanzanalysen von Chromatinstrukturen auf: A: Lineare Verteilung (Anpassungsfunktion $f(x) = mx$). B: Logarithmische Normalverteilung (Anpassungsfunktion: $f(x) = A \cdot e^{1/c^2 \cdot (\ln(x)-b)^2}$). C: Logarithmische Normalverteilung überlagert mit einer linearen Verteilung (Anpassungsfunktion siehe B).

5.4 Distanzanalyse

Ein weiteres wichtiges Werkzeug zur Analyse von Lokalisationsdaten sind Distanzanalysen. Dabei werden alle Distanzen zwischen allen Punkten berechnet. Aus diesen Distanzen lassen sich u. a. Häufigkeitsverteilungen bestimmen, die es ermöglichen, Informationen über die gemessene Struktur zu gewinnen. Abbildung 5.4 zeigt beispielhaft mögliche auftretende Distanzverteilungen, die untenstehend näher beschrieben werden.

- **Lineare Abhängigkeit:** Im Fall einer linearen Abhängigkeit kann davon ausgegangen werden, dass die räumliche Verteilung der zugrundeliegenden Punkte zufällig ist. Aus einer linearen Abhängigkeit von Distanz und Häufigkeit der auftretenden Distanzen folgt, dass sich in einem größer werdenden Kreis um einen Punkt die Anzahl der Punkte mit einer festen Rate vergrößert, sodass diese Verteilung keine charakteristische Distanz hat, die mit besonderer Häufigkeit auftritt. Dies entspricht einer Zufallsverteilung (siehe Abbildung 5.4 A).
- **Logarithmische Normalverteilung:** Wie bei vielen natürlichen Prozessen scheint auch die Distanzverteilung von Chromatinstrukturen häufig keiner Gaußverteilung zu folgen, sondern einer logarithmischen Normalverteilung. Die meisten der hier analysierten Strukturen zeigen einen logarithmischen Normalverlauf mit einem lokalen Maximum und werden entsprechend mit logarithmischen Normalverteilungen angenähert (siehe Abbildung 5.4 B).

$$f(x) = A \cdot e^{\frac{(\ln(x)-b)^2}{c^2}}$$

wobei gilt: A : Amplitude des Maximum, e^b : Position des Maximums, c : Breite der Verteilung.

Außerdem sind auch Überlagerungen der genannten Verteilungen möglich. So werden bei nicht zufallsverteilten Strukturen logarithmische Normalverteilungen gefunden, die ab einer bestimmten Distanz in einen linearen Verlauf übergehen (siehe Abbildung 5.4 C). Zunächst soll daher an dieser Stelle der erwartete Verlauf einer Distanzverteilung, bei der die Distanzen zwischen allen Punkten berechnet werden und deren zugrundeliegende Struktur nicht zufallsverteilt ist, besprochen werden. In der Distanzverteilung lassen sich zwei Bereiche unterscheiden: einerseits den vorderen Bereich von 0 nm bis zu einer bestimmten Distanz D (bei Chromatinstrukturen in der Regel ca. 100 nm), in dem sich ein lokales Maximum befindet, und andererseits die Distanzen, die größer als D sind und einen linearen Zusammenhang zwischen Distanz und auftretender Häufigkeit haben. Der sich ab ca. der Distanz D ergebende lineare Zusammenhang war zu erwarten. Diese Distanzverteilungen stellen alle Abstände zu allen Punkte dar. Wenn nun zu einem Punkt P die Distanzverteilung bestimmt wird, dann besagt diese Verteilung, dass auf einer Kreisschale mit dem Radius R und der Dicke ΔR um diesen Punkt eine bestimmte Anzahl Punkte N liegt. Wird nun der Radius R größer, so steigt auch die Anzahl der darin befindlichen Punkte, da bei größer werdendem Radius R auch die Fläche der Kreisschale steigt. Bei einer gänzlich homogenen Verteilung der zugrundeliegenden Punkte würde ein linearer Zusammenhang über die ganze Verteilung gefunden werden. Punktverteilungen, die eine charakteristische Distanzverteilung haben, gehen trotzdem ab einer bestimmten Distanz D in einen linearen Zusammenhang über, da dann der Effekt durch die größer werdenden Kreisschalen die charakteristische Verteilung überdeckt. Damit ist es naheliegend, bei dieser Anwendung der Distanzverteilung den vorderen Teil bis zur Distanz D der Verteilung zu betrachten.

Die Position des Maximums im Bereich bis zur Distanz D der Distanzverteilung, das unter Zuhilfenahme von Anpassungsfunktionen bestimmt werden kann, stellt die charakteristische Distanz der Struktur dar. Somit können mit diesen Distanzverteilungen kleine Strukturänderungen mit Hilfe dieser charakteristischen Distanzen sichtbar gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit spielen Distanzverteilungen eine erhebliche Rolle. Stets gehen Filterung und Normierung der zugrundeliegenden Daten allen weiteren Auswerteschritten voraus (siehe dazu auch Abschnitt 5.2). Die große Anzahl von durchzuführenden Distanzanalysen und zu überprüfenden Datensätzen erforderte es, automatisierte und teilautomatisierte Analyseverfahren zu entwickeln. Logarithmische Normalverteilungen wurden als Anpassungsfunktionen verwendet, wobei stets auch die Qualität der Anpassung überprüft wurde und Datensätze, die nur schlecht zu der Anpassungsfunktion passten, nochmals separat überprüft wurden. In Zwischenschritten konnten so die Resultate stets überprüft werden und Fehler, die durch das Verfahren bedingt sind, erkannt und optimiert werden. Erst die so gewonnenen Resultate haben eine Interpretation der Daten ermöglicht.

Neben diesem grundlegenden Ansatz, die Distanzen zwischen allen Punkten zu bestimmen, wurden drei weitere, speziellere Ansätze im Rahmen dieser Arbeit

verwendet:

1. Die Bestimmung der Distanz zum nächstgelegenen Punkt bzw. zu einer bestimmten Anzahl nächstgelegener Punkte: dies ist ein Ansatz für Strukturen, die charakteristische Distanzen aufweisen und die in clusterähnlichen Strukturen auftauchen. Die Distanzen zu den nächstgelegenen Punkten zu bestimmen, erlaubt Informationen über diese clusterähnlichen Strukturen zu gewinnen. Allerdings muss beachtet werden, dass, im Gegensatz zur Untersuchung der Distanzen zwischen allen Punkte, die Suche nach einer bestimmten Anzahl von nächstgelegenen Punkten keine parameterfreie Analyse mehr ist. Der vorzugebende Parameter, wie viele nächstgelegene Punkte in die Analyse integriert werden sollen, kann das Ergebnis beeinflussen, somit muss stets bedacht werden, ob die gewählte Anzahl von nächstgelegenen Punkten für die entsprechende Analyse angemessen ist.
2. Mit Hilfe von Clustererkennungsprogrammen können Punkte erkannt werden, die bestimmten Clusterparametern genügen (siehe dazu auch Abschnitt 5.3). Innerhalb dieser Cluster können nun die Distanzverteilungen untersucht werden, um z. B. zu überprüfen, ob innerhalb der Cluster charakteristische Distanzen auftreten und ob sich diese ggf. von der Gesamtdistanzverteilung unterscheiden.
3. Die Bestimmung von Distanzen von festgelegten Stützpunkten aus: Bei den bisher genannten Distanzverteilungen werden die Distanzberechnungen von allen Punkten aus durchgeführt. Es kann angebracht sein nur bestimmte Punkte als Ausgangspunkte einer Distanzanalyse zu verwenden. Dies können z. B. Punkte mit besonders hoher Dichte sein oder auch Punkte an denen bestimmte Proteine auftauchen (siehe dazu auch Abschnitt 5.7).

5.5 Dichteanalyse

Für eine Dichteanalyse wird für jeden Punkt die lokale Dichte bestimmt. Dazu wird in einem bestimmten Radius r um den Punkt P_i die Anzahl der weiteren Punkte N_i bestimmt. Dieser Wert entspricht dann der Dichte an dem Punkt P_i (siehe dazu auch Abbildung 5.5).

Dieses Verfahren wird von dem festzulegenden Radius r stark beeinflusst. Dies lässt sich illustrieren durch Betrachtung der Grenzfälle: Bei einem Wert von r , der der Größe des Zellkerns entspricht, ist der Dichtewert über den ganzen Zellkern konstant. Wird er auf einen zu kleinen Wert festgelegt, so ist die Dichte Null. In beiden Fällen kann aus den Werten keine Information gewonnen werden. In dieser Arbeit werden Dichteanalysen nur eingeschränkt eingesetzt und durch Distanzverteilungen ersetzt.

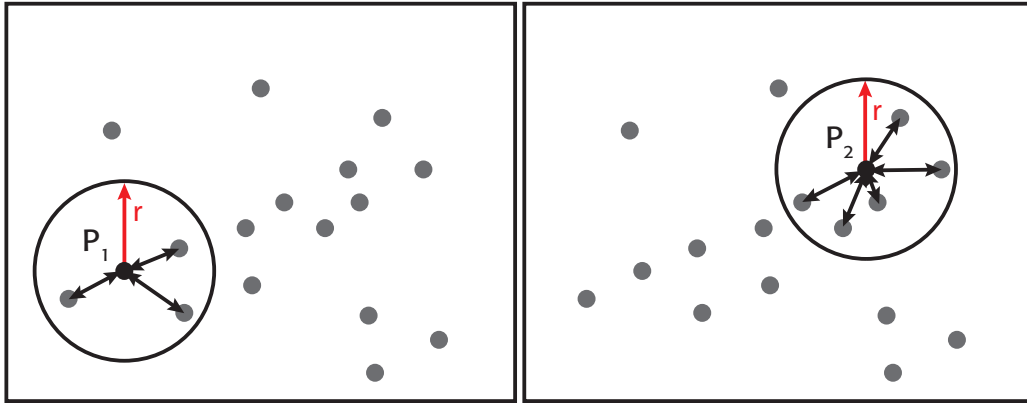


Abbildung 5.5: Dichtebestimmung. Um jeden Punkt wird in einem bestimmten Radius r die Anzahl der umliegenden Punkte bestimmt. Dieser Wert entspricht der Dichte an diesem Punkt. Schematisch dargestellt für zwei Punkte. $Dichte(P_1) = 3$, $Dichte(P_2) = 5$.

5.6 Bewertung der Güte von Daten

In Abschnitt 5.1 wurde bereits auf mögliche Inhomogenitäten der Fluoreszenz hingewiesen und in Abschnitt 5.2 wurde ein Normierungsverfahren von Lokalisationsdaten beschrieben, das für die quantitative Auswertung unumgänglich ist. Aber trotz Filterungen, Normierungen und optimierter Markierungsverfahren (siehe dazu auch die Abschnitte 4 und 5.2) bedürfen die Mikroskopdaten einer Bewertung, bevor sie für weitere Analysen verwendet werden können.

Ein typisches Experiment besteht aus mehreren Messreihen, die ihrerseits wieder aus einer gewissen Anzahl von aufgenommenen Zellkernen bestehen. Die Aufnahme eines Zellkerns benötigt ca. 10 min, eine Messreihe bedarf ca. 10 h Mikroskopzeit. Die zu einem Experiment gehörigen Messreihen aufzunehmen, dauert daher mehrere Tage. Daher musste geprüft werden, ob die äußeren Bedingungen einen Einfluss auf die Resultate haben.

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass der Einfluss der äußeren Faktoren auf die Resultate erheblich sein kann. Die kalt gelagerten Präparate müssen, wie das ganze Mikroskopsystem auch, durch einige Vorabmessungen, deren Daten verworfen werden, an die Raumtemperatur angepasst werden. Dieser Vorgang dauert ca. eine Stunde. Innerhalb dieses Zeitraums erwärmt sich das Präparat auf Raumtemperatur, aber auch einige Komponenten des Mikroskopsystems erwärmen sich und es entsteht ein Temperaturgleichgewicht zwischen den sich erwärmenden Komponenten und der vorhandenen Wasserkühlung. Ohne diese Wartezeit zeigen sich während der Messung, die pro Zellkern ca. 10 min dauert, erhebliche Verschiebungen (d. h. der aufzunehmende Bereich bewegt sich in alle Raumrichtungen) und machen die Daten somit unbrauchbar. Nach einer Stunde Anpassungszeit sind diese Verschiebungen nicht mehr wahrnehmbar.

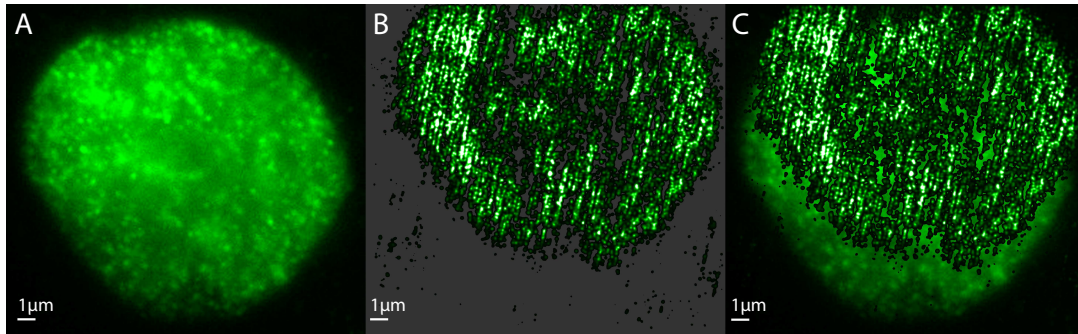


Abbildung 5.6: Darstellung einer Fehlmessung. A: Übersichtsbild einer Zelle. B: Dichtebild derselben Zelle (Parameter zur Dichtebilderstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm). C: Überlagerung aus A und B. Die Lokisationsaufnahme wurde durch äußere Einflüsse gestört. Diese sind häufig nicht wahrnehmbar, aber können offensichtlich einen erheblichen Einfluss auf die Lokisationsaufnahme haben.

Durch Raumklimatisierung und Abgeschlossenheit des Mikroskopsystems werden Einflüsse der Außentemperatur gut kompensiert.

Diese Maßnahmen und die dadurch bedingten gleichbleibenden Resultate ermöglichen es, fehlerhafte Messungen leicht zu identifizieren, da diese sich erheblich von den erwarteten Aufnahmen abheben. Vielerlei Gründe können zu solchen Fehlmessungen führen. Z. B. können Lufteinschlüsse im Einbettmedium zu Drifts führen, bestimmte Vibrationen können auch durch den schwingungsgedämpften Tisch, auf dem das Mikroskop aufgebaut ist, nicht kompensiert werden, an bestimmten Zellen können bestimmte Schritte der Präparation nicht funktioniert haben, z. B. die Permeabilisierung der Membranen, sodass der Fluoreszenzfarbstoff die Zellkernmembran nicht überwinden konnte usw. Diese Messungen können anhand der erstellten Dichtebilder und Übersichtsbilder identifiziert und aussortiert werden. Abbildung 5.6 zeigt ein Beispiel einer offensichtlichen Fehlmessung. Darüber hinaus sind (halb)automatische Verfahren etabliert worden, die ganze Experimente analysieren, einen Überblick über die Ergebnisse ermöglichen und so die Bewertung der Güte der Daten möglich machen. Diese ausgegebenen Diagramme informieren den Anwender über die Anzahl der gemessenen Blinkereignisse pro Zelle und pro Messreihe, sodass sofort entschieden werden kann, ob eine Normierung der Daten möglich ist und auf welchen Wert sie passieren muss. Darüber hinaus werden Übersichten der charakteristischen Distanzen (siehe dazu auch Abschnitt 5.4) sowie Dichte- und Standardbilder (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4) erstellt. Deutliche Abweichungen der charakteristischen Distanz oder der Anzahl der Blinkereignisse einzelner Zellen vom Mittelwert sind ein Indikator auf Unstimmigkeiten und sollte zur Prüfung der Aufnahme führen. Eine detailliertere Beschreibung der hierfür verwendeten Diagramme befindet sich in Abschnitt 6.1.

Da im weiteren Verlauf der Analyse (halb)automatisiert Mittelwerte gebildet

werden und Daten zusammengefasst werden, ist das Aussortieren von offensichtlich fehlerhaften Messwerten notwendig, da sie sonst die Resultate beeinflussen würden. Die Bewertung der Güte der Messdaten ist daher stets der erste Schritt der Analyse, bevor es zu Filterungen, Normierungen und weiteren Auswertungen kommen kann.

5.7 Mehrkanalanalyse

Die Fluoreszenzmarkierung von mehreren Strukturen eines Zellkerns mit Fluorophoren, die mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen angeregt werden, ermöglicht es, diese Strukturen miteinander zu vergleichen und abhängig voneinander auszuwerten. Diese Experimente werden als Mehrkanalexperimente bezeichnet. So ist es beispielsweise möglich, zu überprüfen, ob bestimmte Doppelstrangbruch-Reparaturproteine mit γ H2AX (siehe Abschnitt 2.2.4) assoziiert sind, und somit können Annahmen getroffen werden, welche Art der Doppelstrangbruch-Reparatur angewendet wird [74] (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4).

Abhängig vom Mikroskopsystem müssen die Methoden der Überlagerungsanalyse angepasst werden. Konventionelle Mikroskopsysteme sind auf eine Genauigkeit von ca. 200 nm beschränkt, sodass auch die Überlagerungsanalyse dieser Einschränkung unterliegt. Wie schon beschrieben ergibt konventionelle Mikroskopie ein Bild, auf dem die einzelnen Fluorophore nicht erkennbar sind, sondern als Überlagerung der PSFs (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.2) dargestellt werden. Somit hat das aufgenommene Fluoreszenzsignal bei dieser Mikroskopie immer eine gewisse Ausdehnung und ist nicht punktförmig. Eine Überlagerungsanalyse vergleicht daher die einzelnen Pixel von zwei zusammengehörenden Mikroskopbildern. Der Vergleich unterliegt dann ebenso der Genauigkeitsbeschränkung von 200 nm.

Im Gegensatz dazu liefert Lokalisationsmikroskopie (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.5) die Koordinaten der Fluorophore mit einer Genauigkeit im Bereich von einigen Nanometern und ist damit dem idealen punktförmigen Signal sehr nah. Die nanometerpräzise Wiedergabe der Fluorophorpositionen mit Lokalisationsmikroskopie macht zwar eine deutlich genauere Untersuchung der Strukturen möglich, aber auch einen neuen Ansatz der Kolo-kalisation nötig, da nicht einfachhin überprüft werden kann, ob zwei Fluorophore dieselbe Position haben (so wie zwei Pixel eines konventionellen Mikroskopbildes verglichen werden können). Die Positionsbestimmung ist nanometergenau, aber unterliegt trotzdem gewissen Ungenauigkeiten, die durch die verwendeten Methoden begründet sind (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.3). Somit ist es nicht sicher, dass zwei Fluorophore (auch wenn Sie die exakt gleiche Position hätten) im Verlauf der Positionsbestimmung die gleichen Koordinaten zugeordnet bekommen. Einen viel erheblicheren Einfluss hat, dass die Fluorophore der unterschiedlichen Kanäle unterschiedliche Markierungsziele haben. Es ist daher unwahrscheinlich, dass sie exakt die gleiche Position einnehmen. Die Genauigkeitsbegrenzung von 200 nm bei konventioneller

Mikroskopie macht solche Überlegungen unnötig. Bei Lokalisationmikroskopie müssen sie beachtet werden und somit ergeben sich zwei mögliche Kriterien, wann zwei Fluorophore kolokalisieren. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit in Auswerteprogrammen umgesetzt.

1. Bei der ersten Methode wird der Abstand eines Fluorophores des ersten Kanals zum nächstgelegenen Fluorophor des zweiten Kanals berechnet. Ist dieser Abstand kleiner als ein vorgegebener Schwellwert, so werden diese beiden Fluorophore als kolokalisierend bezeichnet. Der Ansatz ist präzise und nutzt die maximal mögliche Auflösung bei der Suche nach Kolokalisation.
2. Eine weitere Möglichkeit, die deutlich weniger rechenaufwendig ist und besonders für die Erstellung von Bildern geeignet ist, legt ein Raster über ein Dichtebild (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4), das eine bestimmte Rastergröße hat, und berechnet innerhalb jedes Rasterelements die mittlere Dichte. Wenn diese mittlere Dichte in zueinandergehörenden Rasterelementen der aufgenommenen Kanäle größer Null ist, so gelten alle Punkte innerhalb dieses Rasterelements als kolokalisierende Punkte.

Die Möglichkeiten der Lokisationsmikroskopie bei der Analyse von mehrkanaligen Mikroskopaufnahmen beschränkt sich aber nicht nur darauf, zu ermitteln, inwieweit Kolokalisation vorliegt. Proteine können in Kombination mit anderen auftreten, allerdings beschränkt die Genauigkeit der konventionellen Mikroskopie die Analyse dieser Zusammenhänge. Unter Benutzung von Lokisationsmikroskopie kann untersucht werden, welche charakteristischen Abstände Proteine zueinander haben, ob sie kolokalisieren oder nur in unmittelbarer Nachbarschaft auftauchen usf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck Cluster- und Distanzanalysen (siehe dazu auch Abschnitt 5.3 und 5.4) kombiniert, da zahlreiche Proteine im Zellkern clusterförmige Ansammlungen bilden (z. B. γ H2AX, siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4) und die Frage interessant ist, inwieweit diese clusterförmigen Ansammlungen mit anderen Proteinen assoziiert sind (d. h. ob sie kolokalisieren, in einem bestimmten Abstand von diesen auftauchen usf.) und inwieweit diese Strukturen sich gegenseitig beeinflussen. Mit Hilfe des DBSCAN und der Gaußschen Trapezformel lassen sich Fläche und Schwerpunkt sowie weitere relevante Informationen der polygonförmigen Cluster bestimmen (siehe dazu auch Abschnitt 5.3). Die Schwerpunkte der Cluster von Protein *A* können nun als Ausgangspunkt für eine Distanz- und Dichteanalyse verwendet werden, um die Dichte von Protein *B* in Abhängigkeit vom Abstand zum Schwerpunkt zu analysieren. Diese Analyse soll umgehen, dass Distanzanalysen sich ab einer bestimmten Distanz stets einem linearen Verlauf annähern, wie in Abschnitt 5.4 beschrieben. Dazu werden um die Schwerpunkte äquidistante Kreisschalen angenommen und es wird bestimmt, wie viele Punkte sich in jeder Schale befinden. Mit Hilfe des Flächeninhalts der Kreisschalen ist es nun möglich, die mittlere

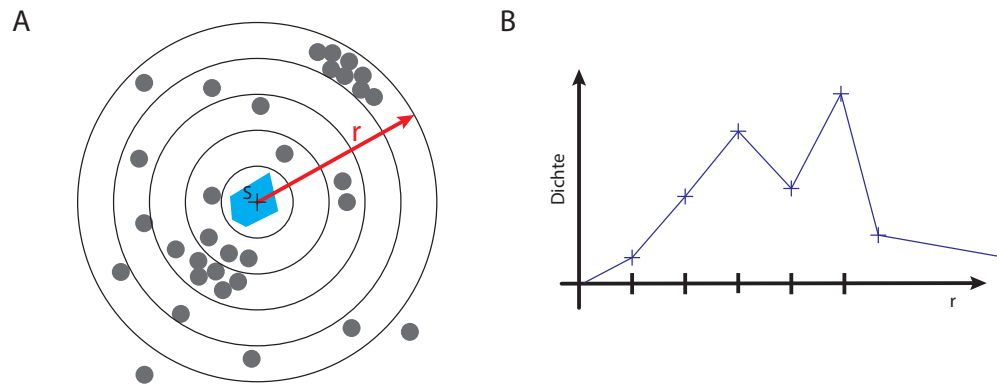


Abbildung 5.7: Mehrkanalanalyse. A: Schematisch dargestellt ein Ausschnitt aus einem Zellkern. Das blaue Polygon ist das durch den DBSCAN erkannte Cluster von Protein A. Das mit „S“ markierte „+“ markiert den Schwerpunkt des Clusters. Um diesen Schwerpunkt werden nun Kreisschalen mit konstanter Ausdehnung analysiert. Innerhalb dieser Kreisschalen werden die auftretenden Punkte von Protein B (graue Punkte) bestimmt und entsprechend der Fläche der Kreisschale wird die Dichte berechnet. B: Schematische Darstellung der zu A gehörenden Dichteverteilung.

Dichte von Protein B innerhalb der Kreisschalen zu berechnen, anstatt der absoluten Anzahl der auftauchenden Distanzen. Die Dichte folgt dann ab einer bestimmten Distanz nicht mehr methodisch bedingt einem linearen Anstieg und erlaubt eine Analyse der Verteilung von Protein B um die Cluster von Protein A.

Eine schematische Darstellung des Verfahrens befindet sich in Abbildung 5.7. Diese Funktionen wurden in standardisierte und automatisierte Analyseverfahren integriert, die Informationen zu einzelnen Clustern und der angesprochenen Dichteverteilung ausgeben, sowie entsprechende Mittelwerte berechnen.

Somit ist es möglich, nicht nur zu untersuchen, inwieweit zwei Strukturen sich überlagern, sondern auch, ob charakteristische Abstände zueinander existieren und welche Werte diese annehmen. Diese Verfahren wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um die Verteilung von Heterochromatin (Abschnitt 2.2.3.2) um das Histon γ H2AX (Abschnitt 2.2.4) und die DNA-Sequenz Alu (Abschnitt 2.2.5) zu untersuchen. Die entsprechenden Resultate finden sich in den Abschnitten 7.3.5 und 7.3.6.

5.8 Topologische Datenauswertung

Die in Abschnitt 5.4 und 5.7 vorgestellten Methoden stellen eine erhebliche Verbesserung der vorhandenen Auswertesysteme für Lokalisationsmikroskopie dar. Die Anwendungsgebiete für Distanzanalysen und Mehrkanalanalysen sind vielfältig und können auf zahlreiche biologische Fragestellungen angewendet werden. In Kapitel 7 werden Resultate, die mit den verschiedenen Methoden

gewonnen wurden, gezeigt. Trotzdem reizen auch diese das Potential von Lokalisationsmikroskopie noch nicht völlig aus.

Der Heterochromatinverteilung im Zellkern (z.B.) liegt eine Struktur zugrunde, über die bisher nicht viel bekannt ist. Es herrscht Einigkeit darüber, dass Heterochromatin nicht einfach willkürlich im Zellkern verteilt ist [119, 120], und es wird berechtigterweise angenommen, dass es auf mehreren Größenskalen organisiert ist.

Es existieren verschiedene Modelle und Theorien zur Organisation des Genoms im Zellkern, z.B. zur Anordnung der Nukleosomen in einer angenommen, aber noch nicht bestätigten 30 nm-Anordnung [40]. Zur Organisation auf größeren Skalen ($\approx 1 \mu\text{m}$) existieren Modelle zu Chromosomterritorien und Ansätze zu ihrem inneren Aufbau [6]. Aufgrund der zu geringen Differenziertheit der Modelle können die hier gewonnenen Daten nicht mit den Modellen verglichen werden und somit ist es schwierig, der gemessenen Struktur bestimmte Charakteristika zuzuordnen. Würde z.B. ein fiktives „Netzmodell“ angenommen werden, so könnten den Lokalisationsdaten Charakteristika wie die Maschengröße des Netzes, die Anzahl der Knoten usw. entnommen werden. Diese Charakteristika würden dann einen Vergleich zwischen einzelnen Aufnahmen und Messreihen erlauben.

Wie erwähnt, existiert kein zellkernglobales Modell, das detailliert genug ist, um es mit Lokalisationsdaten zu vergleichen. Hier soll nun eine Methode vorgestellt werden, die auch ohne ein zugrundeliegendes Modell Charakteristika der Struktur bestimmen kann und somit den gewünschten Vergleich zwischen einzelnen Messungen und Messreihen ermöglicht.

Distanzverteilungen (siehe dazu auch Abschnitt 5.4) sind ein Ansatz, um hochauflösende Mikroskopie zur Analyse der Genomarchitektur zu nutzen. Der Verlauf der Distanzverteilung und die ggf. auftretenden Maxima machen eine gewisse Quantifizierung der zugrundeliegenden Struktur möglich. Wie in Abschnitt 5.4 vorgestellt überlagern sich in Distanzverteilungen mehrere Verteilungen, die es ggf. unmöglich machen, diesen bestimmte Informationen zu entnehmen. Z. B. lassen die Distanzverteilungen es zu, die charakteristische Distanz auf kleinen Skalen (ca. 50 nm) zu bestimmen, allerdings können die Organisationsebenen auf größeren Skalen methodisch bedingt nicht sichtbar gemacht werden (detailliertere Beschreibungen finden sich in Abschnitt 5.4). Distanzanalysen können somit nur einen Teilaspekt der Struktur charakterisieren, aber zeigen gleichzeitig, dass mit Lokalisationsmikroskopie eine Analyse im Nanometerbereich möglich ist.

Idealerweise könnten einer mikroskopisch analysierten Struktur ihre Charakteristika (charakteristische Distanzverteilungen, Dichteverteilungen usw.) auf allen Organisationsebenen entnommen werden. Es soll dabei einerseits die mittlerweile erreichbare Nanometergenauigkeit verwendet werden, aber dabei nicht die Organisation des Genoms auf Größenskalen im Mikrometerbereich vernachlässigt werden. Dies würde den Vergleich zwischen einzelnen Zellkernen ermöglichen, ohne dass ein ausreichend detailliertes Modell vorhanden ist.

Der hier vorzustellende Ansatz kann auf allen Größenskalen eingesetzt werden, da er ohne die Eingabe von Parametern funktioniert, und integriert implizit Dich-

teverteilung und Distanzverteilungen. Er erlaubt außerdem eine Quantifizierung der Struktur, ohne ein Modell zugrunde legen zu müssen.

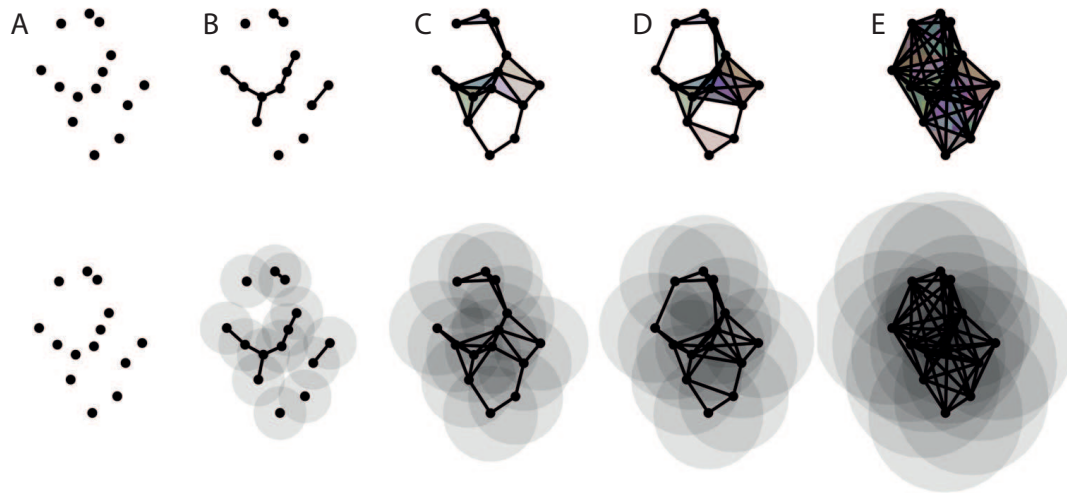


Abbildung 5.8: Komplexbildung in Abhängigkeit von α . In der unteren Zeile sind die Punkte mit ihren α -Umgebungen gezeigt, in der oberen die resultierenden Komplexe. A: Der Wert von α ist sehr klein, d.h. in keiner α -Umgebung liegen weitere Punkte, daher werden keine Punkte zu Linien verbunden. B: In den α -Umgebungen der Punkte liegen weitere Punkte, die zu Linien verbunden werden. C: Bei steigendem Wert von α werden weitere Punkte verbunden. Befinden sich gleichzeitig drei Punkte in einer α -Umgebung, entsteht ein Dreieck. Darüber hinaus entstehen „ungefüllte“ Einschlüsse, d.h. Löcher. D: Mit steigendem Wert von α werden die Löcher durch weitere Dreiecke gefüllt. E: Ab einem bestimmten Wert von α sind alle Punkte zu Dreiecken verbunden und damit keine Löcher mehr vorhanden (Abbildung aus [121]).

Bei der Strukturanalyse von Punktdaten kann es hilfreich sein, die Punkte zu Komplexen zu verbinden und diese Komplexe zu analysieren [122]. Abbildung 5.8 zeigt ein Objekt und die Punktstruktur, die es bildet. Dieses Objekt soll hier nun einen Zellkern und die Punkte sollen eine Lokalisationsaufnahme seiner Chromatinstruktur repräsentieren. Die Komplexbildung kann mithilfe eines alle Längenskalen aufsteigend durchlaufenden Parameters α motiviert werden. Ein um jeden Punkt gebildeter Kreis mit dem Radius α entspricht seiner α -Umgebung. Wenn ein Punkt innerhalb einer α -Umgebung eines anderen Punktes liegt, dann werden die beiden Punkte durch eine Linie verbunden. Die zuvor voneinander unabhängigen Punkte (oder abstrakter Komponenten) werden zu einer Komponente „Linie“ vereinigt. Liegen drei Punkte in einer α -Umgebung, dann werden diese zu einem Dreieck verbunden. Es entsteht also aus drei Komponenten (drei Punkten) bzw. zwei Komponenten (einer Linie und einem Punkt) eine Komponente (ein Dreieck).

Bei steigendem Wert von α werden immer weitere vorher getrennte Komponenten vereinigt. Die Anzahl an Komponenten, die voneinander unabhängig sind, nimmt ab und es entsteht ein wachsender Komplex aus Linien und Dreiecken, was in Abbildung 5.8 dargestellt wird. Dieser Prozess erlaubt es, die sich als Funktion des Radius α ändernde Anzahl an Komponenten zu verfolgen. Zuerst ist jeder einzelne Punkt eine separate Komponente und zuletzt existiert bei einem ausreichend großen Wert von α nur noch eine Komponente. Im Verlauf dieses Wachstumsprozesses entstehen topologisch interessante Einschlüsse in der Komplexstruktur, die als Löcher gelten. Die Anzahl an Komponenten und Löchern kann für einen festen Wert von α bestimmt werden.

Welcher Wert von α ist geeignet für die Analyse der Genomstruktur? Bei einem zu kleinen Wert werden nur wenige Punkte zu Linien und Dreiecken verbunden, aber bei einem zu groß gewählten werden alle Punkte zu einer Komponente verbunden. In beiden Fällen kann keine Information über die Struktur gewonnen werden. (Ein ähnliches Problem wurde bereits bei der Dichteanalyse (siehe dazu Abschnitt 5.5) vorgestellt.) Einen idealen Wert von α für die Auswertung zu finden, ist demnach schwierig und die Analyse bei einem festen Wert von α wird der Aufgabe, die Struktur zu analysieren, nicht gerecht. Demnach ist schon die Frage nach einem festen α für die Analyse einer komplexen Struktur wie der Chromatinstruktur eine ungeeignete Frage.

In [122] wird ein Ansatz vorgestellt, wie sich alle Komponenten und Löcher kompakt zusammenfassen lassen. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht es, durch die Repräsentation als „Barcodes“ das Entstehen und Verschwinden der Komponenten und Löcher bei steigendem Wert von α und damit unabhängig von einem fest gewählten Wert von α zu verfolgen. Beispielhaft ist dies in Abbildung 5.9 gezeigt. Der Beginn einer Linie in der Barcode-Darstellung zeigt, bei welchem α die Komponente bzw. das Loch entstanden ist, und das Ende der Linie, für welchen Wert von α diese bzw. dieses wieder verschwunden ist als Folge der Vereinigung zu einer größeren Komponente. Alle grünen Balken beginnen bei Null, da bei einem Wert von $\alpha = 0$ alle Punkte unverbunden sind, d.h. jeder eine eigene Komponente darstellt. Wurden nun zwei Punkte zu einer Linie (bzw. drei Punkte zu einem Dreieck) verbunden, dann sind die beiden (bzw. drei) Punkte in der neu entstandenen Komponente „Linie“ (bzw. „Dreieck“) vereinigt worden und daher endet der zugehörige grüne Balken. Durch das weitere Verbinden von Punkten bei steigendem Wert von α entstehen die in Abbildung 5.9 gezeigten Linien, Dreiecke und Löcher. Die Lebenszeit eines Loches wird in Abbildung 5.9 durch rote Balken repräsentiert. Der Balken beginnt, wenn das Loch entsteht, und endet, wenn es gänzlich ausgefüllt wird.

Der Barcode stellt somit ein Abbild der untersuchten Struktur auf allen Größenskalen dar. Das Entstehen und Vergehen kleiner Komplexe wird genauso repräsentiert wie das Entstehen und Vergehen großer Komplexe. Die beispielhafte Darstellung umfasst hier aus Gründen der Übersichtlichkeit 14 Punkte. Der gleiche Ansatz und die gleiche Darstellung können aber auch für Strukturen verwendet werden, die tausende von Punkten enthalten. Im Falle der Chroma-

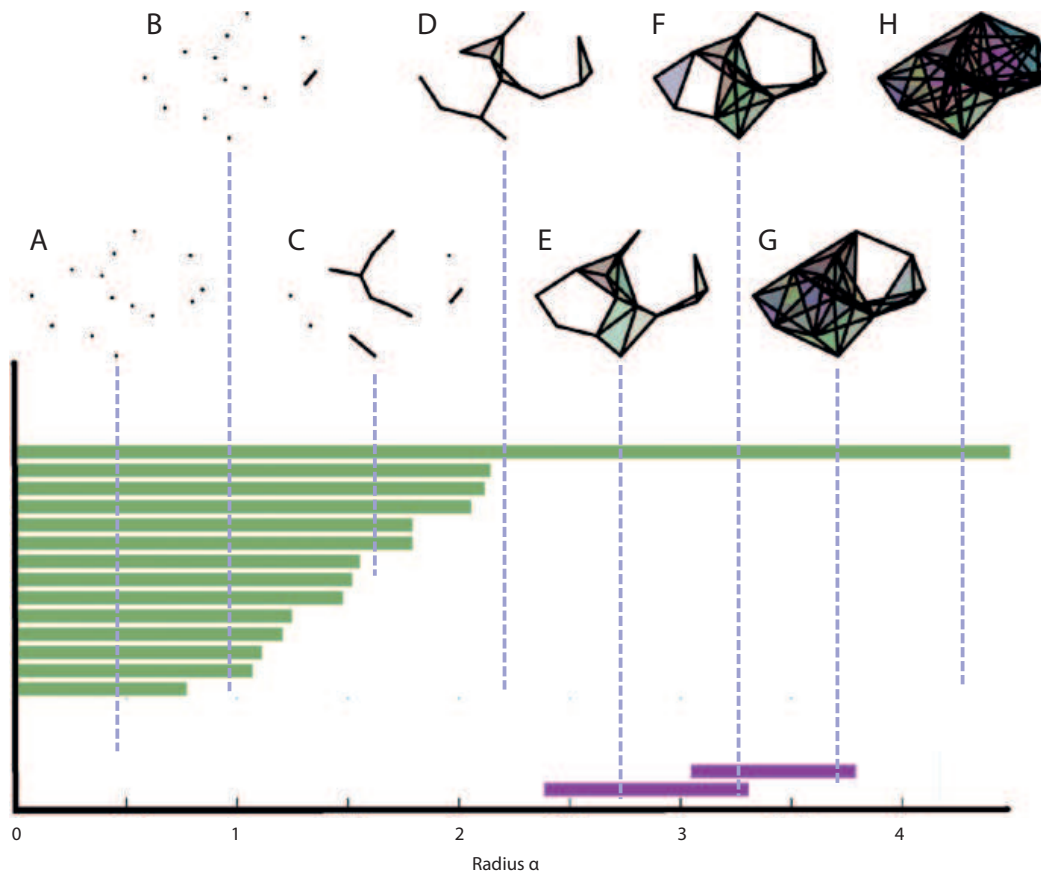


Abbildung 5.9: Bildung eines Barcodes aus einer Punktstruktur. Das Diagramm im unteren Bereich zeigt die Barcodedarstellung mit α auf der x-Achse aufgetragen. Der Beginn der grünen bzw. roten Balken charakterisiert den Wert von α , bei dem die Komponente bzw. das Loch entsteht, das Ende des Balkens, wenn sie bzw. es untergeht. Das zu den Bildern A-H gehörende α wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. A: Bei dem vorgegebenen α sind keine Punkte zu Linien verbunden, daher endet an der zu A gehörenden gestrichelten Linie kein Balken. B: Eine Linie ist entstanden und somit ist vor der zu B gehörenden gestrichelten Linie ein Balken geendet. C: Mehr Punkte werden verbunden, daher enden mehr der grünen Balken. D: Nun sind alle Punkte zu einer Komponente verbunden, daher ist nur noch ein grüner Balken vorhanden. E, F: Zwischen dem zu D und zu F gehörenden α entstehen Löcher, die durch die roten Balken repräsentiert werden. G: Eines der Löcher wurde gefüllt und daher endete der entsprechende rote Balken. H: Alle Punkte sind zu einer Komponente zusammengeschlossen. (Abbildung aus [121]).

tinstruktur würde der Barcode Informationen über Komponenten und Löcher sowohl im Bereich weniger Nanometer als auch im Mikrometerbereich enthalten. Diese kompakte und anschauliche Form der Darstellung erlaubt es nun außerdem, ausschließlich bestimmte Substrukturen zu betrachten, z.B. alle Komponenten und Löcher, die im Bereich von α_1 bis α_2 gebildet werden und wieder untergehen.

Wie dargestellt eröffnet die Charakterisierung einer Punktstruktur durch Barcodes neue Möglichkeiten. Allerdings wird dabei eine komplexe Darstellung (Punktverteilung) durch eine andere komplexe Darstellung (Barcode) ersetzt. Der zu einer Punktverteilung aus tausenden von Punkten gehörende Barcode ist ähnlich unübersichtlich wie die zugehörige Punktdarstellung selbst. Allerdings entsteht durch die Möglichkeit, Barcodes miteinander zu vergleichen und Parameter für die Ähnlichkeit dieser zu definieren, ein signifikanter Fortschritt für die Analyse von Punktstrukturen.

In [121] wird ein Ansatz, der als Maß für die Ähnlichkeit S von Barcodes genutzt werden kann, vorgestellt. Die Ähnlichkeit von zwei Barcodes A und B mit den zugehörigen Balken a und b wird dann dargestellt durch:

$$S(A, B) = \frac{1}{|A| + |B|} \left[\underbrace{\sum_{a \in A} \underbrace{\sup_{b \in B} \frac{|a \cap b|}{|a \cup b|}}_C}_{C'} + \underbrace{\sum_{b \in B} \underbrace{\sup_{a \in A} \frac{|a \cap b|}{|a \cup b|}}_D}_{D'} \right] \quad (5.1)$$

$J(a, b) = \frac{|a \cap b|}{|a \cup b|}$ stellt den Jaccard-Index [123] dar, welcher als Maß für die Ähnlichkeit zweier Balken angesehen werden kann. Anschaulich besagt der Jaccard-Index inwieweit zwei Balken sich überlagern. Das Ergebnis ist ein Wert zwischen 0 und 1, wobei 0 für gar keine Überlagerung steht und 1 für zwei identische Balken.

Der in Gleichung (5.1) mit C markierte Teil sagt aus, dass zu einem Balken a der Balken b gesucht wird, bei dem der Jaccard-Index $J(a, b)$ maximal wird. Dies wird für jedes a wiederholt und die Summe gebildet (siehe C').

Dies wird ebenso für die andere Richtung durchgeführt. In D wird zu jedem Balken b der entsprechende Balken a gesucht, sodass der Jaccard-Index $J(a, b)$ maximal wird. Auch hier werden die Ergebnisse für die einzelnen Balken b aufsummiert (siehe D').

Die beiden Summen C' und D' werden nun addiert und durch die Anzahl der Balken in beiden Barcodes ($= |A| + |B|$) dividiert. Die Division führt dazu, dass auch das Ähnlichkeitsmaß $S(A, B)$ wie der Jaccard-Index $J(a, b)$ einen Wertebereich zwischen 0 und 1 hat. $S(A, B) = 1$ besagt, dass sowohl zu jedem Balken aus A ein Balken in B gefunden wurde, als auch zu jedem Balken aus B ein Balken in A gefunden wurde, für die gilt, dass sie identisch sind. $S(A, B) = 0$ besagt, dass zu keinem Balken aus A ein Balken aus B gefunden wurde bei dem es zu Überlagerung kommt. Eine anschauliche Beschreibung anhand von zwei Beispielbarcodes befindet sich in Abbildung 5.10.

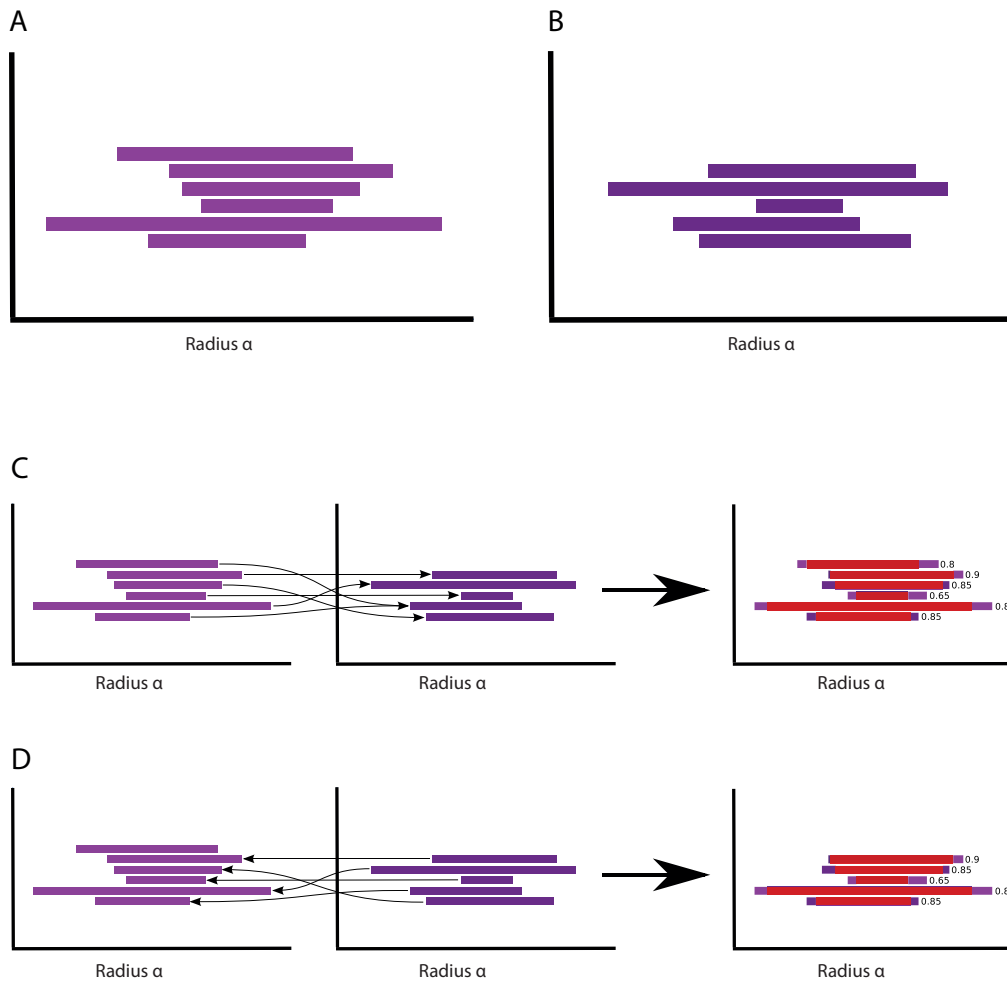


Abbildung 5.10: Barcodevergleich. Für jeden Balken aus Barcode A wird der Balken aus B gesucht, für den der Jaccard-Index maximal wird. Der Jaccard-Index repräsentiert anschaulich inwieweit zwei Balken sich überlagern. Dies wird in Gleichung (5.1) durch den mit C markierten Teil berechnet und in Abbildung 5.10 C dargestellt. Diese Werte werden für jeden Balken aus A summiert (siehe Gleichung (5.1) C'). Ebenso wird für jeden Balken aus B der Balken aus A gesucht für den der Jaccard-Index maximal wird. Dies wird in Gleichung (5.1) durch den mit D gekennzeichneten Teil repräsentiert und in Abbildung 5.10 D gezeigt. Diese Werte werden wiederum für den Balken aus B aufsummiert (siehe Gleichung (5.1) D'). Die Summe dieser beiden Teilsummen wird durch die Anzahl der Balken in beiden Barcodes dividiert. Das Ergebnis $S(A, B)$ (siehe Gleichung (5.1)) quantifiziert die Ähnlichkeit der Barcodes A und B . S kann Werte zwischen 0 (keine Ähnlichkeit) und 1 (sehr ähnlich) annehmen.

Automatisierte Auswertetoolbox

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Programme erstellt, die für die Auswertung von Lokalisationsdaten genutzt werden können. Aufgrund der großen Menge an Daten in unterschiedlichen Experimenten verfügen diese Programme neben der Möglichkeit, verschiedene Auswertelgorithmen zu verwenden (wie Cluster-, Distanzanalysen usw.) auch über Datenstrukturierungsfunktionen.

Es zeigt sich außerdem, dass Lokalisationsdaten Schwankungen unterliegen können, die bei der Auswertung berücksichtigt werden müssen (siehe dazu auch Abschnitt 5.6). Daher bieten die Programme Funktionen, die die Überprüfung der Güte von Daten erlauben.

Lokalisationsmikroskopie ist zwar ein zunehmend etabliertes Verfahren, allerdings existieren nur wenige Auswertesysteme, die die Genauigkeitsverbesserung dieser Mikroskopie für quantitative Auswertungen nutzen.

In diesem Kapitel werden getestete, überarbeitete und neu entwickelte Auswertemethoden vorgestellt und wie diese in einfach zu benutzende Programme mit grafischen Benutzeroberflächen integriert wurden.

6.1 Chromatinanalyse

Im Verlauf der verschiedenen durchgeführten Experimente entstand der Bedarf nach einer einfach zu handhabenden Auswertesoftware, die einige der entwickelten Auswertemethoden (Distanzanalyse, Dichteanalyse, Clusteranalyse usw. (siehe Abschnitt 5.3, 5.4 und 5.5)) integriert und zusätzlich entsprechende Bilder (siehe Abschnitt 3.2.4) erstellt. Dabei entstand das Programm „Chromatinanalyse“. Benötigt wurde außerdem die Möglichkeit, mehrere Messreihen miteinander zu vergleichen und Diagramme mit entsprechenden Legenden zu erhalten. Darüber

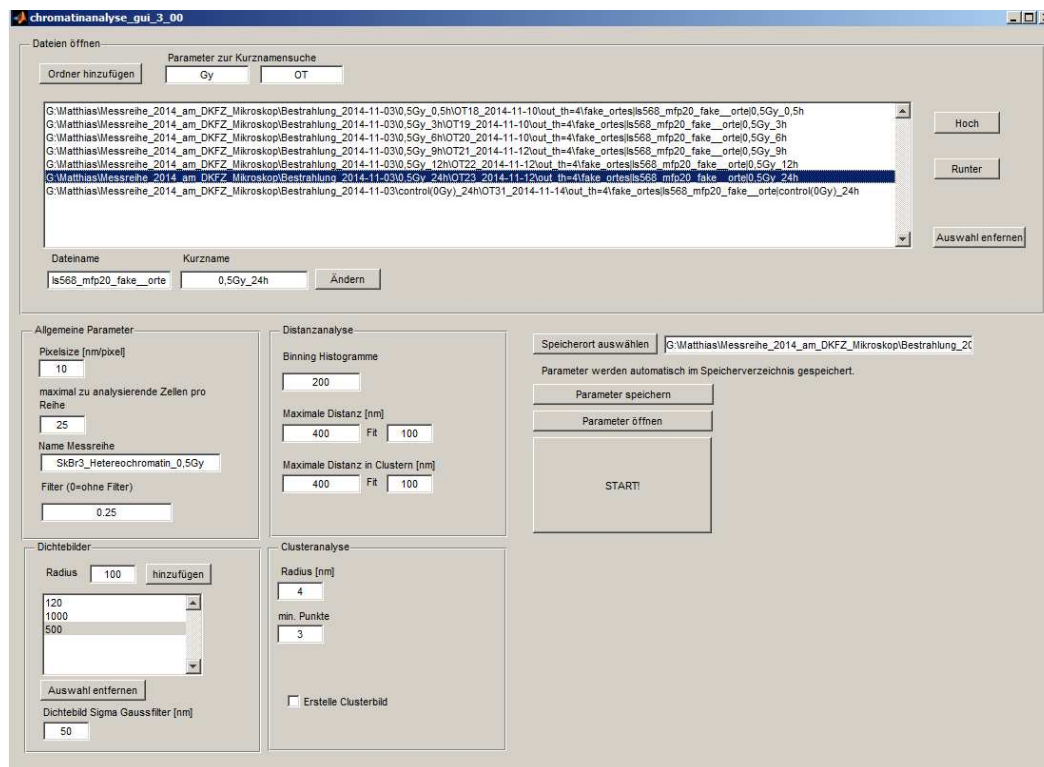


Abbildung 6.1: Grafische Benutzeroberfläche zu dem Programm „Chromatinanalyse“

hinaus wurde die in Abschnitt 5.2 vorgestellte Filtermethode in das Programm integriert. Die verschiedenen Funktionen können alle über die grafische Benutzeroberfläche gesteuert werden. Entsprechende Vergleichsdiagramme werden automatisch erzeugt. Alle Parameter für die Erstellung von Diagrammen, Bildern und Filtern können direkt in der grafische Benutzeroberfläche eingegeben werden, wobei die meisten Optionen selbsterklärend sind. Untenstehend sind alle Optionen zusammengefasst und kurz beschrieben. Abbildung 6.1 zeigt die grafische Benutzeroberfläche des Programms.

Dateien öffnen

Parameter zur Kurznamensuche: Durch „Ordner öffnen“ wird dem Nutzer die Möglichkeit, gegeben einen Datensatz dem Programm hinzuzufügen, der die zu analysierenden Koordinatenmatrizen enthält. Das Programm sucht im Pfad nach den eingegebenen Parametern und übernimmt Ordnernamen, die einen der Parameter enthalten, als Kurznamen.

Dateiname: Hier muss der Dateiname der Koordinatenmatrizen eingegeben werden. Das Format dieser Dateinamen muss immer mit einem zweistelligen Index beginnen, dann werden alle Dateien in dem

Ordner analysiert.

Kurzname: Hier kann der automatisch erkannte Kurzname geändert werden.

Allgemeine Parameter

Pixelsize [nm/px]: Die Koordinatenmatrizen der Lokisationsaufnahmen enthalten die Koordinaten mit einer Genauigkeit im Bereich einiger Nanometer. Über den Parameter „Pixelsize“ kann festgelegt werden, welche Größe in Nanometern einem Pixel bei der Bilderstellung entspricht (siehe dazu auch 3.2.4). Kleine Werte erhöhen die benötigte Berechnungszeit, bei der Eingabe zu großer Werte können Details verloren gehen. Ein guter Kompromiss sind 10 bis 20 nm/px.

maximal zu analysierende Zelle pro Reihe: Diese Zahl legt fest, bis zu welchem Index Dateien geladen werden sollen.

Name des Experiments: Der hier festgelegte Name für das Experiment taucht in jedem Diagramm auf.

Filter: Schwellwert für die Filterung der Daten. 0.25 bedeutet, dass alle Punkte verworfen werden, deren lokale Dichte kleiner als 25% der Maximaldichte ist (siehe dazu auch Abschnitt 5.5).

Dichtebilder

Radius: Radius zur Erstellung der Dichtebilder (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4)

Dichtebild Sigma Gaussfilter [nm]: Dieser Parameter wird für den Gaussfilter bei der Dichtebilderstellung benötigt (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4)

Distanzanalyse

Binning Histogramme: Klasseneinteilung bei der Erstellung der Distanzverteilungen

Maximale Distanz [nm]: maximal zu analysierende Distanz für die Distanzverteilung

Fit: maximal zu berücksichtigende Distanz für die Anpassungsfunktion in den Distanzverteilungen

Maximale Distanz in Clustern [nm]: maximal zu analysierende Distanz für die Distanzverteilung in Clustern

Fit: maximal zu berücksichtigende Distanz für die Anpassungsfunktion in den Distanzverteilungen in Clustern

Clusteranalyse

Radius [nm]: Parameter für DBSCAN (ϵ) (siehe dazu auch Abschnitt 5.4)

min. Punkte: Parameter für DBSCAN (N_{min}) (siehe dazu auch Abschnitt 5.4)

Erstelle Clusterbild: Wenn diese Option aktiviert ist, wird ein Clusterbild gespeichert.

Wie in Abschnitt 5.6 erläutert müssen Lokalisationsdaten einer Überprüfung unterzogen werden, bevor sie weiterverwendet werden können. Häufig können fehlerhafte Messungen auch an ihren Abweichungen zum Mittelwert im Hinblick auf die Distanzverteilung oder die Anzahl gemessener Blinkereignisse erkannt werden.

„Chromatinanalyse“ erstellt zu jeder Messung ein Dichtebild (Abbildung 6.2 A) (wahlweise auch mehrere mit unterschiedlichen Parametern), ein Standardbild (Abbildung 6.2 B) und ein Clusterbild (Abbildung 6.2 C) gemäß der Vorgaben (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4). Außerdem wird die Distanzverteilung (siehe Abschnitt 5.4) berechnet, eine Anpassung mit einer logarithmischen Normalverteilung versucht und bei ausreichender Qualität der Anpassung das Maximum bestimmt (Abbildung 6.4 A). Die Daten der Distanzverteilung mit der entsprechenden Anpassungsfunktion und das erstellte Diagramm werden für jede Zelle gespeichert. Eine Übersicht der gefundenen Maxima wird für jede Messreihe erstellt. (Abbildung 6.3 A zeigt beispielhaft eine solche Übersicht.) Zusätzlich werden alle gefundenen Maxima aller Messreihen nochmals in Boxplots dargestellt (Abbildung 6.3 B zeigt beispielhaft einen solchen Boxplot). Ein Boxplot ist eine Form der Darstellung, die es erlaubt, große Datenmengen im Hinblick auf Schwankungen zu untersuchen. Die Box des Plots entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Länge der Box wird Interquartilsabstand (IQR, engl. interquartile range) bezeichnet. Der Median wird als Strich eingezeichnet, der Mittelwert als Kreuz. Die gestrichelten Linien reichen vom Maximal- zum Minimalwert der Daten, wobei Werte, die um mehr als $3 \cdot IQR$ abweichen, als Ausreißer gelten und als rote Kreuze eingezeichnet werden. Tabelle 6.1 zeigt eine Übersicht der ausgegebenen Diagramme und Bilder mit Verweisen auf Abbildungsbeispiele.

Mit Hilfe dieser Diagramme (zuvorderst mit den Übersichten über Messreihen und ganze Experimente) ist überprüfbar, ob die Resultate gleichbleibend sind oder unerwartete Schwankungen auftreten. Die einzelnen Messungen lassen sich anhand der jeweils für Einzelmessungen ausgegebenen Diagramme und Bilder (Abbildung 6.2 und 6.4 A) bewerten und entscheiden, ob sie für weitere Auswertungen genutzt werden können.

Zusätzlich werden Gesamtdistanzverteilungen (siehe Abbildung 6.4 B) für jede Messreihe erstellt. Vier Möglichkeiten, aus den Einzeldistanzverteilungen Gesamtdistanzverteilungen zu erstellen, sind in das Programm integriert.

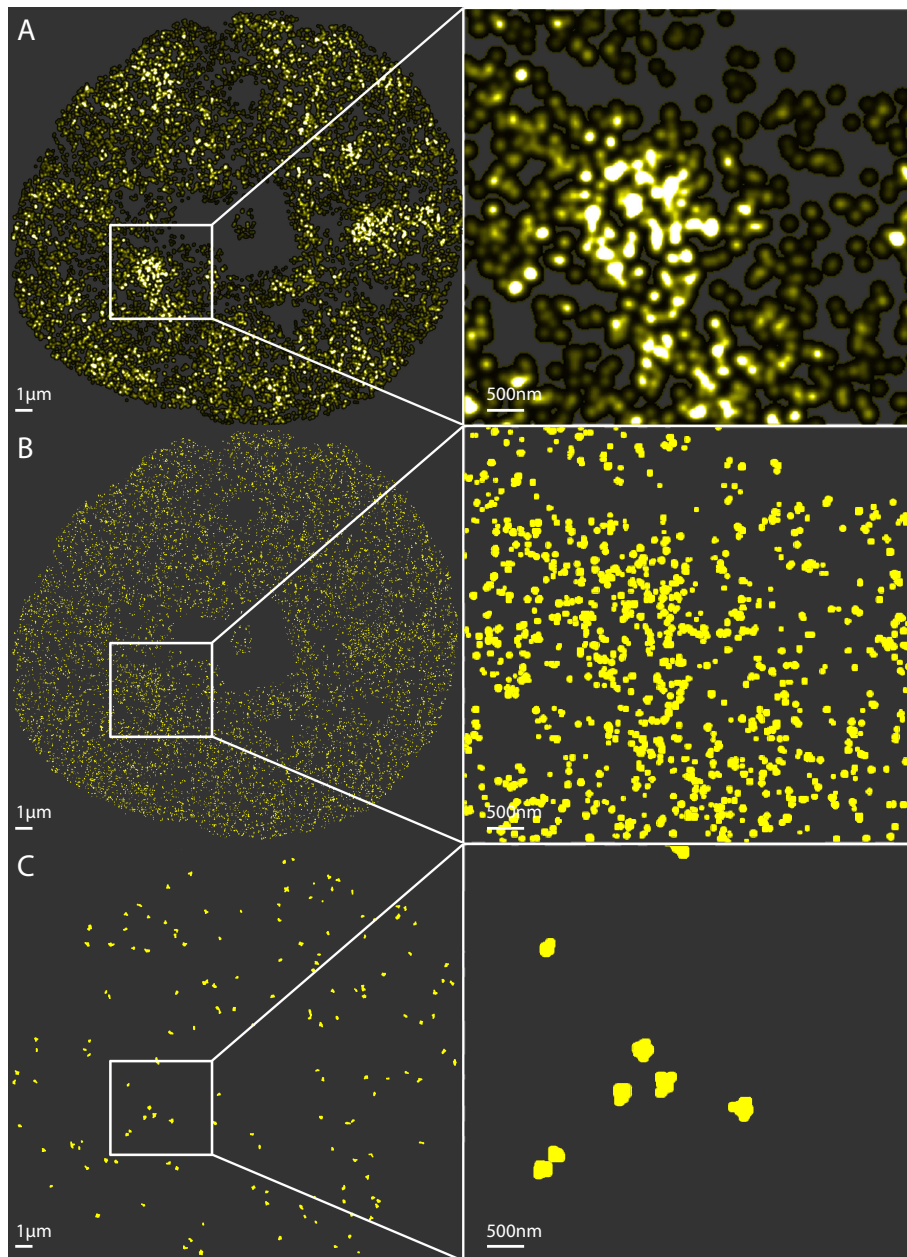


Abbildung 6.2: Bildausgaben Chromatinanalyse. A: Dichtebild. B: Standardbild. C: Clusterbild. (Nähere Erläuterungen zu den möglichen Darstellungen siehe Abschnitt 3.2.4).

Ausgabe	Einzelmessung	Messreihe	Experiment
Dichtebild	6.2A		
Clusterbild	6.2C		
Standardbild	6.2B		
Distanzverteilung	6.4A	6.4B	6.4B
Distanzverteilung Maximum	6.4A	6.3A	6.3B
Anzahl Punkte		6.3A	6.3B
Distanzverteilung in Clustern	6.4A		
Distanzverteilung Maximum in Clustern	6.4A	6.3A	6.3B
Anteil Punkte in Clustern		6.3A	6.3B

Tabelle 6.1: Übersicht Ausgabediagramme Chromatinanalyse. Das Programm „Chromatinanalyse“ gibt eine Reihe von Diagrammen und Bildern aus. Die Tabelle stellt eine Übersicht der Ausgaben dar und zeigt Verweise zu beispielhaften Abbildungen der zu erwartenden Diagramme

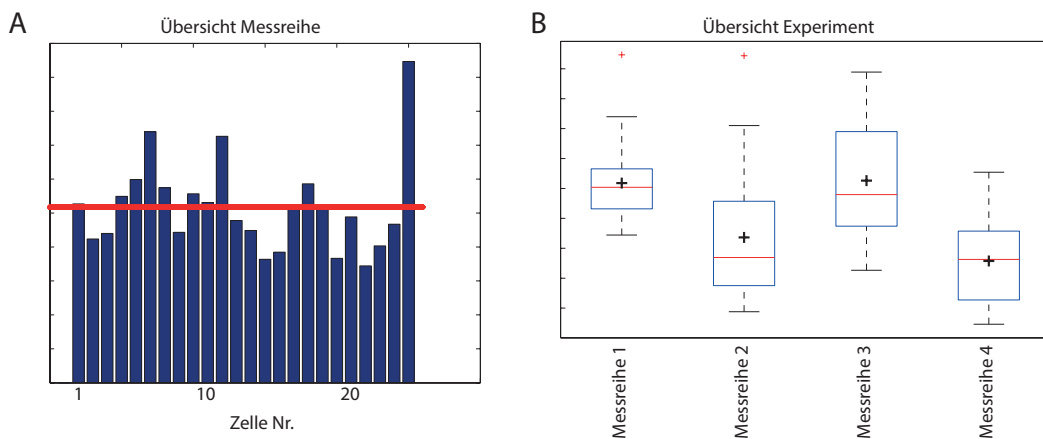


Abbildung 6.3: Übersichtsausgaben Chromatinanalyse. A: Balkendiagramme, die Übersichten einer Messreihe zeigen. Auf der x-Achse ist der Index der Einzelmessung angezeigt und auf der y-Achse der zu untersuchende Parameter. Der rote Balken zeigt den Mittelwert. Diese Diagramme helfen, einzelnen Zellen zu identifizieren, die stark vom Mittelwert abweichen. B: Boxplotdarstellung des ganzen Experiments. Jede Box repräsentiert eine unter A dargestellte Messreihe. Die Box repräsentiert die mittleren 50 % der Daten, die gestrichelten Linien reichen vom Maximal- zum Minimalwert der Daten, das schwarze Kreuz repräsentiert den Mittelwert, der Median wird als roter Strich dargestellt. Werte, die um mehr als die dreifache Länge der Box vom Median abweichen, werden als rote Kreuze eingetragen.

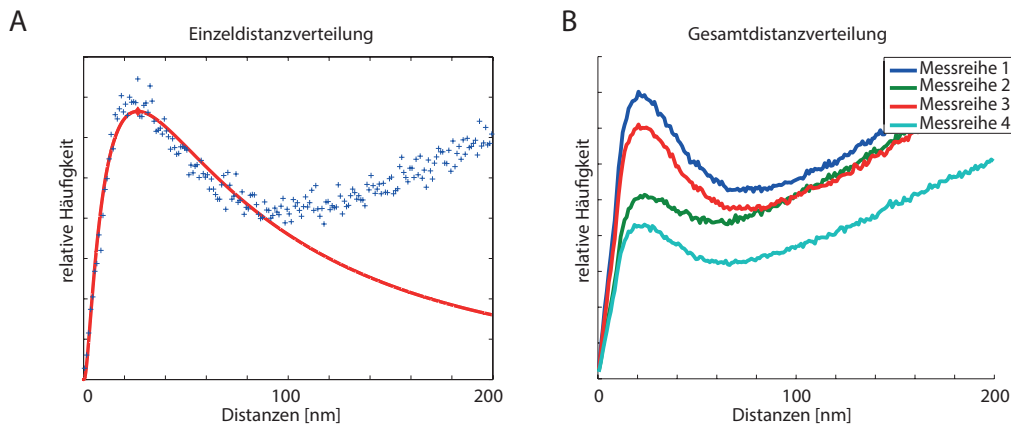


Abbildung 6.4: Distanzverteilungen Chromatinanalyse. A: Distanzverteilung einer Zelle mit einer Anpassung durch eine logarithmische Gaußverteilung und bestimmtem lokalem Maximum. Diese Einzeldistanzverteilungen können bei der Einschätzung der Qualität der Aufnahme helfen und erlauben Einschätzungen zur zugrundeliegenden Struktur. B: Gesamtdistanzverteilung, jede Messreihe wird durch eine Distanzverteilung repräsentiert. Je nach Datenlage, müssen die Daten bei der Erstellung der Gesamtdistanzverteilungen einer Normierung unterzogen werden (siehe dazu Abschnitt 6.1).

1. Das Programm zur Berechnung der Distanzen gibt diese als Liste mit Distanzen pro Messung aus (mit der Anzahl der Distanzen D_j der Zelle j). Eine Möglichkeit, eine Gesamtdistanzverteilung zu erstellen, ist, diese Listen für alle Zellen einer Messreihe zusammenzufügen und entsprechend daraus ein Histogramm (Klasseneinteilung x_i mit den zugeordneten Werten y_i , wobei i für die einzelnen Klassen steht) zu erstellen.

Dieses Verfahren eignet sich für Messreihen, bei denen die gemessene Punktzahl der verschiedenen Einzelmessungen konstant ist und ebenso die Anzahl der Einzelmessungen pro Messreihe gleich ist. Ansonsten beeinflussen einzelne Messungen mit einer vergleichsweise hohen Punktzahl die Verteilung stärker als die Messungen mit einer niedrigen Punktzahl, da die Listen der Distanzen nicht entsprechend ihrer Länge gewichtet werden.

2. Der zweite mögliche Ansatz berechnet, wie obenstehend, ein Histogramm, aber die Werte y_i werden durch die Gesamtzahl der Distanzen ($D = \sum_j D_j$) dividiert. Somit hat das Histogramm dann eine normierte y -Skala.

Auch bei diesem Verfahren sollten die gemessenen Punktzahlen der Einzelmessungen innerhalb einer Messreihe konstant sein. Sollen aber unterschiedliche Messreihen in einem Diagramm verglichen werden, die sich im Hinblick auf ihre y -Skalierung sehr stark unterscheiden, sodass der Verlauf einzelner Messreihen durch ungeeignete y -Skalierung nicht sichtbar ist, so bietet sich diese Variante mit einer normierten y -Skala an.

3. Da alle Histogramme eine identische Klasseneinteilung x_i haben, ist es möglich, aus allen Histogrammen einen Mittelwert zu berechnen:

$$y_{i,Mittelwert} = \frac{1}{N} \sum_j y_{i,j}$$

wobei N die Anzahl der Messungen pro Messreihe ist.

Dieses Verfahren sollte angewendet werden, wenn die Einzelmessungen konstante Punktzahlen haben, aber die Positionen der charakteristischen Maxima sich unterscheiden oder die Anzahl der Einzelmessungen pro Messreihe unterschiedlich ist.

4. Der letzte in das Programm integrierte Ansatz berechnet, wie obenstehend, den Mittelwert der Histogramme. Allerdings wird hierbei der Mittelwert wie folgt berechnet

$$y_{i,Mittelwert} = \frac{1}{N} \sum_j \frac{y_{i,j}}{D_j}$$

Dieses Verfahren eignet sich, wenn die Anzahl der Punkte pro Einzelmessungen sich innerhalb einer Messreihe erheblich unterscheiden, sodass einzelne Messungen die Gesamtdistanzverteilung deutlich stärker beeinflussen würden als andere.

6.2 Chromatinanalyse-Erweiterungen

Die folgenden Programme greifen auf die Parameter von „Chromatinanalyse“ zu und erweitern den Funktionsumfang von „Chromatinanalyse“.

6.2.1 Fit-Optimierung

Wie in Abschnitt 5.4 beschrieben, tauchen in Distanzverteilungen häufig Überlagerungen unterschiedlicher Verteilungen auf, sodass die Anpassungsfunktion zu den durch das Programm standardisierten Parametern nicht immer funktioniert, obwohl sie prinzipiell möglich ist. Das Tool „Fit-Optimierung“ bietet dem Anwender die Möglichkeit, die Anpassung mit anderen Parametern zu verbessern.

Nach dem Start des Programms „Fit-Optimierung“ wird der Nutzer aufgefordert, eine „Chromatinanalyse“-Parameterdatei zu öffnen. Danach ist noch die Eingabe von drei Parametern notwendig:

Wie weit soll der Fitbereich verschoben werden [nm]?: Wie in Abschnitt 6.1 beschrieben kann der Bereich $D_{fit,max}$, in dem eine Anpassung an eine Funktion versucht wird, festgelegt werden. Da es Schwankungen gibt, wann die charakteristische Distanzverteilung von der linearen Verteilung

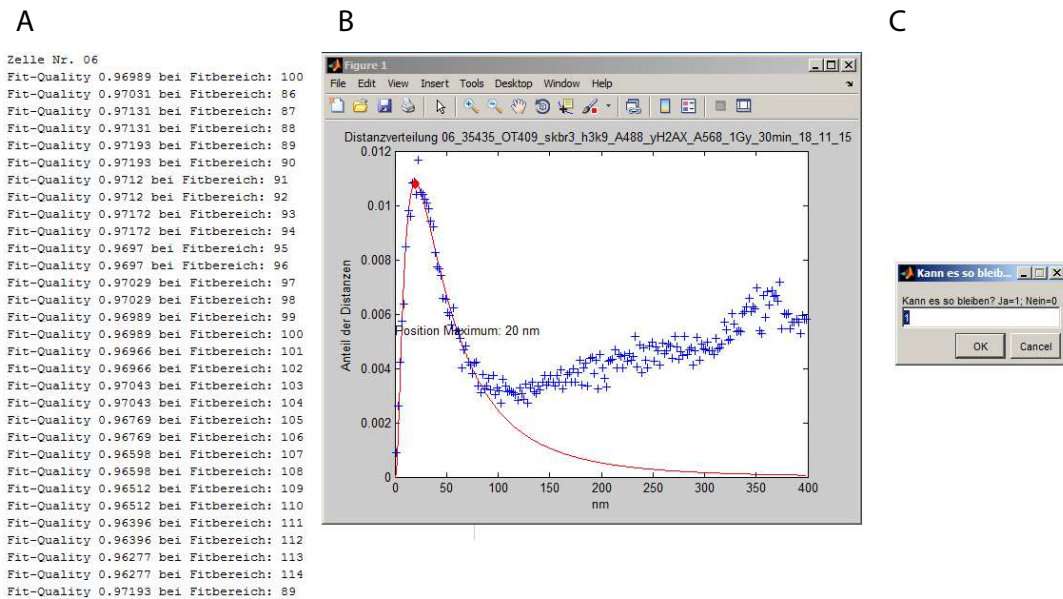


Abbildung 6.5: Programmablauf „Fit-Optimierung“. Ist keine Anpassung mit dem vorgegebenen Bestimmtheitsmaß möglich, so wird dem Anwender eine Übersicht (A) der Anpassungsversuche gezeigt. Außerdem sieht er eine Vorschau (B) der bestmöglichen Anpassungsfunktion. Der Anwender kann dann entscheiden, ob er noch weitere Versuche mit geänderten Parametern durchführen möchte oder den Datensatz verwerfen will (C).

überlagert wird, passt der in „Chromatinanalyse“ festgelegte Wert nicht für alle Messungen gleichermaßen. Hier kann nun festgelegt werden, um welchen Bereich $\Delta D_{fit,max}$ der eingegebene Wert aus „Chromatinanalyse“ verändert werden darf.

Fitquality Min: Das Verschieben des Fitbereichs beeinflusst das Bestimmtheitsmaß der Anpassungsfunktion. Hier kann ein Wert festgelegt werden, bei dem die Anpassung akzeptiert wird.

Fitquality Überprüfung: Erreicht eine Anpassung den hier für das Bestimmtheitsmaß festgelegten Wert, dann wird dem Nutzer eine Vorschau angezeigt und er kann entscheiden, ob er die Anpassung übernehmen möchte.

Nachdem die Parameter durch den Nutzer bestätigt wurden, wird das Programm in 1 nm-Schritten den Anpassungsbereich von $D_{fit,max} - \Delta D_{fit,max}$ bis $D_{fit,max} + \Delta D_{fit,max}$ ändern und Tests durchführen. Eine Übersicht wird ausgegeben, die das Bestimmtheitsmaß für die unterschiedlichen Anpassungsbereiche anzeigt, und für den Anpassungsbereich mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß wird außerdem eine Vorschau der Anpassung angezeigt. Der Nutzer kann dann nochmals den Anpassungsbereich manuell verändern und sieht jeweils eine Vor-

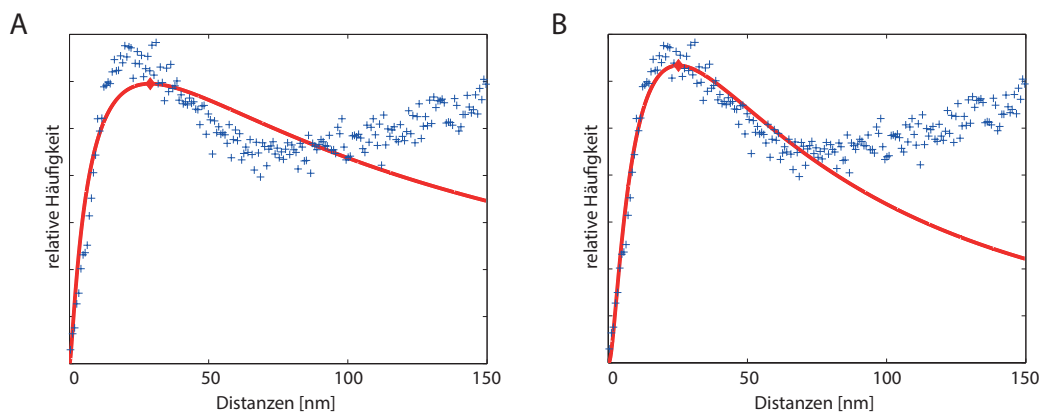


Abbildung 6.6: Beispiel einer Fitoptimierung. A: Der ursprüngliche Anpassungsbereich umfasste den Bereich von 0 bis 100 nm, allerdings wird ab ca. 50 nm das lokale Maximum bereits durch den linearen Teil der Verteilung überlagert (weitere Informationen zum Verlauf dieser Verteilungen siehe Abschnitt 5.4). B: Nach Optimierung, in diesem Fall Reduzierung, des Anpassungsbereichs konnte eine erhebliche bessere Anpassung durchgeführt werden.

schau. Er kann dann entscheiden, ob das Resultat verworfen werden soll oder in die weitere Analyse übernommen werden kann. Abbildung 6.6 zeigt beispielhaft das ursprüngliche und das optimierte Resultat. Abbildung 6.5 zeigt den Programmablauf und wie die Daten sowie die Abfragen dem Nutzer präsentiert werden.

6.2.2 NearestNeighbour(NN)-Analyse

Dieses Programm berechnet zu jedem Punkt P_i die minimale Distanz zu einem weiteren Punkt und bildet nur aus diesen ein Histogramm. Auch hierbei werden Anpassungsfunktionen durchgeführt und die Maxima der Fits in entsprechende Boxplots übernommen (siehe dazu auch Abschnitt 6.1). Alles wird automatisch in den Verzeichnissen gespeichert, die vorher in „Chromatinanalyse“ als Speicherort festgelegt wurden.

Nach dem Start des Programms „NN-Analyse“ wird der Nutzer aufgefordert, eine „Chromatinanalyse“-Parameterdatei zu öffnen. Die Eingabe weiterer Parameter ist nicht nötig, anschließend werden die NN-Distanzverteilungen berechnet.

6.2.3 Dichte-Analyse

Dieses Programm setzt die in Abschnitt 5.5 erklärte Dichteanalyse um. Für jede Messung wird ähnlich einer Distanzverteilung eine Dichteverteilung erstellt und ein Fit versucht. Da Dichteanalysen sehr von der Anzahl der Punkte pro Messung beeinflusst werden, sollte dieses Verfahren nur mit Daten durchgeführt werden,

bei denen die Anzahl der detektierten Punkte innerhalb der Messreihen nicht schwankt. Auch bei normierten Daten hat der notwendige Parameter des Radius r zur Bestimmung der lokalen Dichte (siehe dazu auch Abschnitt 5.5) einen erheblichen Einfluss auf das Resultat. Nach Starten des Programms „Dichte-Analyse“ wird der Nutzer aufgefordert, eine „Chromatinanalyse“-Parameterdatei zu öffnen. Anschließend wird noch der Parameter r für die Dichteanalyse abgefragt. Es werden Anpassungen mit einer Gaußfunktion versucht und das Maximum bestimmt. Die gefundenen Maxima werden in Boxplots (siehe dazu auch Abschnitt 6.1) dargestellt.

6.3 Overlay

Das Programm „Chromatinanalyse“ beinhaltet verschiedene mögliche Auswertansätze, allerdings ist es auf Experimente beschränkt, bei denen nur eine Markierung pro Zellkern verwendet wurde. Es kann nicht eingesetzt werden, um zwei Strukturen miteinander zu vergleichen, wie in Abschnitt 5.7 beschrieben.

Durch optimierte Markierungsverfahren (siehe dazu auch Abschnitt 4) ist es mittlerweile möglich verlässliche Markierungen, die für Lokalisationsmikroskopie geeignet sind, von mehreren unterschiedlichen Strukturen in einem Zellkern durchzuführen. Wie auch schon im Hinblick auf „Chromatinanalyse“ war auch für die Mehrkanalanalyse ein einfach zu benutzendes mit grafischer Oberfläche ausgestattetes Programm notwendig, das Messreihen analysieren kann. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt und mit „Overlay“ benannt. Abbildung 6.7 zeigt die grafische Benutzeroberfläche. Zunächst sollen hier die einzugebenden Parameter erläutert werden:

Layer 1 & Layer 2: Die einzugebenden Parameter ähneln jenen in „Chromatinanalyse“. Über „Ordner öffnen“ können dem Programm Messreihen hinzugefügt werden.

Auswahl: Dichtebild oder Clusterbild: Das Programm kann Überlagerungsbilder von Dichte- und Clusterbildern erstellen (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4). Dies kann über die grafische Benutzeroberfläche ausgewählt werden. Anschließend werden die entsprechenden Boxen zur Eingabe der Parameter angezeigt. Die entsprechenden Parameter wurden bereits in Abschnitt 6.1 erläutert.

Kurzname: Die Kurznamen werden in jedem Diagramm und Bild angezeigt.

Dateiname: Die Eingabe der Dateinamen ist identisch zum Programm „Chromatinanalyse“.

Overview: Am Lokalisationsmikroskop können neben den Lokalisationsbilderstapeln auch Übersichtsbilder erstellt werden (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4). Das Programm „Overlay“ erstellt aus den ausgewählten

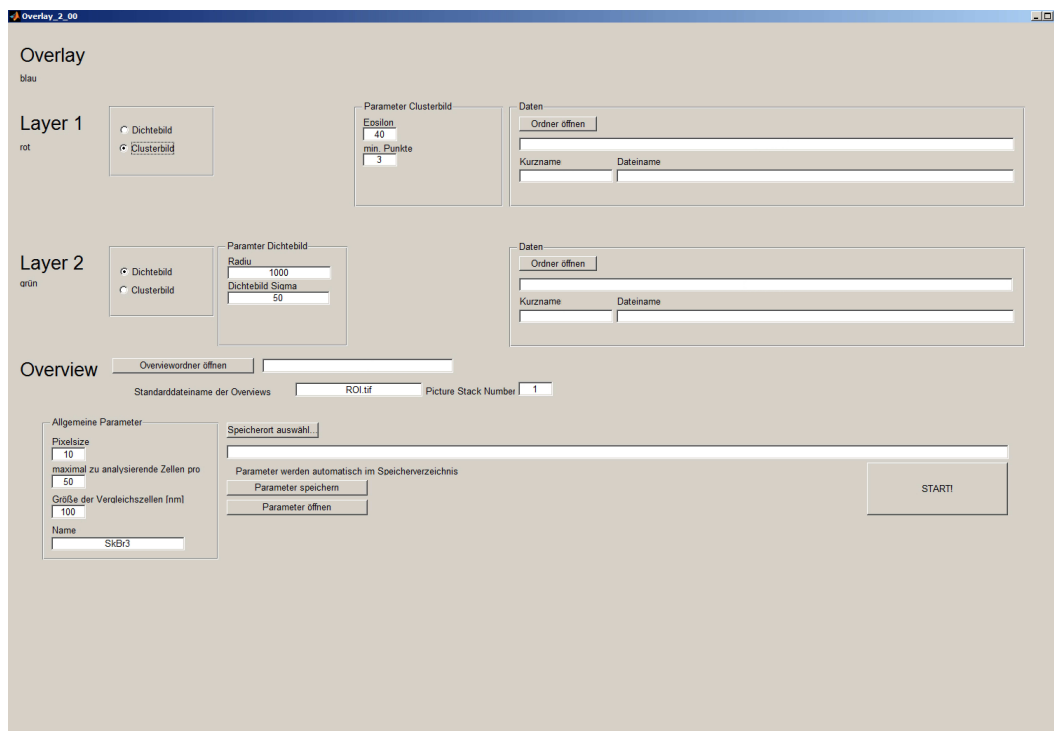


Abbildung 6.7: Grafische Benutzeroberfläche des Programms „Overlay“

Dichte- und Clusterbildern Überlagerungsbilder. Werden hier Übersichtsbilder ausgewählt, so werden diese zusätzlich in den Hintergrund der Überlagerungsbilder gelegt.

Picture Stack Number: Wenn sich die Übersichtsbilder in einem Bildstapel befinden, dann kann über diesen Parameter festgelegt werden, welches Bild des Stapels verwendet werden soll.

Allgemeine Parameter

Pixelsize [nm/px]: Hier kann festgelegt werden, welche Größe einem Pixel bei der Erstellung von Bildern entsprechen soll. (Eine detaillierte Beschreibung befindet sich in Abschnitt 6.1).

maximal zu analysierende Zelle pro Reihe: Diese Zahl legt fest, bis zu welchem Index Dateien geladen werden sollen.

Name: Der hier festgelegte Name für die Messreihe taucht in jedem Diagramm und Bild auf.

Größe der Vergleichszellen [nm]: In Abschnitt 5.7 werden zwei Verfahren vorgestellt, um Kolo-kalisation bei Lokalisationsdaten zu bestimmen. Hier wird der zweite vorgestellte Ansatz verwendet, da er deutlich weniger rechenaufwändig ist und hier zur Erstellung von

Bildern verwendet wird. Präzisere Kolokalisationsanalysen werden durch das in Abschnitt 6.4 vorgestellte Programm durchgeführt. Über das Feld kann die notwendige Rastergröße festgelegt werden.

Nach Starten des Programms werden, entsprechend den in der grafischen Benutzeroberfläche gewählten Einstellungen, Überlagerungsbilder der beiden Farbkanäle (rot und grün) erstellt. Darüber hinaus wird ein Kolokalisationsbild (blau) erstellt und ebenfalls in das Überlagerungsbild eingefügt. Dieses Kolokalisationsbild wird erstellt wie in Abschnitt 5.7 (Kolokalisationsmethode 2) beschrieben.

6.4 Overlayanalyse

Das Programm „Overlayanalyse“, das auf die Parameter- und Resultate-Dateien von „Overlay“ zurückgreift, erlaubt einen über die bloße Kolokalisationsanalyse hinausgehenden Vergleich. Damit „Overlayanalyse“ funktioniert, sind bestimmte Parameter in „Overlay“ verpflichtend: in Layer 1 muss ein Clusterbild und in Layer 2 ein Dichtebild ausgewählt werden. Alle weiteren Parameter können entsprechend dem Experiment gewählt werden. Die von „Overlay“ ausgegebenen Parameterdateien können dann in „Overlayanalyse“ geöffnet werden. Hier ist es möglich, mehrere dieser Parameterdateien zu öffnen, um z. B. mehrere Messreihen miteinander zu vergleichen. Das Programm „Overlayanalyse“ wird nun ausgehend von den Schwerpunkten der Cluster aus Layer 1 die Dichteverteilung der Punkte in Layer 2 bestimmen und in Diagrammen ausgeben. Genauere Erläuterungen zur Funktion dieser Mehrkanalanalyse finden sich in Abschnitt 5.7.

Nach dem Öffnen der Parameterdateien bedarf es noch der Eingabe von fünf Parametern, die durch eine grafische Benutzeroberfläche abgefragt werden.

Min [nm]: Minimale Distanz vom Clusterschwerpunkt, die analysiert werden soll.

Schrittweite [nm]: Die Dichte um die Cluster wird jeweils in Kreisringen um diese analysiert. Mit diesem Parameter wird festgelegt, mit welcher Schrittweite die Kreisringe jeweils vergrößert werden.

Max [nm]: Bis zu dieser Entfernung vom Cluster wird die Analyse durchgeführt.

Dichte Min [Punkte/nm²]: Bei diesem Verfahren wird die Dichte aus Layer 2 um die in Layer 1 gefundenen Cluster bestimmt. Hier kann eine Dichte festgelegt werden, die mindestens erreicht werden muss, damit eine zu einem Cluster gehörige Dichteverteilung in die weitere Analyse übernommen wird.

Min Distanz Dichtebestimmung [nm]: Die Analyse-Methode bedingt, dass bei kleinen Entfernungen zum Clusterschwerpunkt „Dichteartefakte“ auftreten können. Die Dichte wird in Punkten pro Fläche ausgegeben. Da die Kreisringe für kleine Entfernungen zum Cluster eine entsprechend kleine Fläche haben, kann es vorkommen, dass eine hohe Dichte bestimmt wird, obwohl sich in dem entsprechenden Flächenstück nur zufällig einige Rauschpunkte befinden. Die Eingabe dieses Parameters führt dazu, dass nur die Dichte ab der eingegebenen Mindestdistanz bei der Prüfung, ob die Mindestdichte erreicht wurde, berücksichtigt wird. Bei allen anderen Analyseschritten gilt die unter „Min [nm]“ vorgegebene Mindestdistanz.

Die Ergebnisdiagramme werden entsprechend der in „Overlay“ eingegebenen Parameter in einer eigenen Ordnerstruktur abgelegt, Beschreibungen und Bezeichnungen werden übernommen und in entsprechende Bilder und Diagramme eingefügt.

Analyse der Chromatinstruktur nach Strahlenexposition

7.1 Potential der Lokalisationsmikroskopie

Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie lassen sich zahlreiche Proteine, Strukturen, DNA-Abschnitte usf. sichtbar machen. Konventionelle Mikroskopie (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.4.3) erlaubt, Strukturen mit einer Auflösung von ca. 200 nm (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.3) zu untersuchen. In den letzten Jahren konnten Mikroskopieverfahren entwickelt werden, die es ermöglichen, trotz des Auflösungslimits von 200 nm die Positionen von Fluorophoren deutlich präziser zu bestimmen (siehe dazu Abschnitt 2.1.5). Die hier verwendete Lokalisationsmikroskopie ermöglicht die Positionsbestimmung mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern. Diese erhebliche Genauigkeitsverbesserung erlaubt es, Substrukturen sichtbar zu machen, die vorher durch die Überlagerungen der PSF als homogene Bereiche erschienen (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.2). Verdeutlicht werden kann dies anhand von γ H2AX-Aufnahmen (genauere Erläuterungen zu γ H2AX finden sich in Abschnitt 2.2.4). Es ist bekannt, dass DNA-Doppelstrangbrüche zu einer deutlichen Erhöhung der γ H2AX-Dichte in der direkten Umgebung dieser Doppelstrangbrüche führt [124]. Diese dichten Bereiche (im Folgenden als γ H2AX-Cluster bezeichnet) wirken auf konventionellen Fluoreszenzaufnahmen (siehe Abbildung 7.1 A und C) homogen und haben scheinbar nur geringfügige Intensitätsschwankungen. Die Substruktur dieser γ H2AX-Cluster wird erst mit hochauflösenden Mikroskopiemethoden sichtbar, z. B. mit Hilfe der hier verwendeten Lokalisationsmikroskopie. Deutlich zu erkennen ist dies in Abbildung 7.1 B, die die Überlagerung eines konventionellen γ H2AX-Fluoreszenzbildes mit den Lokalisationsmikroskopie-Dichtebildern (zu den verschiedenen Darstellungsmethoden von Lokalisationsdaten siehe auch Abschnitt 3.2.4) von γ H2AX und Heterochromatin zeigt. Abbildung 7.1 C zeigt den markierten Ausschnitt

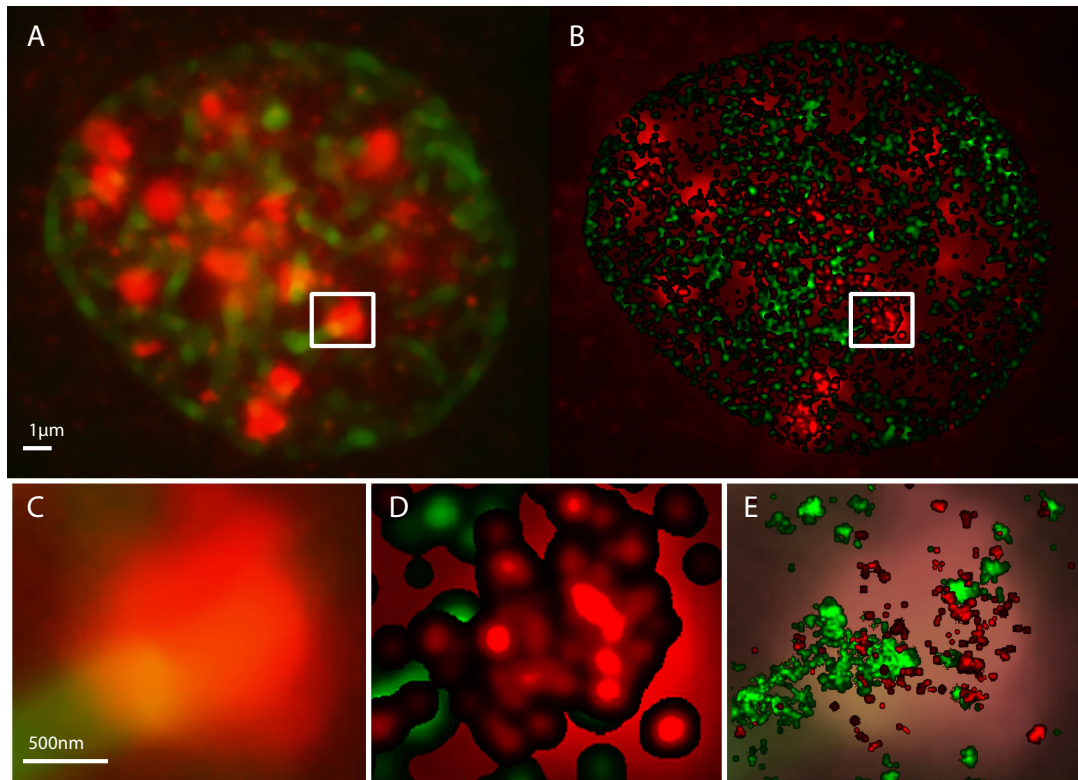


Abbildung 7.1: Mikroskopieaufnahmen einer SKBR3-Zelle 30 min nach Bestrahlung mit 1Gy. Heterochromatin: Grün und γ H2AX: Rot. A: konventionelle Mikroskopie. B: Lokalisationsaufnahme dargestellt als Dichtebild. C: Vergrößerter Ausschnitt des konventionellen Mikroskopiebildes. D: Überlagert mit dem Lokalisationsdichtebild. E: Überlagert mit dem Lokalisationsstandardbild. Die Inhomogenität und Substruktur des γ H2AX-Clusters ist deutlich zu erkennen.

vergrößert, in D überlagert mit dem Dichtebild und in E überlagert mit dem Standardbild. Deutlich zu erkennen ist die keineswegs homogene Struktur des γ H2AX-Clusters. Konventionelle Mikroskopie bietet die Möglichkeit, die einzelnen γ H2AX-Cluster zu erkennen, da sie sich deutlich vom Hintergrund abheben, wie die Abbildungen 7.1 A und C zeigen. Eine darüber hinausgehende Analyse ist durch die begrenzte Auflösung nicht möglich. Die Möglichkeit, Fluorophorpositionen mit einer Genauigkeit von einigen Nanometern zu bestimmen, erlaubt nun eine viel detailliertere Erkennung und Analyse der γ H2AX Cluster. Neben der Anzahl der auftauchenden Cluster können die in einem Cluster enthaltenen Moleküle, ihre Distanzverteilung (siehe dazu auch Abschnitt 5.4), die Größe der Cluster usw. (siehe dazu auch Abschnitt 5.3) bestimmt werden. Darüber hinaus ist es mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden möglich, die Strukturen der Punktverteilung zu charakterisieren und so einem quantitativen Vergleich zugänglich zu machen (siehe dazu auch Abschnitt 5.8).

7.2 Experimente

Für die durchzuführenden Experimente wurden robuste Krebszelllinien verwendet, die einerseits den lebenden Transport zu den Bestrahlungsquellen problemlos überstehen, auch wenn sich die Zellen dazu übergangsweise nicht unter optimalen Umgebungsbedingungen (u.a. Temperatur und CO_2 -Anteil der Luft) befinden. Andererseits überleben diese Zelllinien auch Bestrahlungen mit hohen Dosen und somit kann der Einfluss der Strahlendosis auf das Genom untersucht werden.

7.2.1 HeLa H2B GFP-Transfektion und Heterochromatin-Immunofluoreszenz

Da die verwendete HeLa H2B GFP-Zelllinie mit dem H2B-Protein ein GFP-Fluorophor produziert, ist die H2B-Verteilung einer mikroskopischen Analyse ohne weitere Fluoreszenzmarkierung zugänglich. Über die H2B-Verteilung hinaus wurde die Heterochromatinstruktur untersucht. Dazu wurde Immunofluoreszenz verwendet (siehe Abschnitt 3.1.4). Das Markierungsziel war die Histonschwanzmodifikation H3 (tri methyl K9) (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3.1), der sekundäre Antikörper trägt den Farbstoff Alexa568. Alexa568 und GFP haben unterschiedliche Anregungs- und Emissionsspektren (siehe dazu auch Abschnitt 2.1.4) und konnten somit voneinander unterschieden werden.

Im Verlauf dieser Experimente zeigte sich, dass die verwendete HeLa-Zelllinie erhebliche Inhomogenitäten der Fluoreszenz von Zellkern zu Zellkern zeigte. Darüber hinaus waren die Zellen in Größe und Form sehr unterschiedlich (siehe Abbildung 7.2 und 7.3). Trotz Veränderungen bei der Zellkultur und der Präparation (siehe dazu auch 3.1.1) konnten keine ausreichend gleichbleibenden Messungen hinsichtlich der Fluoreszenz und der Zellkerngröße erreicht werden, somit stellte die HeLa-Zelllinie keine ausreichende Grundlage für die geplanten quantitativen Analysen dar.

7.2.2 SKBR3 Heterochromatin-Immunofluoreszenz nach Bestrahlung

Die Zelllinie SKBR3 zeigte einerseits gleichbleibende Resultate im Hinblick auf Größe und Form (auch nach Bestrahlung) des Zellkerns und andererseits auch geringere Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und somit der Markierungseffizienz zwischen zwei Zellkernen der gleichen Präparation (siehe Abbildung 7.4 und 7.5). Sie ist damit eine geeignete Zelllinie für die geplanten Experimente. In den folgenden Experimenten wurde mit Hilfe dieser Zelllinie und von Immunofluoreszenz (siehe dazu Abschnitt 3.1.4) Heterochromatin (siehe dazu Abschnitt 2.2.3.2) analysiert. Dazu wurde die Histonschwanzmodifikation H3 (tri methyl K9) (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3.1) als Markierungsziel verwendet. Die Heterochromatinmarkierungen wurden mit weiteren Immunofluoreszenz- und

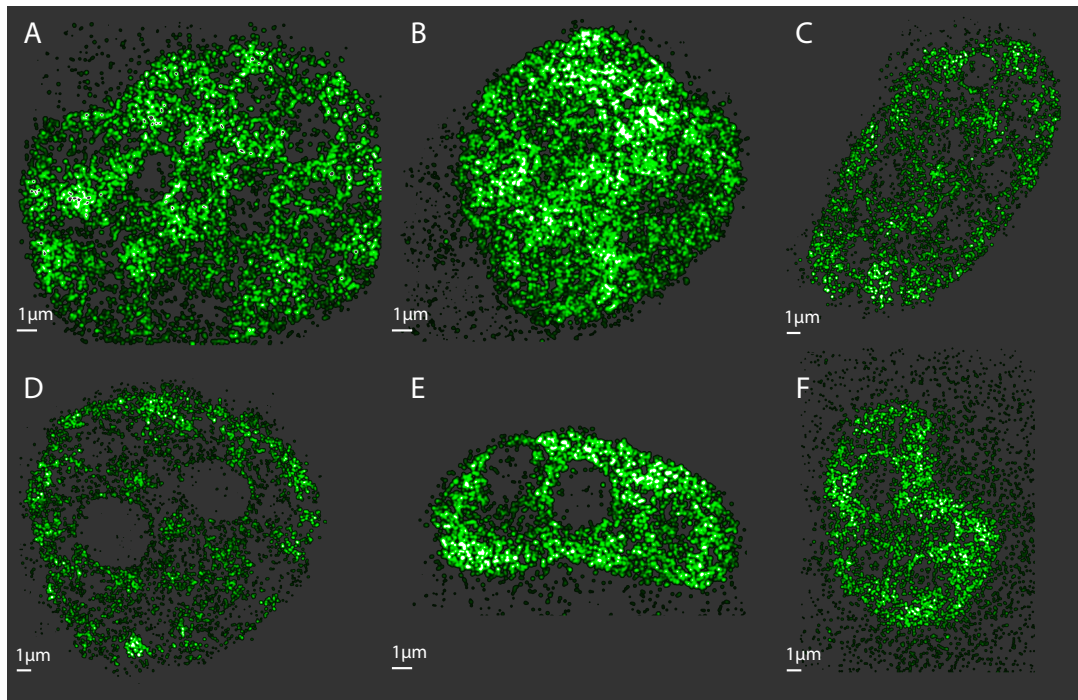


Abbildung 7.2: Dichtebilder einiger HeLa-Zellkerne mit H3 (tri methyl K9)-Markierung. Da hier die Homogenität der Fluoreszenz und der Zellkernform sowie die Qualität der Markierung dargestellt werden soll, wurden keine Filterungen oder Normierungen durchgeführt. Die Inhomogenität der Zellkernform und -größe ist ebenso zu erkennen, wie die Unterschiede der Intensität der Fluoreszenz. (Parameter zur Dichtebilderstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm).

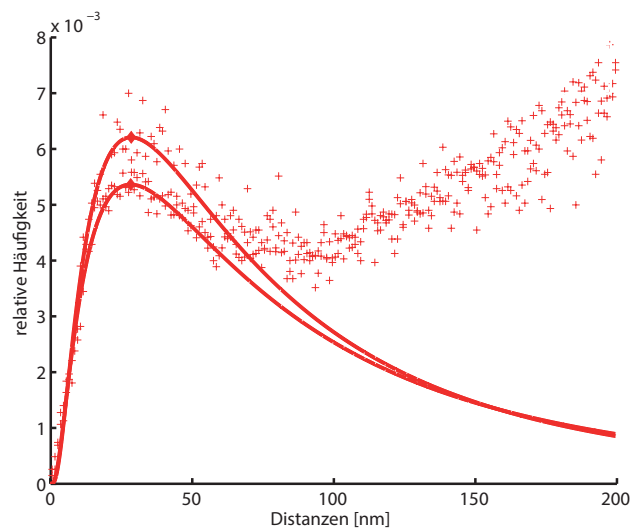


Abbildung 7.3: Distanzverteilungen zu den in Abbildung 7.2 A,C gezeigten HeLa-Zellkernen. Trotz der deutlichen Unterschiede im Hinblick auf Form und Fluoreszenzintensität sind die Distanzverteilungen sehr ähnlich. Die nanoskalige Anordnung scheint durch Form des Zellkerns nur sehr eingeschränkt beeinflusst zu werden.

Dosis[Gy]	Zeit nach Bestrahlung [h]	Zellzyklus	Markierung
0.5, 4	0.5, 3, 6, 12, 24	G2	H3 (tri methyl K9)
0.5, 4	0.5, 3, 6, 12, 24	-	H3 (tri methyl K9)
0.1, 0.5, 1, 2, 4	0.5	-	H3 (tri methyl K9), γ H2AX
0.1, 0.5, 1, 2	0.5	-	H3 (tri methyl K9), Alu

Tabelle 7.1: Übersicht der durchgeführten Experimente an SKBR3-Zellen

Combo-FISH-Markierungen kombiniert. Die Experimente werden im Folgenden beschrieben. Tabelle 7.1 zeigt alle durchgeführten Experimente.

7.2.2.1 Synchronisation in Zellphase G2 während und nach der Bestrahlung

Neben unterschiedlicher Form und Größe der Zelle können sich Zellen auch im Hinblick ihrer Zellphase innerhalb des Zellzyklus unterscheiden. Um auch hier möglichst konstante Ausgangsbedingungen zu erreichen, wurden alle Zellen in der Zellphase G2 (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2) synchronisiert. Für dieses Experiment wurden die Zellen 24 h vor der Bestrahlung im geeigneten Zellkulturmedium auf Deckgläser aufgebracht (siehe dazu Abschnitt 3.1.1). Dem Zellkulturmedium wurde außerdem ein Mittel hinzugefügt, das den Zellzyklus nach Erreichen der G2-Phase stoppt. Da die Zellen den Zellzyklus in ca. 24 h durchlaufen, konnte so garantiert werden, dass alle Zellen sich in der G2-Phase befinden. Die Zellen, festgewachsen auf den Deckgläsern und in der G2-Phase synchronisiert, wurden mit unterschiedlichen Dosen von 6 MeV-Photonen an einer medizinischen Bestrahlungsquelle bestrahlt und anschließend nach festen Zeiträumen nach der Bestrahlung fixiert (siehe dazu Abschnitt 3.1.2). Tabelle 7.1 zeigt eine Übersicht der Bestrahlungsdosen und der Zeitpunkte nach Bestrahlung, zu denen diese fixiert wurden. Bis zur Fixierung befanden die Zellen sich dauerhaft in der G2-Phase. Eine solche Bestrahlung verursacht im Genom Schäden, die von der Zelle mit bestimmten Mechanismen repariert werden (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4). Die Fixierung nach bestimmten Zeiträumen erlaubt es, nun den Fortschritt der Reparatur festzuhalten und zu analysieren.

7.2.2.2 Synchronisation in Zellphase G2 während der Bestrahlung

Bei diesem Experiment wurde genau wie in Abschnitt 7.2.2.1 beschrieben vorgegangen, allerdings wurde 15 min nach der Bestrahlung das Zellkulturmedium gegen ein Medium ausgetauscht, das kein Zellphasen-Synchronisationsmittel enthält. Daher konnten die Zellen den Zellzyklus fortsetzen und die G2-Phase verlassen. So konnte analysiert werden, ob die Fixierung in einer Zellphase die Reparaturprozesse beeinflusst. Tabelle 7.1 zeigt eine Übersicht der für dieses Experiment analysierten Dosen und Reparaturzeitpunkte.

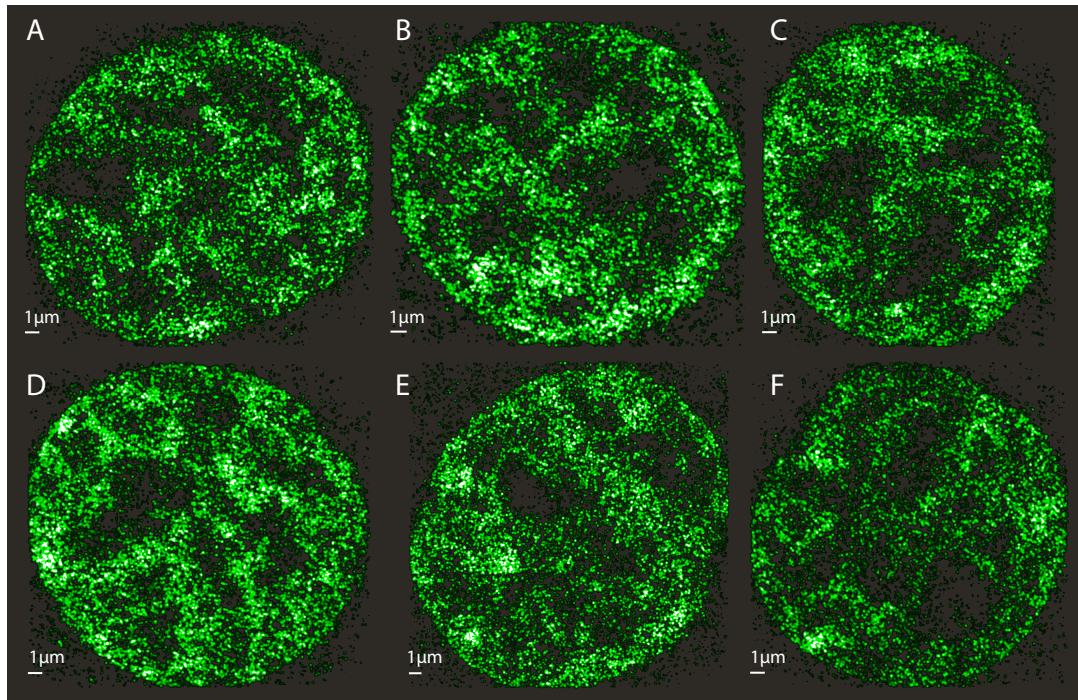


Abbildung 7.4: Dichtebilder einiger SKBR3-Zellkerne mit H3 (tri methyl K9)-Markierung. Da hier die Homogenität der Fluoreszenz und der Zellkernform sowie die Qualität der Markierung dargestellt werden soll, wurden keine Filterungen oder Normierungen durchgeführt. Die Zellkerne sind in Größe und Form gleichbleibend und zeigen nur geringe Unterschiede im Hinblick auf die Intensität der Fluoreszenz (Parameter zur Dichtebilderstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm).

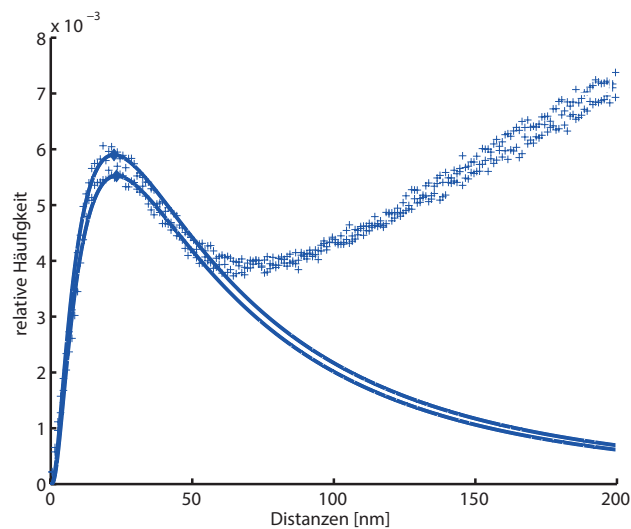


Abbildung 7.5: Distanzverteilungen zu den in Abbildung 7.4 B,F gezeigten SKBR3-Zellkernen. Die Distanzverteilungen sind wie erwartet sehr ähnlich, d. h. im Rahmen der Wertestreuung gleich.

7.2.2.3 Kombination mit γ H2AX-Immunofluoreszenz

In den Abschnitten 7.2.2.1 und 7.2.2.2 wurden Experimente zur Analyse der Heterochromatinverteilung nach Bestrahlung durchgeführt. Neben diesen Experimenten, die als Grundlage zur Analyse der Heterochromatinverteilung über den ganzen Zellkern dienen, wurde der Zusammenhang von Heterochromatin und DNA-Doppelstrangbrüchen (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4) untersucht.

Dazu wurden erneut Zellen auf Deckgläser aufgebracht und bestrahlt. Ca. 30 min nach Bestrahlung tauchen an den geschädigten DNA-Stellen vermehrt γ H2AX-Moleküle auf [124, 125], die die Grundlage für die Doppelstrangbruch-Reparatur darstellen (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4). Die γ H2AX-Moleküle wurden mit Hilfe von Immunofluoreszenz (siehe dazu Abschnitt 3.1.4) sichtbar gemacht. Da DNA-Doppelstrangbrüche mit erhöhter Bestrahlungsdosis zunehmen, wurden in diesem Experiment Zellen mit Bestrahlungsdosen von 0.1 Gy bis 4 Gy bestrahlt. Alle wurden nach 30 min fixiert. Tabelle 7.1 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Experimente.

7.2.2.4 Kombination mit Alu-Combo-FISH

Wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben spielen Alu-Sequenzen eine noch nicht näher bekannte Rolle bei der Strukturierung des Genoms im Zellkern. Daher wurden die strukturellen Zusammenhänge zwischen Heterochromatin (siehe dazu Abschnitt 2.2.3.2) und Alu-Sequenzen analysiert. Dazu wurde bei diesem Experiment eine Alu-Combo-FISH-Markierung (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.3) mit einer Heterochromatin-Markierung kombiniert. Da die Bestrahlung einen Einfluss auf die DNA-Strukturierung hat, wurden auch bei diesem Experiment die Zellen bestrahlt. Eine Übersicht der durchgeführten Bestrahlungen zeigt Tabelle 7.1.

7.3 Lokalisationsmikroskopische Untersuchung

7.3.1 Vorbereitung der Daten

7.3.1.1 Filterung

Sämtliche SKBR3-Heterochromatin-Daten (siehe Abschnitt 7.2.2) wurden vor weiteren Analysen der unter Abschnitt 5.2 vorgestellten Filterung unterzogen. Für diese Filterung ist eine Dichteanalyse (siehe Abschnitt 5.5) notwendig, die einen Radius als Parameter benötigt. Hier wurde als Radius $R = 1000$ nm gewählt. Anschließend wurde in jedem Zellkern die Maximaldichte D_{max} bestimmt und alle Punkte P_i entfernt, für die gilt: $D_i < 0.25 \cdot D_{max}$.

Falls die Daten einer Clustersuche unterzogen wurden, wurde auf die Filterung verzichtet, da diese Clustersuche nur besonders dichte Bereiche berücksichtigt und somit die Filterung nicht nötig war. Dies gilt für die gewonnenen Alu- und γ H2AX-Daten.

7.3.1.2 Normierung

Nach der Filterung wurden alle SKBR3-Heterochromatin-Daten einer Normierung unterzogen. Dazu wurde das unter Abschnitt 5.2 beschriebene Normierungsverfahren verwendet. Nach Voruntersuchungen der Daten zeigte sich, dass eine Normierung auf 20 000 Punkte für alle durchgeführten Heterochromatinexperimente passend ist. Durch die Filterung und Normierung von Daten geht immer ein Teil der gemessenen Information verloren. Wie in Abschnitt 5.2 beschrieben ist der Einfluss dieses Informationsverlustes auf den gesamten Zellkern begrenzt. Abbildung 7.6 zeigt die Distanzverteilung (siehe Abschnitt 5.4) eines Heterochromatindatensatzes im Ursprungszustand, nach der Filterung und nach der Normierung. Es ist erkennbar, dass sich die charakteristische Distanz nicht ändert. Die Normierung hat somit auch nur einen begrenzten Einfluss auf die Strukturen kleinerer Größenordnung. An diesem Punkt ist die Annahme berechtigt, dass dieses Normierungsverfahren die erheblichen Punktzahlunterschiede, die für quantitative Analysen und Vergleiche von Lokalisationsdaten von Genomstrukturen immer ein erhebliches Problem darstellten, beseitigt, ohne dabei nennenswerten Einfluss auf die Struktur auf großen wie kleinen Längenskalen zu nehmen. Aufgrund der obenstehenden Ergebnisse ist der Einsatz der Normierung berechtigt und erleichtert die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen erheblich.

7.3.2 Analyse der H2B-Verteilung

Nach Lokalisationsmikroskopischer Untersuchung der H2B-Verteilung und Berechnung der Distanzverteilung (siehe Abschnitt 5.4) zeigt sich, dass die H2B-Distanzverteilung einen linearen Zusammenhang zwischen Distanz und Häufigkeit ihres Auftretens zeigt (siehe Abbildung 7.7). Das Protein H2B ist Teil des Histonoktamers und damit ein wichtiger Bestandteil bei der Verpackung der DNA im Zellkern (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Die Daten deuten an, dass die H2B-Proteine homogen über den Zellkern verteilt sind und keine Struktur mit charakteristischen Distanzen oder Bereiche besonders hoher und niedrigerer Dichte ausbildet. Da das Protein H2B bei der Bildung jedes Histons beteiligt ist, ist eine homogene Verteilung dieses Histons mit dem Modell des Nukleosomaufbaus gut vereinbar.

7.3.3 Vergleich der Heterochromatin-Verteilung bei HeLa- und SKBR3-Zellen

In den Experimenten, die in Abschnitt 7.2.1 und 7.2.2 beschrieben sind, wurde jeweils eine Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt, die die Histonschwanzmodifikation H3 (tri methyl K9) sichtbar macht, um die Heterochromatinverteilung zu analysieren. Für beide Experimente wurde die Distanzverteilung für jeden untersuchten Zellkern berechnet. Im Gegensatz zu der Verteilung der H2B-Moleküle (siehe dazu Abschnitt 7.3.2) zeigen diese Heterochromatinverteilungen eine charakteristische Distanzverteilung (siehe Abschnitt 5.4). Das deutet darauf hin,

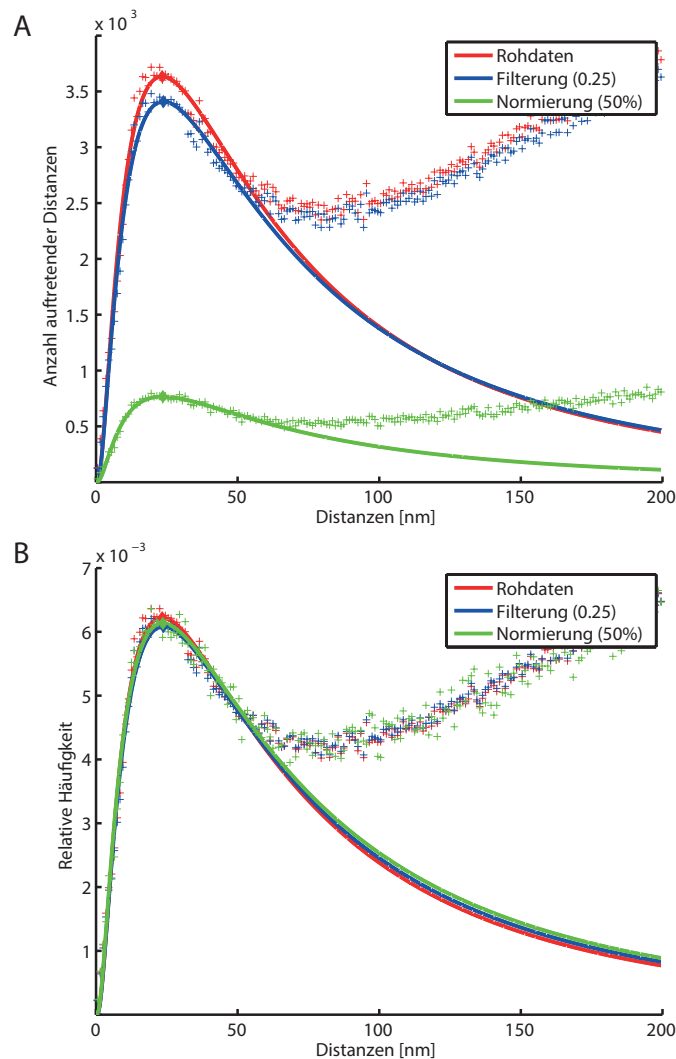


Abbildung 7.6: Distanzverteilung einer H3 (tri methyl K9)-Markierung. Rot: Rohdaten. Blau: Nach Filterung wie in Abschnitt 7.3.1.1 beschrieben. Grün: Verringerung der Punktzahl auf ca. 50% der ursprünglichen Punktzahl. Durch die Punktreduzierung nach Filterung und Normierung wird auch die absolute Anzahl der auftretenden Distanzen reduziert. Daher ist die Verteilung in A mit absoluter und in B mit relativer Skala dargestellt. Der Einfluss von Filterung und Normierung auf die charakteristische Distanz ist minimal.

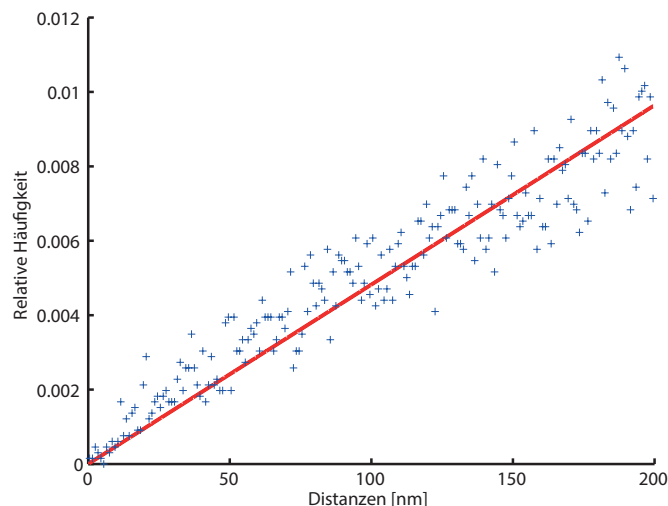


Abbildung 7.7: H2B-Distanzverteilung. Der lineare Zusammenhang zwischen Distanz und ihrem Auftreten deutet auf eine homogene Verteilung des H2B-Proteins hin.

dass Heterochromatin Bereiche erhöhter Dichte bildet, in denen die Histone einen bestimmten festen Abstand zueinander einnehmen. Darüber hinaus zeigt sich, dass Heterochromatin in beiden Zelllinien Strukturen ausbildet, die sich in der charakteristischen Distanzverteilung ähneln (siehe dazu Abbildung 7.8).

Abbildung 7.9 zeigt Lokalisationsdichtebilder der H2B- und H3 (tri methyl K9)-Verteilung in HeLa-Zellen. Die Verteilung der H2B-Proteine ist verglichen mit der H3 (tri methyl K9)-Verteilung auf den Dichtebildern deutlich homogener. Somit werden die Ergebnisse der Distanzverteilungen auch durch die Lokalisationsdichtebilder bestätigt. Die hier gezeigten Resultate stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein, die besagen, dass Heterochromatin Bereiche erhöhter Dichte bildet [126, 127]. Feststellen lässt sich, dass die gefundenen Distanzverteilung mit der Annahme eines 30 nm-Filaments (siehe Abschnitt 2.2.3.1) in Einklang steht.

7.3.4 Analyse der Heterochromatinverteilung nach Bestrahlung

Im Folgenden soll nun untersucht werden, wie das im Zellkern enthaltene Heterochromatin auf Bestrahlung reagiert und wie es sich während des anschließenden Reparaturprozesses verhält. Wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben, kann es nach DNA-Schäden zu DNA-Umstrukturierungsprozessen kommen [128]. Besonders deutlich wird dies bei DNA-Doppelstrangbrüchen, für deren Reparatur die DNA histonfrei vorliegen muss. Das hier zu analysierende Heterochromatin ist Chromatin mit besonders hoher Dichte (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3.2). Inwieweit die Umstrukturierungsprozesse nach DNA-Schäden den Anteil an Heterochromatin

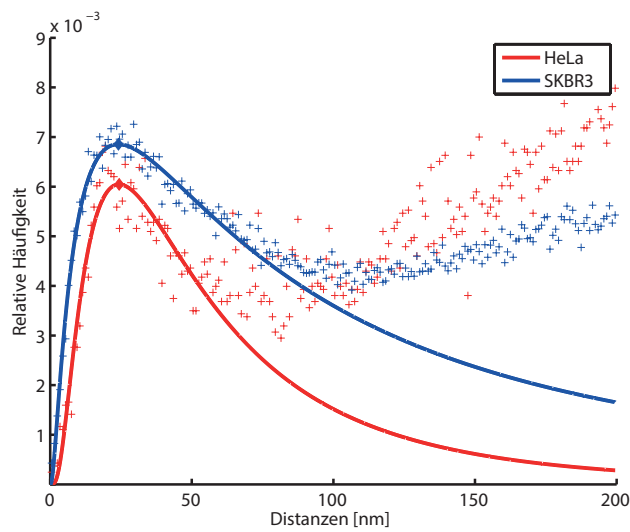


Abbildung 7.8: Distanzverteilung der H3 (tri methyl K9)-Markierung im Vergleich der beiden verwendeten Zelllinien. Die charakteristische Distanzverteilung hat ihr Maximum jeweils bei ca. 25 nm und auch der Verlauf der Verteilungen ist ähnlich und entspricht dem in Abschnitt 5.4 erwarteten Verlauf.

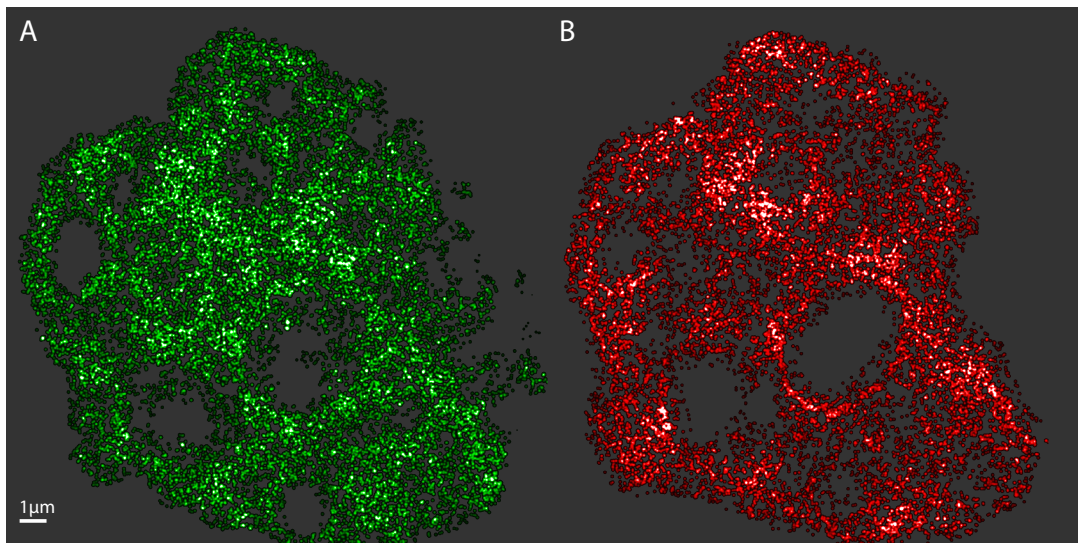


Abbildung 7.9: H2B- und H3 (tri methyl K9)-Dichtebilder eines HeLa-Zellkerns. A: H2B-Verteilung. B: H3 (tri methyl K9)-Verteilung. Im Vergleich der beiden Bilder ist deutliche Inhomogenität der H3 (tri methyl K9)-Verteilung zu erkennen (Parameter zur Dichtebilderstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm).

beeinflussen, soll im Folgenden untersucht werden. An dieser Stelle sollen nun zunächst die erwarteten Resultate der Einzeldistanzverteilungen beschrieben werden, um das Vorgehen in den Abschnitten 7.3.4.1 und 7.3.4.2 zu begründen. Um Heterochromatin per Immunofluoreszenz sichtbar zu machen, wurde die Histonschwanzmodifikation H3 (tri methyl K9) mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs markiert. Wie in Abschnitt 2.2.3.1 wird die Verpackungsdichte der DNA durch Histonschwanzmodifikationen gesteuert [45, 129, 46]. Wenn ein Schaden in einem heterochromatischen Bereich auftritt und lokale Genomumstrukturierungsprozesse nach sich zieht, so wird dies (u. a.) durch Veränderung der Histonschwanzmodifikationen erreicht [63]. Die Umstrukturierung eines heterochromatischen Bereichs zieht somit die Veränderung der Histonschwanzmodifikation H3 (tri methyl K9) nach sich, diese ist dort dann nicht mehr vorhanden und dieser Teil des Chromatins ist kein Heterochromatin mehr.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass jeder H3 (tri methyl K9) markierte Bereich stets über gleichbleibende charakteristische Abstände verfügt, da die charakteristischen Abstände gerade durch diese Histonschwanzmodifikation bedingt werden. Würden deutliche Unterschiede bei den charakteristischen Distanzverteilungen auftreten, dann würde dies der Theorie widersprechen, dass die Dichte der DNA über Histonschwanzmodifikationen gesteuert wird.

7.3.4.1 Einfluss der DNA-Reparatur auf den Heterochromatinanteil in der G2-Phase

Die für das in Abschnitt 7.2.2.1 beschriebene Experiment gewählten Bedingungen sorgen dafür, dass die Zellen während des ganzen Experiments in der G2-Phase sind. Somit werden nur Reparaturvorgänge erlaubt, die in der G2-Phase möglich sind. Die Synchronisation in der G2-Phase wurde durch einen reversiblen CDK1-Inhibitor erreicht (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.1). Die Inhibition von CDK1 sorgt nach heutigem Wissensstand für die Verhinderung des Eintritts in die M-Phase. Zur Rolle von CDK1 bei der DNA-Schaden-Reparatur liegen keine eindeutigen Ergebnisse vor [98], daher bleibt der Einfluss des CDK1-Inhibitors hier unberücksichtigt.

Zunächst musste bestätigt werden, dass die Heterochromatin-Distanzverteilungen sich entsprechend der obenstehenden Annahmen (siehe Abschnitt 7.3.4) verhalten und über gleichbleibende charakteristische Abstände verfügen. Diagramm 7.10 zeigt die Mittelwerte der x -Positionen der Maxima der Einzeldistanzverteilungen für jede Messreihe und bestätigt die Annahme, dass die charakteristische Distanz für alle Heterochromatin-Verteilungen unabhängig von der Zeit nach Bestrahlung übereinstimmt. Durch die aus Abbildung 7.10 gewonnene Bestätigung, dass Heterochromatin sich gemäß der Annahmen verhält und die charakteristische Distanzen übereinstimmen, können nun Gesamtdistanzverteilungen erstellt werden.

Aus diesen Gesamtdistanzverteilungen wird der Anteil an Heterochromatin über die y -Positionen der charakteristischen Maxima der Gesamtdistanzverteilung

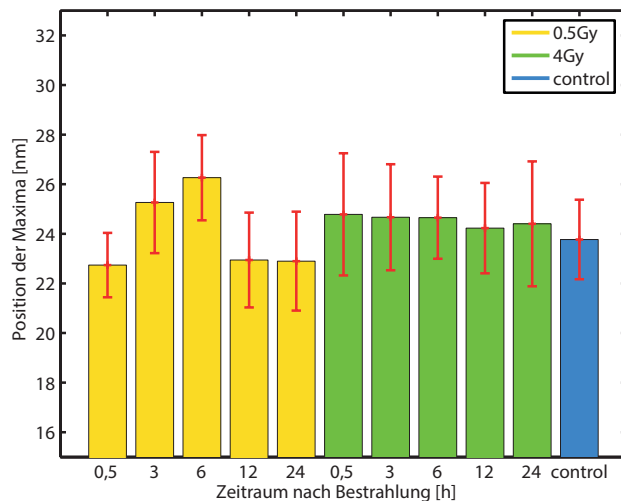


Abbildung 7.10: Mittelwerte der x -Positionen der Maxima für die während der Reparatur und Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen. Für jede Messung wurde die Distanzverteilung und das Maximum der charakteristischen Verteilung bestimmt (ein Beispiel einer Distanzverteilung zeigt Abbildung 7.9). Für alle Verteilungen einer Messreihe wurde der Mittelwert (und die Standardabweichung) der x -Position der Maxima bestimmt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt sich, dass die Werte (bis auf wenige Ausnahmen) innerhalb der Fehler übereinstimmen. Da die Abweichungen im Bereich weniger Nanometer liegen und für diese Berechnungen die Lokalisationsungenauigkeiten (siehe dazu Abschnitt 2.1.5.2 und 3.2.3) nicht berücksichtigt werden konnten, können die Werte als konstant angesehen werden.

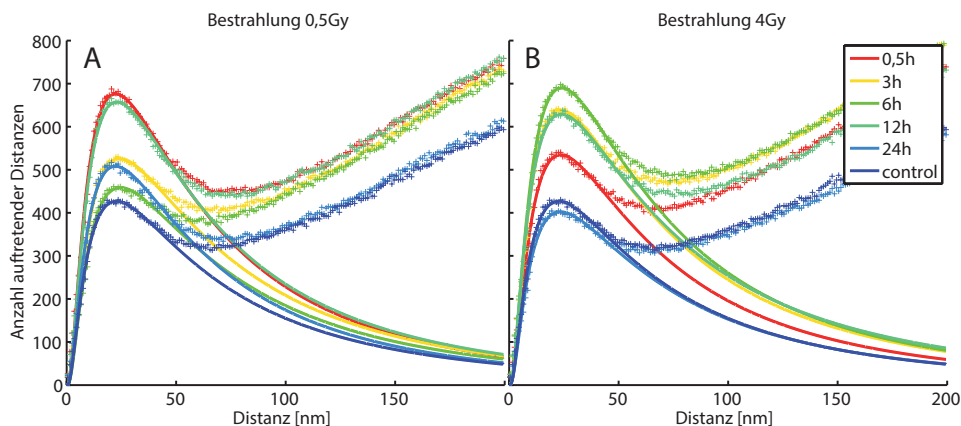


Abbildung 7.11: Gesamtdistanzverteilungen der in der G₂-Phase synchronisierten Zellen. Aus den Einzeldistanzverteilungen werden Gesamtdistanzverteilungen erstellt, die die ganze Messreihe repräsentieren. Auf der x -Achse sind die Distanzen in Nanometer aufgetragen, auf der y -Achse die zugehörige Anzahl, die ein Maß für die Menge an Heterochromatin im Zellkern ist. Durch die gewählten Normierungen kann die Zahl der auftretenden Distanzen für die einzelnen Messreihen verglichen werden.

bestimmt. Dies ist möglich, da die Höhe des Maximums der Distanzverteilung zu der Anzahl von Punkten korreliert, die mit dieser Distanz auftreten. Somit ist der y -Wert dieser Maxima ein Indikator für das auftretende Heterochromatin. Durch Normierung der einzelnen Messreihen auf eine konstante Punktzahl ist es nun möglich, die absolute Anzahl der auftretenden Distanzen zu vergleichen.

Zur Erstellung der Gesamtdistanzverteilungen werden Mittelwerte der Einzelverteilungen berechnet, wie in Abschnitt 6.1 (Unterpunkt 3) beschrieben. So wird nicht nur die Höhe des Maximums der Einzelverteilungen berücksichtigt, sondern auch der Verlauf der Verteilung (z. B. ihre Breite). Als Ungenauigkeit der Bestimmung der y -Position wird die Ungenauigkeit der Anpassung verwendet.

Die berechneten Gesamtdistanzverteilungen mit den Resultaten der Anpassungsfunktionen befinden sich in Abbildung 7.11 A für 0.5 Gy und in Abbildung 7.11 B für 4 Gy. Nochmals bestätigt sich auch für die Gesamtdistanzverteilungen, dass die Positionen der Maxima übereinstimmen und den gemachten Annahmen entsprechen. Um den zeitlichen Verlauf übersichtlicher darzustellen werden die y -Positionen der Maxima nochmals als Balkendiagramme mit den entsprechenden Fehlern angezeigt. Abbildung 7.12 A zeigt dieses Balkendiagramm für 0.5 Gy. Der Kontrollwert kann als Startpunkt und als Endpunkt betrachtet werden, da 24 h nach der Bestrahlung die Reparatur der DNA weitestgehend abgeschlossen sein sollte [63]. Es ist zu erkennen, dass die Anzahl der erreichten Heterochromatinbindungsstellen zunächst zunimmt, obwohl sich die charakteristischen Distanzen nicht ändern. Es ist bekannt, dass Heterochromatin lokale Ansammlungen erhöhter Dichte im Zellkern bildet [127]. Wenn in einem solchen

Bereich ein Schaden auftritt, dann muss die beschädigte DNA entfaltet werden, da nur histonfreie DNA repariert werden kann. Eine solche Reparatur macht Umstrukturierungen der betreffenden Region nötig. Wenn die heterochromatischen Bereiche als relativ abgeschlossene Einheiten mit einem gewissen Volumen und einer entsprechenden Oberfläche ansehen werden, die das besonders dicht verpackte Heterochromatin enthalten, dann kann weiter angenommen werden, dass das Innere dieser Bereiche nur sehr bedingt für Fluoreszenzmarkierungen zugänglich ist. Für die Reparatur innerhalb solcher Bereiche notwendige Umstrukturierungen können die Form und damit die Oberfläche dieser Bereiche vergrößern und somit die Anzahl der erreichbaren Bindungsstellen verändern. Andere Experimente deuten darauf hin, dass Dichteänderungen in bestimmten Grenzen in heterochromatischen Bereichen passieren können, ohne dass es zur Änderung der Histonschwanzmodifikation kommt [126]. Auch auf solche Effekte lässt sich die hier beobachtete erhöhte Anzahl der Bindungsstellen zurückführen. Nach sechs Stunden ist die beobachtete Menge an Heterochromatin wieder auf das Kontrollniveau gefallen. Nach weiteren sechs Stunden ist wieder das Niveau einer halben Stunde erreicht. Die Zellen scheinen zwei Reparaturzyklen zu durchlaufen. Der zweite Zeitraum bis zur Rückkehr auf das Kontrollniveau dauert deutlich länger (mindestens zwölf Stunden, statt sechs Stunden) und zeigt, dass die Zelle hier auf länger dauernde Reparaturverfahren zurückgreift. Da sich die Zelle in der G₂-Phase befindet, steht ihr auch der Reparaturweg zur Verfügung, der fehlerfrei funktioniert und dafür das Schwesterchromosom benötigt. Dieser Reparaturweg benötigt für die Reparatur mehr Zeit [74]. Außerdem ist bekannt, dass die Reparatur von Schäden im Heterochromatin erst verzögert stattfindet [128]. Mechanismen dieser Art können erklären, warum der Heterochromatinanteil innerhalb von 24 h zweimal ansteigt und auf das Kontrollniveau zurückfällt.

Abbildung 7.12 B zeigt den Reparaturprozess für die Bestrahlung mit 4 Gy. Der Verlauf unterscheidet sich von jenem mit 0.5 Gy erheblich. Innerhalb der ersten halben Stunde steigt auch hier der Anteil an Heterochromatin, allerdings sinkt dieser erst wieder nach 24 h, um nach diesem Zeitraum wieder das Kontrollniveau zu erreichen. Mit 0.5 Gy bestrahlte Zellen scheinen in zwei Reparaturzyklen repariert (siehe Abbildung 7.12 A) zu werden. Eine solche Unterteilung in zwei Reparaturzyklen existiert bei einer Bestrahlung mit 4 Gy nicht. Der Anteil von Heterochromatin ist eine halbe Stunde nach Bestrahlung erhöht und erhöht sich weiter, bis er nach sechs bis zwölf Stunden sein Maximum erreicht und erst dann beginnt abzunehmen. Das Kontrollniveau wird erst nach 24 h erreicht. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit 0.5 Gy deuten die Resultate für 4 Gy an, dass die Zelle die Schäden nicht in mehreren Reparaturzyklen repariert. Eine Bestrahlung mit 4 Gy verursacht durch die erhöhte Dosis deutlich mehr Schäden an der DNA im Zellkern [130, 131]. Der Unterschied im zeitlichen Verlauf zwischen den beiden Dosen könnte somit damit zusammenhängen, dass die erhöhte Zahl von Schäden eine Rückkehr auf das Kontrollniveau mit einem anschließenden Beginn eines zweiten Reparaturzyklus nicht möglich macht.

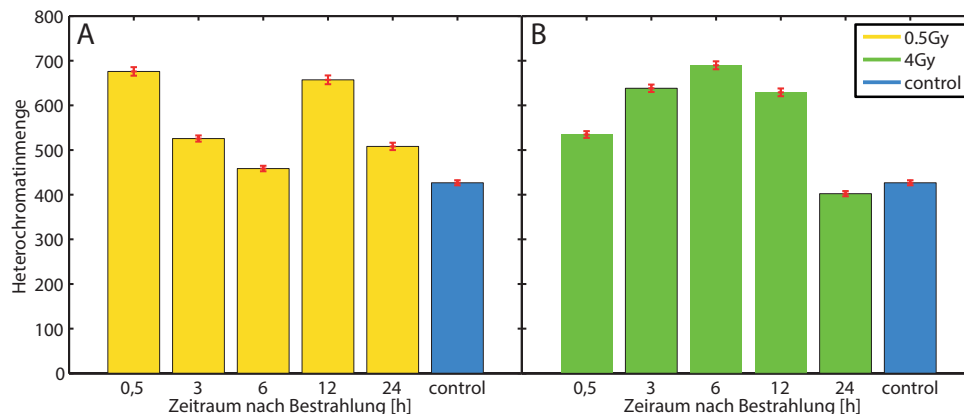


Abbildung 7.12: Anzahl des Auftretens der charakteristischen Distanzen in den Gesamtdistanzverteilungen der in der G2-Phase synchronisierten Zellen. Die Balken repräsentieren die y -Position der Maxima in den Gesamtdistanzverteilungen und sind ein Maß für die gemessenen Heterochromatinbindungsstellen im Zellkern. Dargestellt wird somit, wie sich die Anzahl der Heterochromatinbindungsstellen („Heterochromatinmenge“) im Zellkern nach Bestrahlung verändern. Diese Daten können innerhalb der hier durchgeführten Experimente miteinander verglichen werden, daher ist die *Heterochromatinmenge* hier einheitenlos.

7.3.4.2 Einfluss der DNA-Reparatur auf den Heterochromatinanteil

Das in Abschnitt 7.3.4.1 erläuterte Verfahren wird nun ebenfalls auf die Daten angewendet, die in dem unter Abschnitt 7.2.2.2 beschriebenen Experiment gewonnen wurden. Die während der Bestrahlung in der G2-Phase blockierten Zellen konnten während der Reparatur (d. h. direkt nach der Bestrahlung) ihren Zellzyklus fortsetzen.

Abermals soll bestätigt werden, dass die Heterochromatin-Distanzverteilungen sich entsprechend der obenstehenden Annahmen (siehe Abschnitt 7.3.4) verhalten. Das Diagramm 7.13 zeigt erneut die Mittelwerte der Positionen der Maxima der Einzeldistanzverteilungen für jede Messreihe. Wiederum stimmen die Werte überein und auch hier bestätigt sich die Annahme nach gleichbleibenden charakteristischen Distanzen in H3 (tri methyl K9) markierten Regionen. Das weitere Vorgehen zur Bestimmung des Anteils an Heterochromatin und seiner Veränderung während der Reparatur, entspricht dem in Abschnitt 7.3.4.1 beschriebenen.

Die berechneten Gesamtdistanzverteilungen mit den Resultaten der Funktionsanpassungen befinden sich in Abbildung 7.14 A für 0,5 Gy und in Abbildung 7.14 B für 4 Gy. Auch hier zeigen die Gesamtdistanzverteilungen, dass die Positionen der Maxima übereinstimmen.

Erneut wird auch hier der zeitliche Verlauf zur besseren Übersichtlichkeit durch Balkendiagramme dargestellt.

Alle Zellen befanden sich zu Beginn der Reparatur in der Zellphase G2,

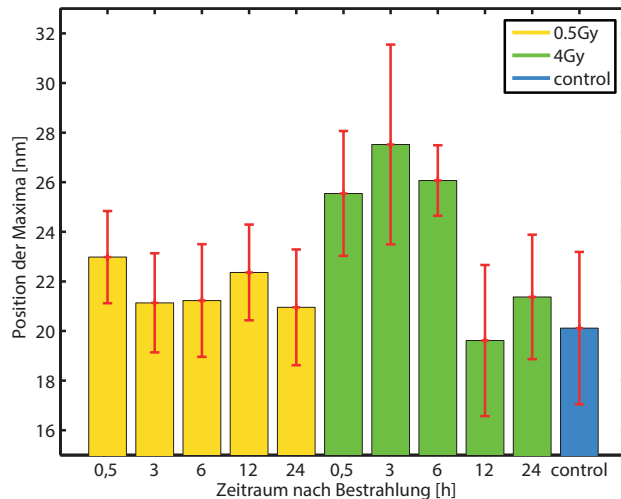


Abbildung 7.13: Mittelwerte der x -Positionen der Maxima für die während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen. Für jede Messung wurde die Distanzverteilung und das Maximum der charakteristischen Verteilung bestimmt (ein Beispiel einer Distanzverteilung zeigt Abbildung 7.9). Für alle Verteilungen einer Messreihe wurde der Mittelwert (und die Standardabweichung) der x -Position der Maxima bestimmt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt sich, dass die Werte (bis auf wenige Ausnahmen) innerhalb der Fehler übereinstimmen. Da die Abweichungen im Bereich weniger Nanometer liegen und für diese Berechnungen die Lokalisationsungenauigkeiten (siehe dazu Abschnitt 2.1.5.2 und 3.2.3) nicht berücksichtigt werden konnten, können die Werte als konstant angesehen werden.

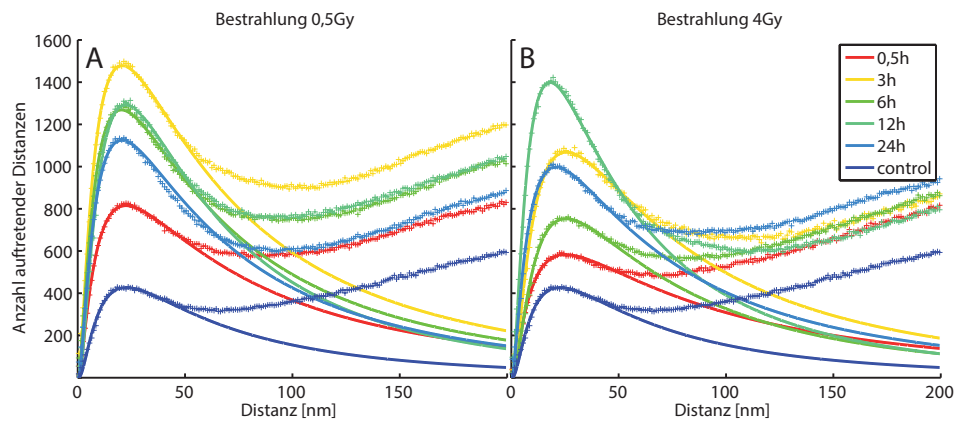


Abbildung 7.14: Gesamtdistanzverteilungen der während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen. Aus den Einzeldistanzverteilungen werden Gesamtdistanzverteilungen erstellt, die die ganze Messreihe repräsentieren. Auf der x -Achse sind die Distanzen in Nanometer aufgetragen, auf der y -Achse die zugehörige Anzahl, die ein Maß für die Menge an Heterochromatin im Zellkern ist. Durch die gewählten Normierungen kann die Zahl der auftretenden Distanzen für die einzelnen Messreihen verglichen werden.

allerdings setzen die Zellen den Zellzyklus unterschiedlich schnell fort. Spätestens nach einigen Stunden sind die Zellen nicht mehr synchronisiert.

Zunächst ist festzustellen, dass die Veränderungen der Anzahl der Heterochromatinbindungsstellen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten verglichen mit Abschnitt 7.3.4.1 deutlich größer sind (ca. zwei- bis dreimal so groß). Es kann aufgrund dieser erheblich größeren Veränderungen angenommen werden, dass diese hier nicht nur durch die Reparaturprozesse, sondern hauptsächlich durch den Zellzyklus bedingt wird. Der Zellzyklus, der auch die Verdoppelung des Chromatins und die anschließende Aufteilung auf zwei neue Zellkerne einschließt (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.2), hat offensichtlich einen erheblichen Einfluss auf das Heterochromatin, der hier höchstwahrscheinlich den Einfluss der Reparaturprozesse überdeckt. Der Verlauf unterscheidet sich zwischen 0.5 Gy und 4 Gy erheblich. Spätestens wenige Stunden nach Entfernung des Zellzyklussynchronisationsmittels sind die Zellen nicht mehr im synchron im Zellzyklus, da sie den Zyklus unterschiedlich schnell fortsetzen und unterschiedlich schnell durchlaufen. Bestrahlungen können darüber hinaus den Zellzyklus beeinflussen, da u.U. erst nach Abschluss bestimmter Reparaturprozesse der Zellzyklus fortgesetzt wird [132].

7.3.5 DNA-Doppelstrangbrüche

7.3.5.1 Heterochromatinstruktur um γ H2AX-Reparaturzentren

Die unter Abschnitt 7.3.4 aufgeführten Resultate zeigen, dass die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden und Analyseverfahren geeignet sind, um mit

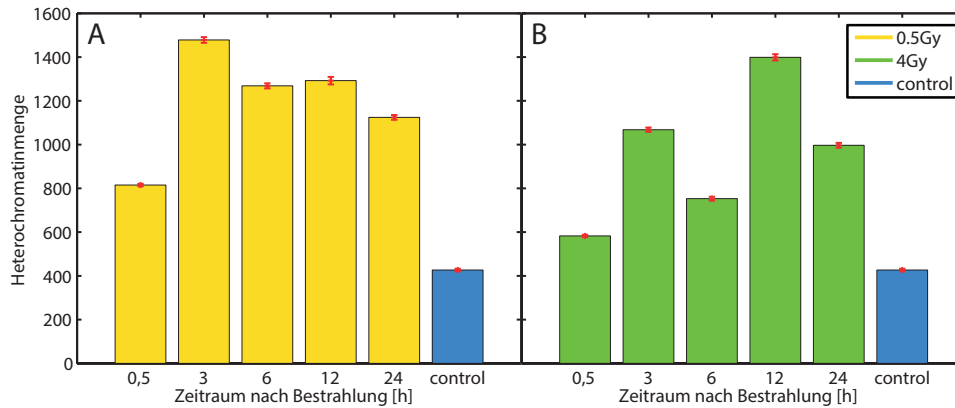


Abbildung 7.15: Anzahl des Auftretens der charakteristischen Distanzen in den Gesamtdistanzverteilungen der während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen. Die Balken repräsentieren die y -Position der Maxima in den Gesamtdistanzverteilungen und sind ein Maß für die gemessenen Heterochromatinbindungsstellen im Zellkern. Dargestellt wird somit, wie sich die Anzahl der Heterochromatinbindungsstellen („*Heterochromatinmenge*“) im Zellkern nach Bestrahlung verändern. Diese Daten können innerhalb der hier durchgeführten Experimente miteinander verglichen werden, daher ist die *Heterochromatinmenge* hier einheitenlos.

Hilfe von Lokalisationsmikroskopie Genomstrukturen zu analysieren.

Wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, bedarf die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur histonfreier DNA und führen Doppelstrangbrüche in heterochromatischen Bereichen zur Bildung von Reparaturzentren an den Rändern dieser Bereiche [76, 77]. Insgesamt scheinen erhebliche DNA-Umstrukturierungsprozesse für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in heterochromatischen Bereichen nötig zu sein. Somit liefert die lokalisationsmikroskopische Analyse der DNA-Doppelstrangbrüche und der Heterochromatinumgebung einen quantitativen Einblick in die relevante biophysikalischen Mechanismen dieser Umorganisation.

Die γ H2AX-Proteine bilden deutlich erkennbare Bereiche erhöhter Dichte um DNA-Doppelstrangbrüche (im Folgenden als γ H2AX-Cluster bezeichnet), die auf komplexe Weise mit Heterochromatin wechselwirken können. Die Abbildungen 7.16 bis 7.18 zeigen beispielhaft drei Zellkerne und Detailansichten eines γ H2AX-Reparaturzentrums. Die mit einer so gegebenen Datenlage verbundenen Herausforderungen für die Analyse sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Abbildung 7.16 A bis C zeigt, dass die γ H2AX-Moleküle „ellipsenförmige“ Ansammlung bilden können, die mit dem umliegenden Heterochromatin wechselwirken, ohne dass es zur kompletten Überlagerung kommt. Diese Darstellung könnte andeuten, dass die Aufnahmen der konventionellen Mikroskopie γ H2AX-Cluster angemessen wiedergeben (siehe dazu auch Abschnitt 7.1 und insbesondere Abbildung 7.1). Abbildung 7.17 A bis C zeigt, dass γ H2AX-Cluster nicht immer

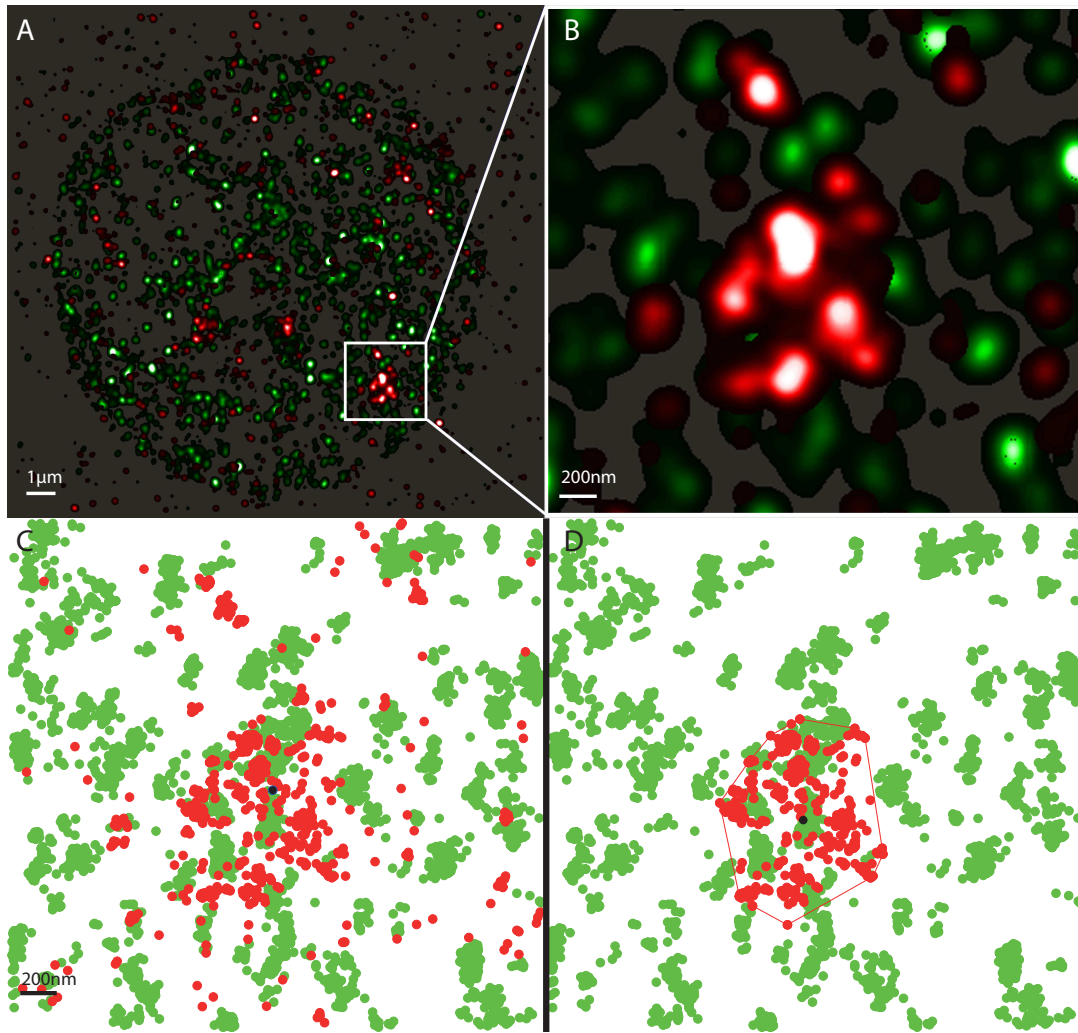


Abbildung 7.16: γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (1 Gy, 30 min nach Bestrahlung). Grün: Heterochromatin. Rot: γ H2AX. A: Gesamtansicht des Zellkerns als Dichtebild (Parameter zur Dichtebildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaussfilterradius=50 nm). B: Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs. C: Darstellung des unter B abgebildeten Ausschnittes, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. In Schwarz ist zusätzlich der Schwerpunkt der Punktverteilung markiert. D: Gleiche Darstellung wie in C, allerdings werden die erkannten Cluster (Clusterparameter: $\epsilon=200$ nm, $N_{min}=50$) dargestellt. Die γ H2AX-Reparaturcluster zeigt sich als „ellipsenförmige“ Ansammlung an γ H2AX-Molekülen, die mit den heterochromatischen Bereichen in Wechselwirkung stehen und es nur zu begrenzter Kollokalisierung kommt.

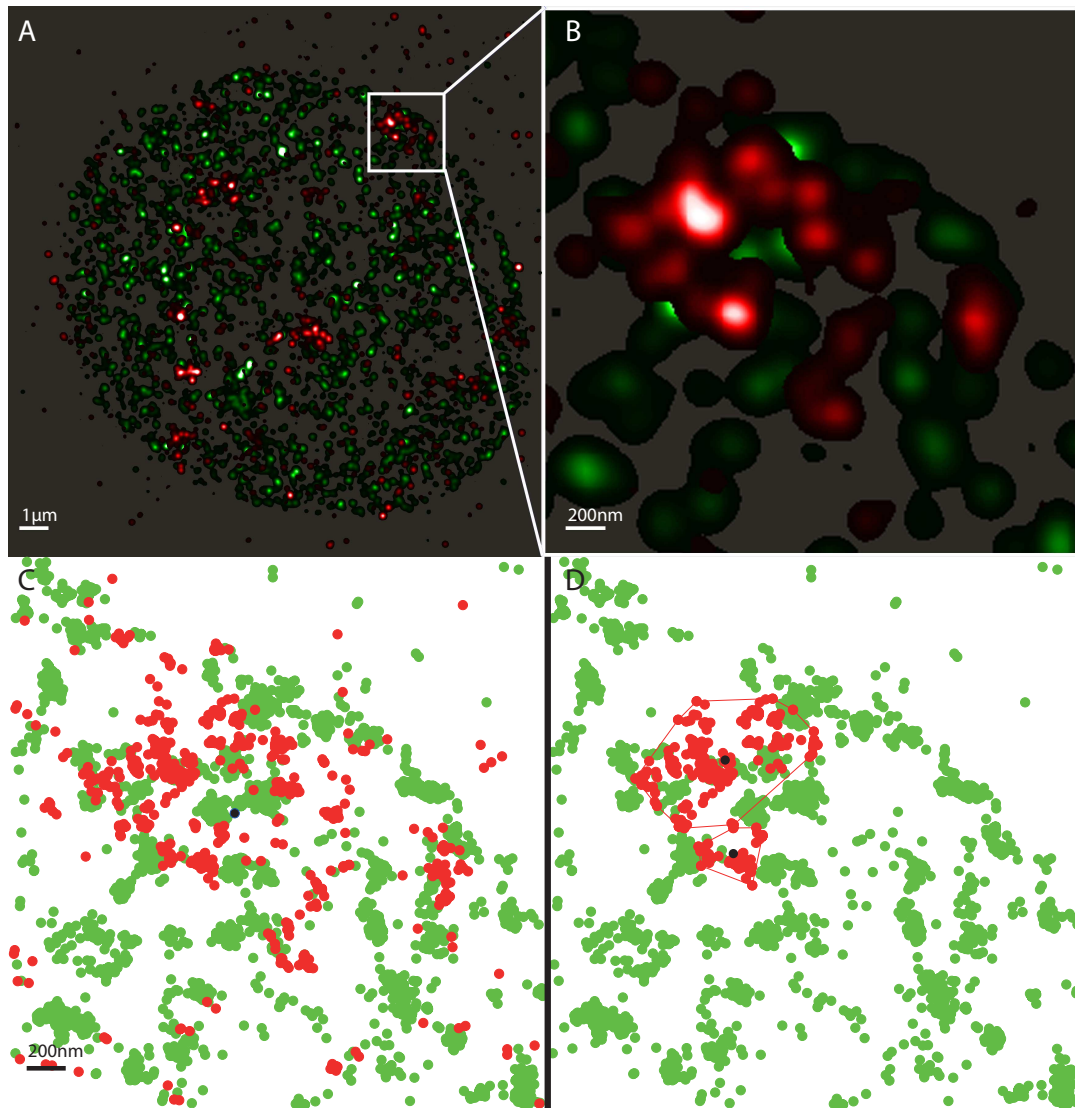


Abbildung 7.17: γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (2 Gy, 30 min nach Bestrahlung). Grün: Heterochromatin. Rot: γ H2AX. A: Gesamtansicht des Zellkerns als Dichtebild (Parameter zur Dichtebildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaussfilterradius=50 nm). B: Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs. C: Darstellung des unter B abgebildeten Ausschnittes, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. In Schwarz ist zusätzlich der Schwerpunkt der Punktverteilung markiert. D: Gleiche Darstellung wie in C, allerdings werden die erkannten Cluster (Clusterparameter: $\epsilon=200$ nm, $N_{min}=50$) dargestellt. Das γ H2AX-Reparaturcluster zeigt eine komplexe ringförmige Struktur. Es ist gut zu erkennen, dass es nur eingeschränkt zu Kolo-kalisation mit den heterochromatischen Bereichen kommt. Bei solch komplex geformten γ H2AX-Reparaturclustern wird die Erkennung des Clusters erheblich durch die Auswahl der Clusterparameter beeinflusst. Diese Clustererkennung sorgt aber dafür, dass die Schwerpunkte der erkannten Cluster stets innerhalb eines γ H2AX-dichten Bereichs liegen.

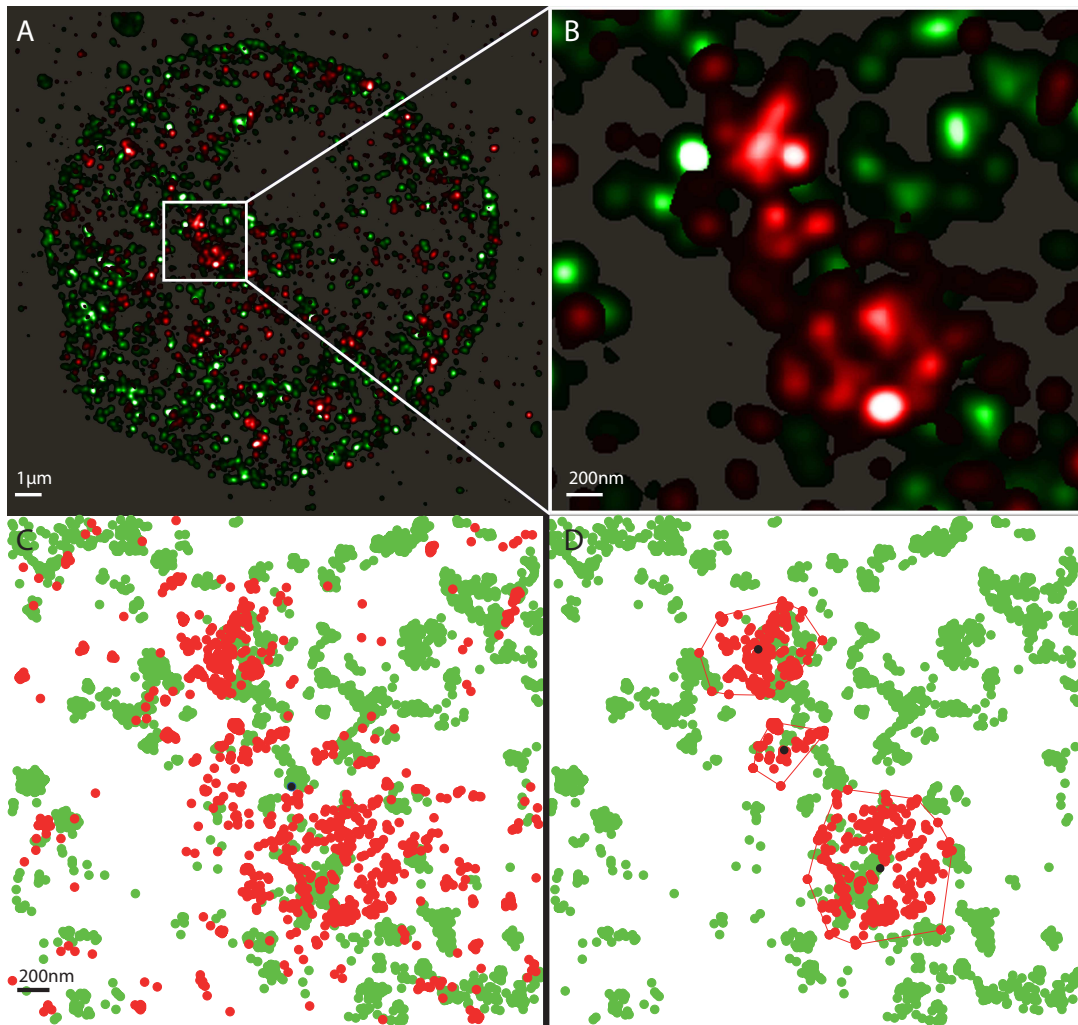


Abbildung 7.18: γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (1 Gy, 30 min nach Bestrahlung). Grün: Heterochromatin. Rot: γ H2AX. A: Gesamtansicht des Zellkerns als Dichtebild (Parameter zur Dichtebildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaussfilterradius=50 nm). B: Vergrößerung des weiß umrandeten Bereichs. C: Darstellung des unter B abgebildeten Ausschnittes, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. In Schwarz ist zusätzlich der Schwerpunkt der Punktverteilung markiert. D: Gleiche Darstellung wie in C, allerdings werden die erkannten Cluster (Clusterparameter: $\epsilon=200$ nm, $N_{min}=50$) dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die Entscheidung, ob ein γ H2AX-Reparaturcluster aus einem Cluster besteht oder zufällig zwei nah beieinander liegen schwierig sein kann. Die gewählten Clusterparameter führen in diesem Fall zur Erkennung von drei Clustern.

homogene Verteilungen dieser Art bilden, sondern ggf. Strukturen, die eher ringförmig sind. Abbildung 7.18 A bis C schließlich zeigt, dass die Entscheidung, ob ein γ H2AX-dichter Bereich aus einem oder mehr Clustern besteht, nicht immer einfach ist.

Im weiteren Verlauf der Analyse werden die γ H2AX-Cluster mit Hilfe des DBSCAN (siehe dazu auch Abschnitt 5.3) gesucht und ausgewählt. Lokalisationsmikroskopie macht durch die nanometergenaue Erkennung von Signalen eine besonders präzise Clusteranalyse möglich.

Allerdings muss die Auswahl der Clusterparameter auch besonders bedacht werden, da diese einen erheblichen Einfluss auf die Form der erkannten Cluster haben. Durch Wahl eines kleinen ϵ werden die Cluster kleine geschlossene Flächen konstanter Dichte sein. Diese Wahl hat den Vorteil, dass der Schwerpunkt des Clusters auch in einem Bereich erhöhter γ H2AX-Dichte liegt. Wird ϵ vergrößert, dann werden auch komplexere Ansammlungen als ein Cluster erkannt und nicht in mehrere aufgeteilt, z. B. die unter Abbildung 7.17 gezeigten eher ringförmigen Strukturen, allerdings kann dabei der Schwerpunkt auch außerhalb des γ H2AX-dichten Bereichs liegen. Neben dem Parameter ϵ kann auch der zweite Clusterparameter N_{min} variiert werden. Bei einem kleinen N_{min} und einem großen ϵ entstehen kleine und komplex geformte Cluster zugleich, die hinsichtlich ihrer Größe und Form inhomogen und somit für eine Analyse ungeeignet sind. Wenn diese Eigenschaften der Clustersuche bekannt sind und bedacht werden sowie die zugrundeliegenden Messdaten eine gleichbleibende Qualität haben, dann garantiert der DBSCAN-Algorithmus bei sinnvoll gewählten Clusterparametern eine gleichbleibende Erkennung der Cluster.

Die Auswahl der Clusterparameter erfolgte durch Vorüberlegungen und durch Vorversuche mit unterschiedlichen Clusterparametern. Zunächst musste dazu festgelegt werden, welche Eigenschaften die Cluster haben sollten. Wichtig war dabei, dass für die später folgende Mehrkanalanalyse (siehe dazu auch Abschnitt 5.7) der Schwerpunkt der erkannten Cluster stets innerhalb eines Bereichs erhöhter γ H2AX-Dichte liegen sollte. Komplexe Ansammlungen von γ H2AX wurden dann ggf. als mehrere Einzelcluster erkannt (siehe dazu z. B. 7.18 D). Nach derzeitigem Verständnis wird davon ausgegangen, dass in einem γ H2AX-dichten Bereich auch mehrere Doppelstrangbrüche repariert werden können [133]. Das Auftreten mehrerer γ H2AX-Cluster (d. h. Reparaturzentrum) in unmittelbarer Nähe ist bei komplizierten DNA-Schäden (z. B. nach Bestrahlung mit Schwerionen) ein beobachtetes Phänomen [134]. Somit ist die Aufteilung solcher komplexen Ansammlungen in mehrere Einzelcluster ein begründetes Vorgehen.

Weiterhin wurde bei der Auswahl die Anzahl der gemessenen γ H2AX-Signale pro Zellkern und Erfahrungen aus vorangegangenen Experimenten zur Größe von γ H2AX-Reparaturzentren berücksichtigt. Stets wurden dabei die Clusterbilder mit den Dichtebildern verglichen, um die Parameter zu überprüfen. Es zeigte sich, dass für dieses Experiment folgende Clusterparameter die gewünschten Resultate liefern: $\epsilon = 200$ nm, $N_{min} = 50$. Dabei werden Cluster homogener Dichte erkannt,

deren Schwerpunkt stets innerhalb eines solchen Bereichs erhöhter Dichte liegt. In den Abbildungen 7.16 bis 7.18 werden unter D beispielhaft die entsprechenden erkannten Cluster gezeigt. Im Folgenden wird nun die Dichte von Heterochromatin um die erkannten γ H2AX-Cluster bestimmt (wie in Abschnitt 5.7 beschrieben), zunächst für die in den Abbildungen 7.16 bis 7.18 gezeigten γ H2AX-Cluster. Die Dichteverteilungen für jedes Cluster wird in Abbildung 7.19 A bis C gezeigt, die Mittelwerte und der Gesamtmittelwert in Abbildung 7.19 D.

Abbildung 7.19 D zeigt, wie inhomogen die Heterochromatindichteverteilung um entsprechende γ H2AX-Cluster sein kann und dass der Mittelwert einer solchen Verteilung die unterschiedlichen Cluster nur schlecht repräsentiert. Um eine sinnvolle Mittelung über mehrere Cluster durchzuführen, sollten daher nur Cluster berücksichtigt werden, die eine Mindestdichte an Heterochromatin überschreiten. Der Schwellwert sollte so gewählt werden, dass nur Cluster berücksichtigt werden, deren Zugehörigkeit zu dem umliegenden Heterochromatin eindeutig ist. Somit kann anschließend die Anzahl und Dichteverteilung der heterochromatinassoziierten Cluster angegeben werden. Je nach Schwellwert werden dabei nur wenige Cluster zugelassen, allerdings ist erst dann eine Mittelwertbildung sinnvollerweise möglich.

Nach Bestrahlung tauchen Doppelstrangbrüche im ganzen Chromatin auf und somit im dicht gepackten Heterochromatin und im loser verpackten Euchromatin (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Für die Doppelstrangbruchreparatur muss die DNA histonfrei vorliegen, daher ist die Auflösung des Nukleosoms in der Nähe von Doppelstrangbrüchen nötig. In anderen Arbeiten (siehe Abschnitt 2.2.4) wurde gezeigt, dass Doppelstrangbruchreparaturzentren sich an den Rändern von heterochromatischen Bereichen befinden, aber niemals direkt in diesen. Darüber hinaus ermöglicht die lokalisationsmikroskopische Analyse eine erheblich genauere Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Heterochromatin und γ H2AX und zeigt eine deutliche Nähe zwischen γ H2AX-Reparaturzentren und heterochromatischen Bereichen. Die Abbildungen 7.16 bis 7.18 zeigen einige Beispiele von γ H2AX-Reparaturzentren, die anscheinend Doppelstrangbrüche aus dem nahegelegenen Heterochromatin reparieren. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit der Theorie, dass Doppelstrangbrüche in heterochromatischen Bereichen an die Peripherie eines solchen Bereichs bewegt werden [76, 77]. Die nanometergenaue Analyse, die in diesem Abschnitt präsentiert wurde, zeigt aber auch, dass die γ H2AX-Reparaturzentren und die heterochromatischen Bereiche auf komplexe Art ineinander übergehen.

Abbildung 7.20 zeigt, dass durch die Analyse der Heterochromatinverteilung um DNA-Doppelstrangbrüche keine Einteilung in Bestrahlungsdosen vorgenommen werden kann. Die Heterochromatinverteilungen zeigen große Ähnlichkeiten und keine signifikanten Abweichungen voneinander. Dieses Resultat ist mit den Vorstellungen von γ H2AX-Reparaturzentren vereinbar. Die Anzahl der Reparaturzentren nimmt mit der Bestrahlungsintensität zu [135] und es kann vorkommen, dass mehrere Reparaturzentren sich vereinen, allerdings sollte der Einfluss auf die Dichte des umliegenden Heterochromatins begrenzt sein, da

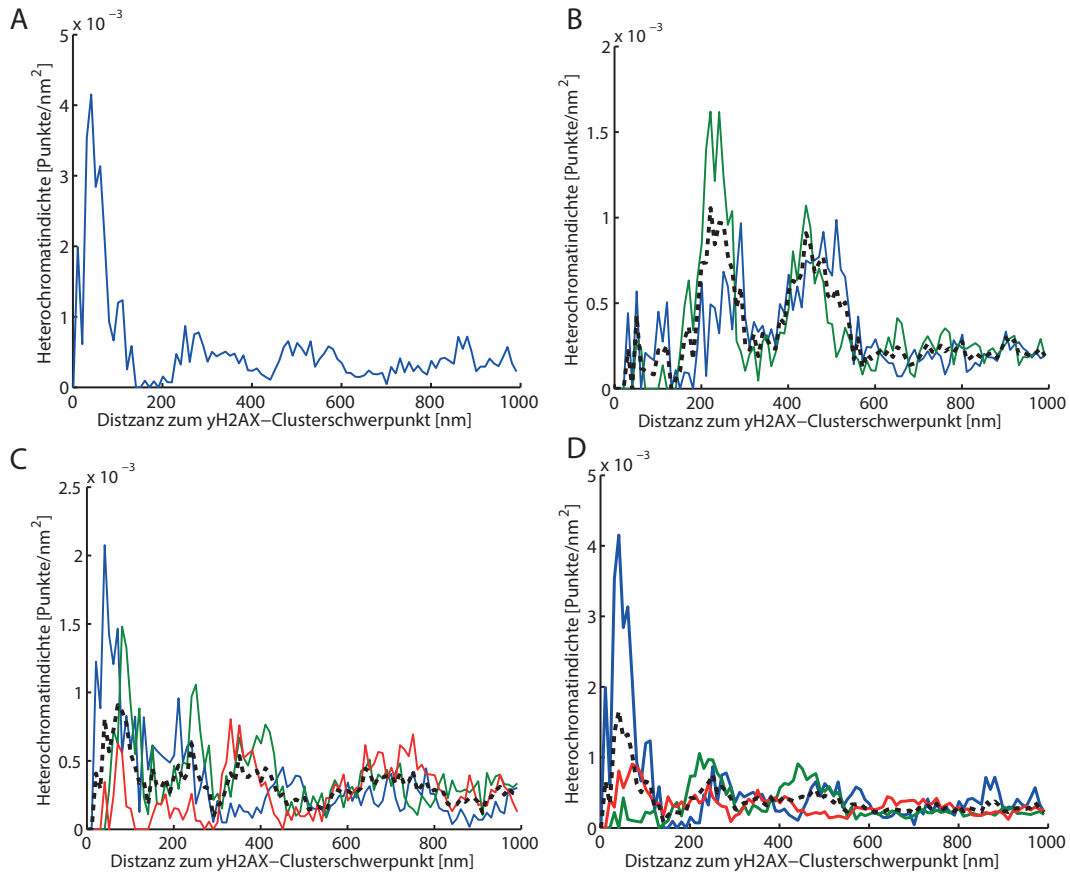


Abbildung 7.19: Heterochromatin-Dichteverteilung um γ H2AX-Cluster. Beispielhafte Dichteverteilungen zu den Clustern in Abbildung 7.16 (A), Abbildung 7.17 (B) und Abbildung 7.18 (C)). A-C: Die durchgezogenen Linien repräsentieren jeweils ein Cluster. Die gestrichelte Linie ist der zugehörige Mittelwert in einem Diagramm. D: Hier werden die Mittelwerte zu A bis C gezeigt. Die schwarze gestrichelte Linie repräsentiert erneut den Mittelwert in diesem Diagramm. Es zeigt sich, dass die Heterochromatindichte um solche Cluster inhomogen sein kann und ggf. die Berechnung von Mittelwerten nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich ist.

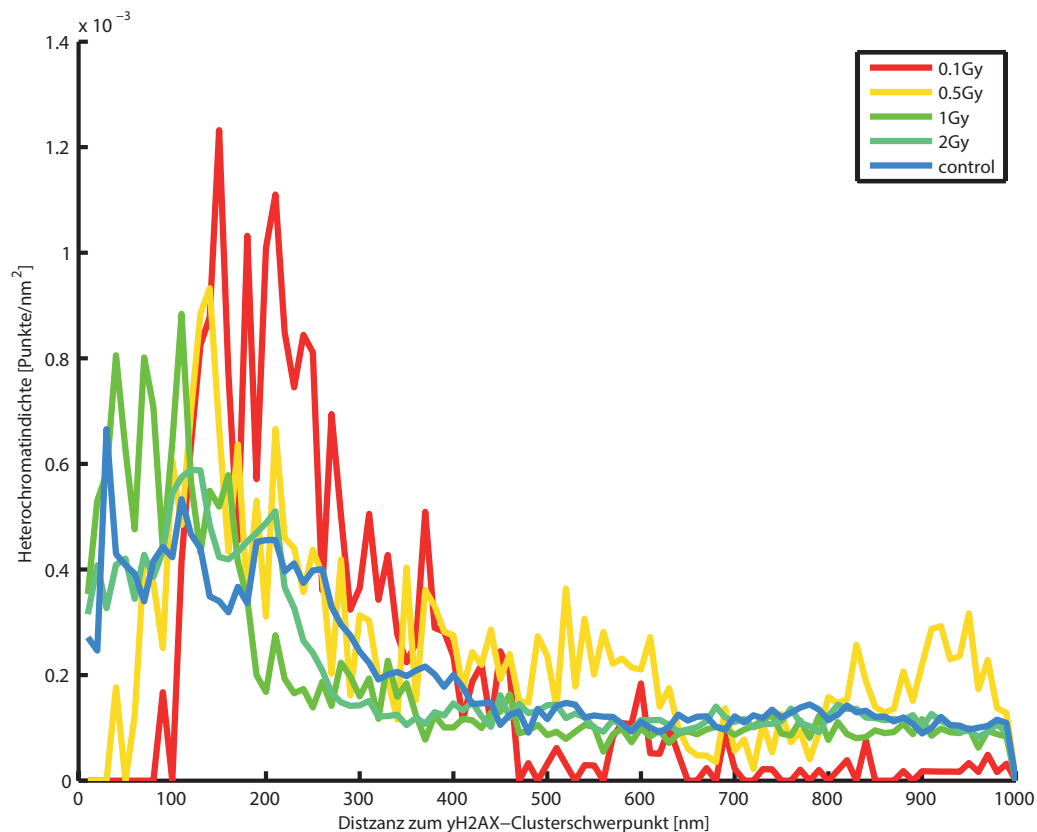


Abbildung 7.20: Mittlere Heterochromatindichteverteilung um γ H2AX-Reparaturzentren. Für diese Analyse wurden nur Cluster zugelassen, deren Heterochromatindichten in dem Bereich von 100 bis 1000 nm den Schwellwert $A=0.001$ Punkte/nm² überschreitet. Dieser Schwellwert ist verglichen mit den auftretenden Dichteverteilungen hoch und lässt somit nur die Cluster zu, die in der Nähe eines heterochromatischen Bereichs mit hoher Dichte liegen. Die Abbildung zeigt, dass die Dichte von Heterochromatin um diese Cluster stets in einem Bereich von bis zu 500 nm erhöht ist (dies wird auch durch Abbildung 7.19, die u. a. die Dichteverteilung einzelner Cluster zeigt, bestätigt). Es zeigt sich außerdem, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Heterochromatinverteilungen bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen gibt.

nur ein kleiner Teil des Heterochromatins in histonfreie DNA umgewandelt wird. Die ggf. notwendigen Umstrukturierungsprozesse des Chromatins passieren bereits während der Ausbildung des γ H2AX-Clusters und können über die hier verwendete H3 (tri methyl K9)-Markierung nicht sichtbar gemacht werden. Eine Umstrukturierung und damit die Verringerung der Dichte würde mit der Veränderung der Histonschwänze einhergehen (siehe dazu auch Abschnitt 7.3.4).

Es konnte gezeigt werden, dass die Heterochromatindichte in der nahen Umgebung von γ H2AX-Clustern unabhängig von der Bestrahlungsdosis ist. Auch konnte lokalisationsmikroskopisch gezeigt werden, dass Doppelstrangbrüche, die im Heterochromatin auftreten, an den Rand von heterochromatischen Bereichen transportiert werden [76, 77]. Die für einen solchen Transport notwendigen Umstrukturierungen im dichten Heterochromatin müssen erheblich sein. Mit Hilfe der in diesem Abschnitt verwendeten Dichteanalyse ist es möglich eine Einteilung der γ H2AX-Clusters in Abhängigkeit ihrer Nähe zu Heterochromatin vorzunehmen. Durch eine solche Einteilung können Cluster ausgewählt werden, bei denen angenommen werden kann, dass in ihnen Doppelstrangbrüche aus heterochromatischen Bereichen repariert werden. Ob und inwieweit ein γ H2AX-Cluster durch die Nähe zu Heterochromatin strukturell beeinflusst wird, soll im folgenden Abschnitt 7.3.5.2 analysiert werden.

7.3.5.2 Topologische Analyse der Struktur von γ H2AX-Reparaturzentren

Wie in Abschnitt 7.3.5.1 gezeigt, unterliegt die Dichteverteilung von Heterochromatin um γ H2AX-Reparaturzentren erheblichen Schwankungen. Dies zeigt, dass bestimmte γ H2AX-Reparaturzentren in direkter Nachbarschaft zu Heterochromatin auftauchen und andere zu heterochromatischen Bereichen nicht assoziiert sind. Der in Abschnitt 5.8 vorgestellte Ansatz soll hier auf γ H2AX-Reparaturzentren angewendet werden, um zu analysieren, ob die Nähe zu Heterochromatin einen Einfluss auf die Struktur der γ H2AX-Reparaturzentren hat.

Die nachfolgende Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Andreas Hofmann, M.Sc.¹ durchgeführt. Das Konzept des topologischen Ähnlichkeitsmaßes von Punktdaten stammt aus der theoretischen Physik. Die Anwendung und Umsetzung des Ansatzes wurde gemeinsam erarbeitet. Die Ergebnisse dieses Kapitels resultieren aus gleichwertigem Beitrag.

Das Vorgehen wird in Abbildung 7.21 zusammenfassend dargestellt. Zunächst wurden γ H2AX-Cluster per DBSCAN (wie in Abschnitt 7.3.5.1) bestimmt. Aus den erkannten Clustern konnte dann mit Hilfe der unter Abschnitt 5.3 vorgestellten Methoden der Schwerpunkt S bestimmt werden. Darüber hinaus sollte ein Maß für den Clusterdurchmesser gefunden werden. Da die Cluster polygonförmig sind, wurde das quadratische Mittel der Punkte der konvexen Hülle als Clusterdurchmesser definiert (siehe dazu auch Abschnitt 5.3). Die Heterochromatindichteverteilung um γ H2AX-Cluster wurde, wie in Abschnitt 5.7

¹Statistische Physik und Biophysik, Institut für Theoretische Physik, Philosophenweg 19, 69120 Heidelberg

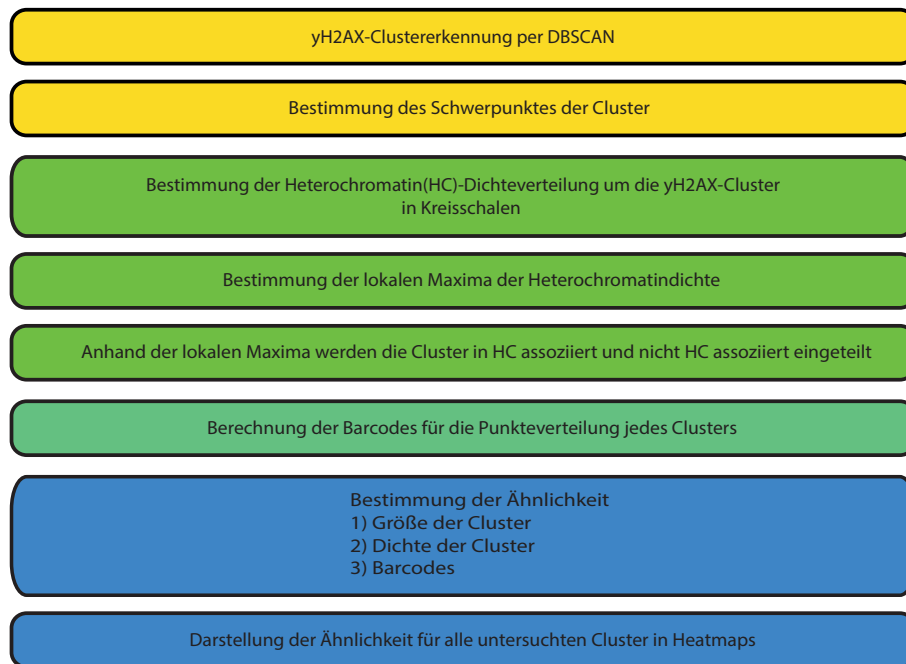


Abbildung 7.21: Vorgehen bei der topologischen Datenanalyse.

beschrieben, bestimmt. Es wurde der Bereich von 50 nm bis 1500 nm um den Clusterschwerpunkt analysiert.

Anhand dieser Dichteverteilung wurden die Cluster in HC- und nHC-Cluster (d. h. in heterochromatinassoziierte und nicht-heterochromatinassoziierte) eingeteilt. Dazu wurden die lokalen Maxima der Dichteverteilung bestimmt (siehe dazu auch Abbildung 7.22 B). Die nötige Ausdehnung der Kreisschalen, die für die Erstellung der Dichteverteilung nötig ist (siehe Abschnitt 5.7), beeinflusst diese Einteilung. Eine zu kleine Schrittweite (z. B. 1 nm) führt zu einer Verteilung mit sehr vielen lokalen Maxima und Minima, da die Dichte sich in solch kleinen Kreisschalen deutlich ändern kann. Durch die kleine Ausdehnung ist es möglich, dass sich in einer Kreisschale kein Punkt befindet und in der nächstgelegenen eine gewisse Zahl von Punkten. Durch die geringe Fläche der Kreisschalen entstehen dadurch erhebliche Dichtesprünge, die methodisch bedingt sind und die wirkliche Dichteverteilung nur schlecht abbilden. Eine zu große Schrittweite führt allerdings dazu, dass zu wenige Details der Verteilung abgebildet werden.

Als Schrittweite für die Dichteanalyse wurde 25 nm gewählt. Diese Schrittweite sorgt dafür, dass die lokalen Maxima in der Dichteverteilung erkennbar sind, ohne dabei die Details der Verteilung zu verlieren (siehe dazu auch Abbildung 7.22 B). Bei der Erkennung der lokalen Maxima wurde wie folgt vorgegangen: Ein lokales Maximum muss mindestens die Amplitude $A = 2.5 \times 10^{-4}$ Punkte/nm² haben und darf nicht weiter vom Clusterschwerpunkt als $R = 250$ nm sein, wobei hier beachtet werden muss, dass der Bereich von 0 bis 50 nm bereits bei der Bestimmung

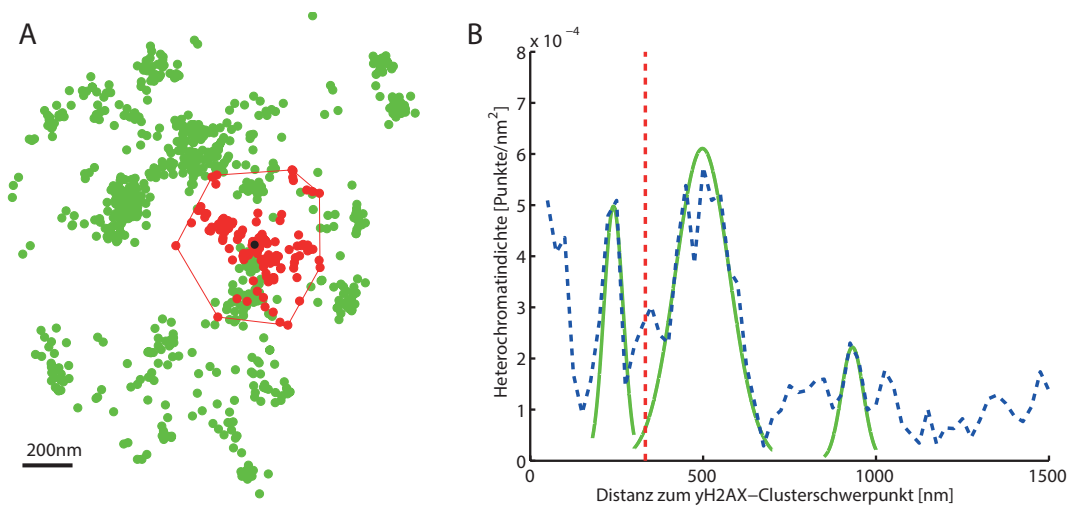


Abbildung 7.22: Dichteverteilung um γH2AX -Cluster. A: Schematische Darstellung eines per DBSCAN erkannten γH2AX -Clusters (rot), des zugehörigen Schwerpunkts (schwarz) und des sich um diesen befindlichen Heterochromatins (grün). B: Dichteverteilung von Heterochromatin um den γH2AX -Cluster-Schwerpunkt (blau). Diese Dichteverteilung wird zur Einteilung verwendet, ob ein Cluster heterochromatinassoziiert ist. Dazu werden die lokalen Maxima durch Gaußfunktionen (grün) angenähert. Die Amplitude dieser Maxima wird dann mit dem vorgegebenen Schwellwert verglichen. Die rote Linie repräsentiert die halbe mittlere quadratische Distanz der konvexen Hülle des Clusters (d. h. eine Art „Radius“ des Clusters.)

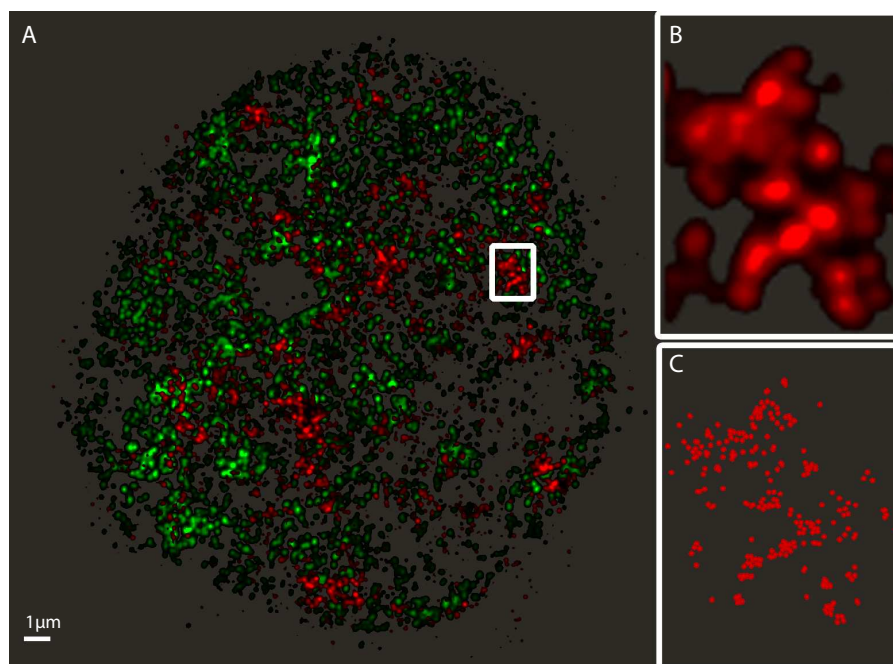


Abbildung 7.23: Darstellung eines Zellkerns und γ H2AX-Reparaturclusters, anhand dessen beispielhaft die Erstellung des Barcodes gezeigt wird. A: Gesamtansicht von Heterochromatin (grün) und γ H2AX (rot) des Zellkerns als Dichtebild (Parameter zur Dichtebilderstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaußfilterradius=50 nm). B: Darstellung des zu untersuchenden γ H2AX-Clusters als Dichtebild (rot). C: Darstellung des unter B abgebildeten Clusters, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. Abbildung 7.24 zeigt die Erstellung des Barcodes für diese Punktverteilung

der Dichteverteilung nicht berücksichtigt wird, da dieser oft zu methodischen Artefakten führt (nähere Erläuterungen dazu in Abschnitt 6.4). Der Wert für die Amplitude A wurde in Vorexperimenten bestimmt, wobei nach automatischer Einteilung die Mikroskopbilder der γ H2AX-Cluster und des umliegenden Heterochromatins einer Überprüfung unterzogen wurden. Für den Abstand zum Clusterschwerpunkt R wurde kein Mindestwert, sondern nur ein Maximalwert gewählt, da die polygonförmigen Cluster häufig auf komplexe Weise mit dem Heterochromatin wechselwirken und der Schwerpunkt somit leicht nahe am heterochromatischen Bereich liegen kann. Darüber hinaus sollten die lokalen Maxima einen Abstand von mindestens 150 nm voneinander haben, um die Erkennung von zwei lokalen Maxima, die eigentlich einem Heterochromatinbereich zugehören, zu vermeiden.

Aus den so klassifizierten Clustern wurden 200 HC-Cluster und 200 nHC-Cluster ausgewählt, indem die mit der höchsten bzw. niedrigsten Heterochromatindichte bestimmt wurden. Die Zahl von zweimal 200 Clustern wurde ausgewählt, da diese Gruppe einerseits groß genug ist, sodass statistische Ausreißer nicht stark ins Gewicht fallen, aber andererseits klein genug, um noch jedes einzelne Cluster

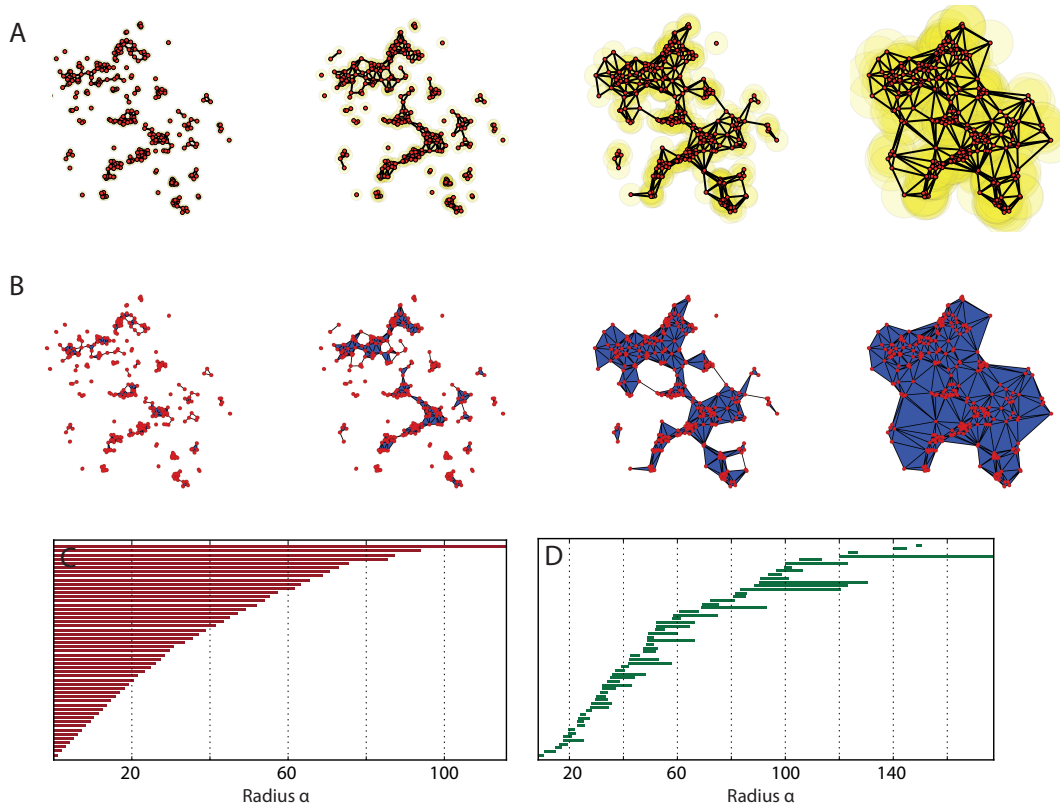


Abbildung 7.24: Bestimmung des Barcodes eines γ H2AX-Clusters (weitere Darstellungen des Zellkerns und des Cluster in Abbildung 7.23). A: Darstellung der Punkte mit unterschiedlichen α -Umgebungen. B: Darstellung der gebildeten Komponenten zu den jeweils darüber dargestellten α -Umgebungen. C: Barcodeansicht für die Linien. D: Barcodeansicht für die Löcher. (Nähere Erläuterungen zu den Barcodes befinden sich in Abschnitt 5.8).

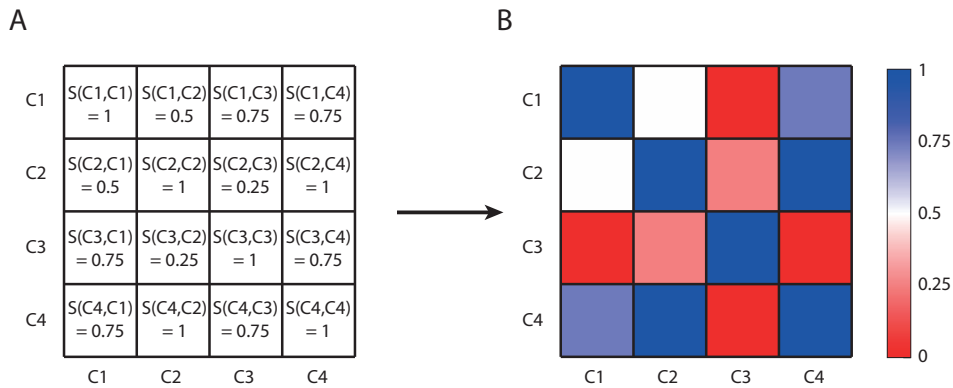


Abbildung 7.25: Schematische Darstellung einer Heatmap. In diesem Beispiel werden vier Cluster (C1-C4) miteinander verglichen. A zeigt die Ergebnisse der Funktion S (siehe Abschnitt 5.8) für die Ähnlichkeit der Cluster. Diese Werte werden dann farblich codiert und wie in B dargestellt.

auf Mikroskopdarstellungen betrachten und ggf. die zugehörigen Dichteverteilungen überprüfen zu können. Mit Hilfe der unter Abschnitt 5.8 vorgestellten Methoden wurde die Struktur jedes Clusters mit Hilfe der Barcodes charakterisiert (siehe Abbildung 7.24). Die Ähnlichkeit der Barcodes wurde dann mit der unter Abschnitt 5.8 vorgestellten Methode berechnet. Um diese Vergleiche zu visualisieren wurde eine Heatmapdarstellung gewählt.

In einer Heatmap kann der Vergleich zwischen zahlreichen Clustern dargestellt werden. Zunächst muss dazu eine Rücksicht festgelegt werden, unter der die Clustern verglichen werden. Z.B. das in Abschnitt 5.8 vorgestellte Ähnlichkeitsmaß für Barcodes. Dieses Ähnlichkeitsmaß berechnet für zwei Barcodes, die die Struktur der Cluster repräsentieren, einen Wert zwischen 0 für völlig verschieden und 1 für sehr ähnlich. Zur besseren Übersichtlichkeit können diesen Werten Farben zugeordnet werden und in einer Heatmap (wie in Abbildung 7.25 schematisch gezeigt) dargestellt werden. Diese beispielhaft gezeigte Heatmap vergleicht nur vier fiktive Cluster (C1-C4) miteinander, sodass insgesamt 16 Vergleichswerte berechnet werden. Für einen solchen Fall ist diese Darstellung nur bedingt nützlich. Werden aber wie in dem hier vorliegenden Fall 400 Cluster miteinander verglichen, dann kann diese Darstellung sehr hilfreich sein. Hier (Abbildung 7.26 bis 7.28) wurden die Heatmaps wie folgt angeordnet: Das obere linke Viertel vergleicht die HC-Cluster miteinander, das untere rechte die beiden nHC-Cluster. Das rechte obere und linke untere Viertel vergleicht jeweils nHC mit HC-Clustern. In dieser Darstellung ist es dann leicht möglich Regelmäßigkeiten zu erkennen. Z. B. ob sich alle Cluster gleich ähnlich sind, es bestimmte Ausreißer gibt oder auch ob bestimmte Bereiche erhöhter Ähnlichkeit auftreten. Das in Abschnitt 5.8 vorgestellte Ähnlichkeitsmaß wurde verwendet, um die γ H2AX-Clusterstruktur miteinander zu vergleichen (siehe Abbildung 7.27

und 7.28). Zusätzlich wurden die mittlere Dichte der Cluster und die Größe der Cluster in Heatmaps verglichen (siehe Abbildung 7.26). Als Maß für die Ähnlichkeit der Dichte (bzw. Größe) wurde die Differenz der Dichte (bzw. der Größe) von zwei Clustern verwendet. Eine kleine Differenz bedeutet hier eine große Ähnlichkeit.

Ganz besonders deutlich in Abbildung 7.26 A ist in der Mitte der Heatmap ein Art Kreuz zu erkennen und sehr deutlich auch einige rote Linien. (Rot bedeutet hier deutliche Unähnlichkeit). Viele dieser Cluster, die diese Unähnlichkeit in der Dichte aufweisen sind deutlich kleiner als die mittlere Größe der Cluster. Solche kleine Clustern weisen eine höhere Dichte als die anderen untersuchten Cluster auf. Weiterhin sind keine weiteren Regelmäßigkeiten sichtbar erkennbar. Vor allem sind solche Regelmäßigkeiten nicht erkennbar, wenn die Teile (Vergleich von HC/HC, HC/nHC, nHC/nHC) der Heatmap betrachtet werden. Im Hinblick auf Dichte und Größe der Cluster scheint die Nähe zu Heterochromatin keinen Einfluss auf die Cluster zu nehmen.

Abbildung 7.27 zeigt die Ähnlichkeit der Cluster unter Benutzung des unter Abschnitt 5.8 vorgestellten Ähnlichkeitsmaßes. Dabei werden die Clusterstrukturen durch Barcodes charakterisiert, wobei diese Barcodes nochmals in die Barcodes für „Linien“ und „Löcher“ unterschieden werden können. (Genauere Beschreibungen hierzu finden sich in Abschnitt 5.8). Abbildung 7.27 A zeigt die Ähnlichkeit der Barcodes der Linien und Abbildung 7.27 B die Ähnlichkeit der Löcher-Barcodes. Abbildung 7.28 schließlich zeigt den Mittelwert aus beiden. Erneut sind wieder die Kreuze zu erkennen, die obenstehend bei den Heatmaps zur Dichte bereits erläutert wurden. Sie sind auf Dichteunterschiede dieser Cluster vom Mittelwert zurückzuführen. Solche Dichteunterschiede wirken sich auch auf die topologische Ähnlichkeit aus, daher sind diese Kreuze hier erneut sichtbar. Natürlich wäre es möglich gewesen diese Cluster, die das Kreuz bilden und eine noch näher zu analysierende Sondergruppe darstellen, auszusortieren. Hier aber soll die Praktikabilität dieser Methode gezeigt werden, daher wurden die durch das vorgestellte Verfahren ausgewählten Cluster keiner Aussortierung unterzogen. Die Zahl von 400 Clustern, die für diese Analyse verwendet wurden, ist ausreichend groß, sodass Ausreißer, wie die das auffällige Kreuz bildende Cluster, nicht ins Gewicht fallen.

Abbildung 7.27 A zeigt die Ähnlichkeit der Linien, wobei erkennbar ist, dass es auch hier keine Regelmäßigkeiten gibt, ähnliches zeigten die Darstellungen zur Dichte und Größe der Cluster. Abbildung 7.27 B, die die Ähnlichkeit der Löcher darstellt, zeigt ein anderes Bild. Hier ist die deutlich erhöhte Ähnlichkeit der HC-Cluster zueinander gut zu erkennen. Die Nähe eines γ H2AX-Clusters zu Heterochromatin hat einen deutlichen messbaren Einfluss auf seine Struktur. Interessanterweise sind die nHC- und HC-Cluster sich ähnlicher als die nHC-Cluster untereinander. Es ist deutlich zu erkennen, dass einerseits die Nähe zu Heterochromatin die Struktur der Cluster beeinflusst, aber andererseits, dass es weitere γ H2AX-Cluster-beeinflussende Faktoren gibt, ansonsten wäre die Ähnlichkeit zwischen nHC- und HC-Clustern nicht erklärbar. Abbildung 7.28,

die den Mittelwert aus A und B darstellt, zeigt ein ähnliches Aussehen der Heatmap wie Abbildung 7.27 B.

Welche Ursachen die heterochromatinspezifischen γ H2AX-Cluster-Strukturen auslösen kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. In jedem Fall scheinen die erheblichen Umstrukturierungsprozesse, die nötig sind, um ein γ H2AX-Reparaturzentrum im Heterochromatin einzurichten [76, 77], sich direkt auf die Struktur dieses Reparaturzentrums auszuwirken.

7.3.6 Alu-DNA-Sequenzen nach Bestrahlung

7.3.6.1 Einfluss der Bestrahlung auf die Anzahl der Alu-Sequenzen

Alu-Sequenzen haben einen noch nicht näher bekannten Einfluss auf die Reparatur der DNA [85]. Hier soll zunächst der Einfluss von Bestrahlung auf Alu-Sequenzen analysiert werden. Die Alu-Combo-FISH-Sonde trägt ein Fluorophor und bei passender Basenfolge kann eine Sonde am entsprechenden DNA-Stück binden. Die Sonde erreicht niemals alle möglichen Bindungsstellen. Sterische Gründe spielen dabei eine Rolle, ebenso auch, dass einzelne gebundene Sonden mit den ungebundenen bei dem im Rahmen der Präparation nötigen Waschschritten wieder entfernt werden. Ein Lokalisationsmikroskop kann darüber hinaus niemals alle vorhandenen Fluorophore aufnehmen, da die Rückkehr der Fluorophore aus dem Dunkelzustand stochastisch verläuft und Teile der Fluorophore ggf. während der Aufnahme dauerhaft dunkel bleiben (siehe dazu auch 2.1.4.2). Die gemessene Zahl der Fluorophore entspricht daher nicht der tatsächlichen Anzahl von Alu-Sequenzen im Zellkern. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Markierungseffizienz (d. h. der Anteil der durch Sonden erreichten Alu-Sequenzen) bei gleichbleibender Präparation (siehe dazu auch Abschnitt 4) konstant ist. Ebenso kann bei gleichbleibenden Mikroskopeinstellungen davon ausgegangen werden, dass auch der Anteil der gemessenen Fluorophore konstant ist. Wenn also Markierungs- und Wahrnehmungseffizienz konstant sind, dann ist die Anzahl der gemessenen Fluorophore ein Indikator für die Anzahl der Alu-Sequenzen im Kern. Es zeigt sich, dass die Anzahl der gemessenen Fluorophore pro Zellkern mit steigender Bestrahlungsdosis abnimmt. Zwischen der Dosis und der Anzahl der gemessenen Alu-Sequenzen herrscht ein quadratischer Zusammenhang, wie Abbildung 7.29 zeigt.

Dieses Phänomen, das ausschließlich unter Benutzung von hochauflösender Mikroskopie sichtbar gemacht werden konnte, bedarf weiterer Analysen, um den zugrundeliegenden Mechanismus zu verstehen. Die Datenlage reicht nicht aus, um mehr als Erklärungsansätze zu präsentieren. Mögliche Gründe für das geschilderte Phänomen:

- Bestrahlungen lösen eine Reihe von Schäden im Genom aus (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.4). Schäden an der Basenfolge führen dazu, dass die Sonden nicht mehr an der entsprechenden Stelle binden, da die Basenfolge nicht mehr exakt zur DNA passt.

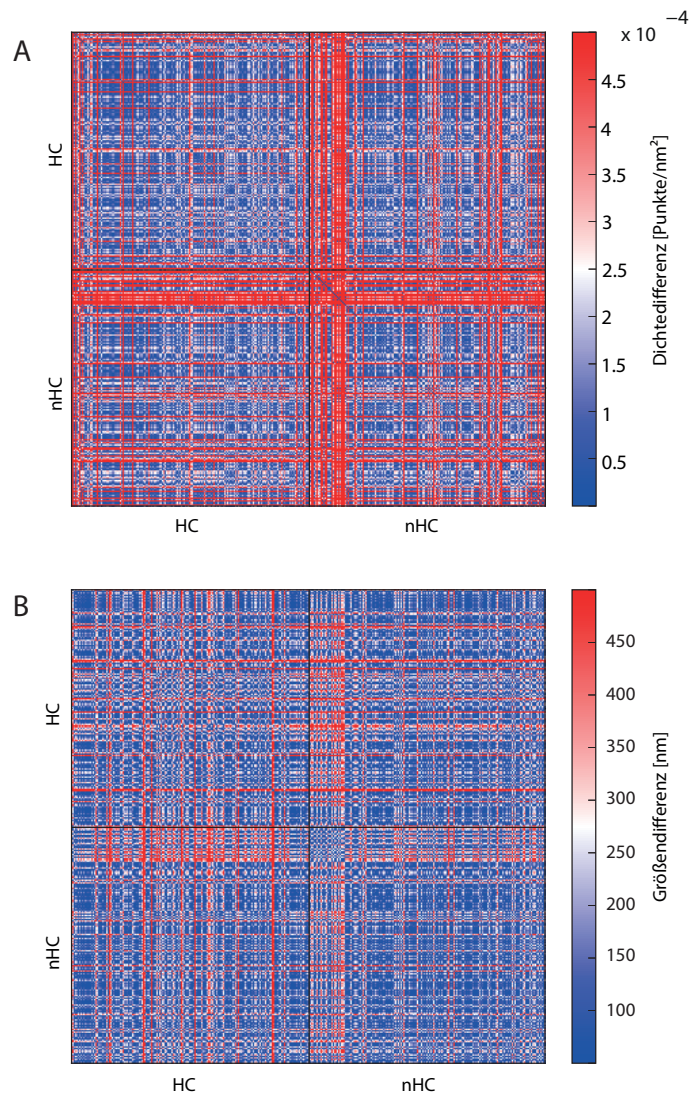


Abbildung 7.26: Dichte- und Größenvergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung. HC repräsentiert die heterochromatinassoziierten Cluster, nHC die nicht-heterochromatinassoziierten. Jeder Pixel der Darstellung repräsentiert die Ähnlichkeit zweier Cluster. Das obere linke Viertel vergleicht demnach die HC-Cluster miteinander, das untere rechte die beiden nHC-Cluster. Das rechte obere und linke untere Viertel vergleicht jeweils nHC- mit HC-Clustern. Zur Bestimmung der Ähnlichkeit wurde die Differenz der mittleren Dichte (bzw. der Größe) zweier Cluster gebildet. Eine hohe Differenz steht für niedrige Ähnlichkeit (rot), eine niedrige für hohe Ähnlichkeit (blau). A: Vergleich der mittleren Dichte der Cluster. B: Vergleich der Größe der Cluster. Es ist zu erkennen, dass die meisten Cluster sich in Dichte und Größe ähnlich sind. Spezifisch den HC- oder nHC-Cluster zugehörige Regelmäßigkeiten sind nicht erkennbar.

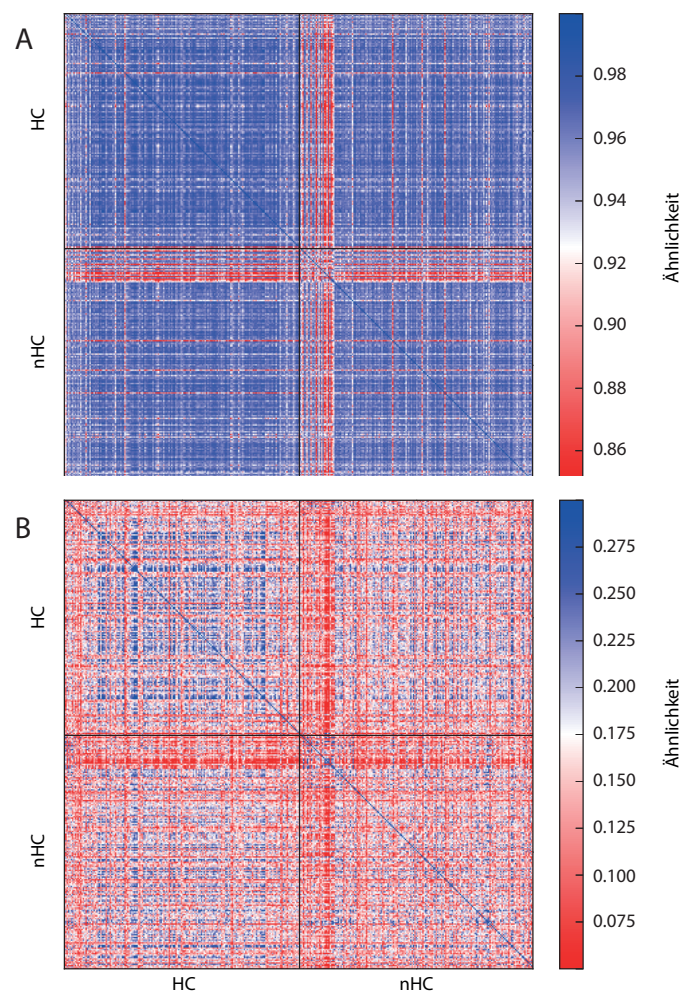


Abbildung 7.27: Topologischer Vergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung. HC repräsentiert die heterochromatinassoziierten Cluster, nHC die nicht-heterochromatinassoziierten. Jeder Pixel der Darstellung repräsentiert die Ähnlichkeit zweier Cluster. Das obere linke Viertel vergleicht demnach die HC-Cluster miteinander, das untere rechte die beiden nHC-Cluster. Das rechte obere und linke untere Viertel vergleicht jeweils nHC- mit HC-Clustern. Hier werden die Barcodes der einzelnen Cluster gemäß der in Abschnitt 5.8 vorgestellten Methode verglichen. Das dort vorgestellte Ähnlichkeitsmaß wird in der Heatmap abgebildet. Blau steht für hohe Ähnlichkeit und Rot für niedrige. Die Ähnlichkeit kann Werte von 0 bis 1 annehmen. A: Es werden die Barcodes der „Linien“ verglichen. Die Barcodes der Linien zeigen ein hohes Maß an Ähnlichkeit, aber keine spezielle Ähnlichkeit der HC- oder nHC-Cluster zueinander. B: Es werden die Barcodes der „Löcher“ verglichen. Deutlich zu erkennen ist, dass die HC-Cluster sich untereinander ähnlicher sind, als die HC- und nHC-Cluster oder die nHC-Cluster untereinander. Fortsetzung in Abbildung 7.28.

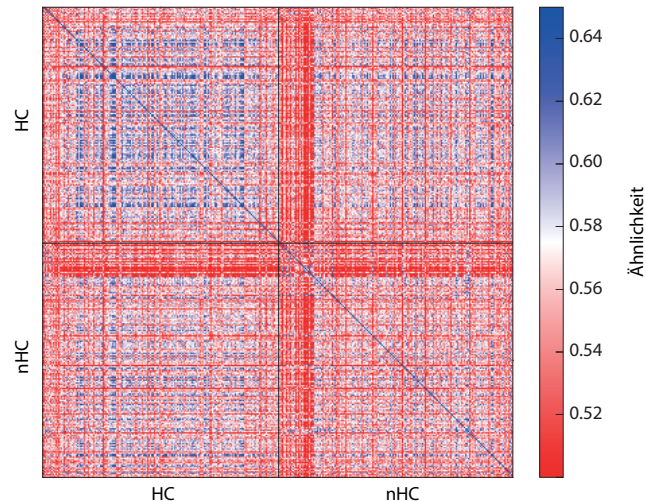


Abbildung 7.28: Topologischer Vergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung (Fortsetzung von Abbildung 7.27). Die gezeigte Heatmap stellt den Mittelwert der Werte aus Abbildung 7.27A und B dar. Die Nähe der γ H2AX-Cluster zu Heterochromatin scheint sich direkt auf die Strukturierung dieser Cluster auszuwirken. Auffallend ist aber auch, dass die nHC- und HC-Cluster sich ähnlicher sind, als die nHC untereinander.

- Reparaturprozesse nach Bestrahlung können die Zugänglichkeit der DNA für Combo-FISH-Proben, einerseits durch Veränderung der Chromatindichte oder andererseits durch die Anwesenheit von Reparaturproteinen erschweren.

Unabhängig von der Erklärung des Phänomens kann die Anzahl der gemessenen Alu-Sequenzen als Indikator für die applizierte Dosis und damit als Dosimeter dienen.

7.3.6.2 Strukturelle Zusammenhänge von Alu und Heterochromatin

Da Alu-Sequenzen bei der Strukturierung und Regulierung des Genoms eine erhebliche Rolle spielen [136, 137, 138], soll im Folgenden nun der strukturelle Zusammenhang zwischen Alu-Sequenzen und Heterochromatin im Zellkern untersucht werden. Dazu wurden die Bereiche untersucht, in denen viele Alu-Sequenzen in einem kleinen Bereich auftraten. Zur Auswahl dieser Bereiche wurde der DBSCAN (siehe dazu Abschnitt 5.3) verwendet. Folgende Parameter wurden dazu gewählt (Erläuterungen zum Einfluss der Parameter auf die Clustersuche siehe Abschnitt 7.3.5.1): $\epsilon = 100$ nm, $N_{min} = 10$. In Anbetracht der Verpackung der DNA in Nukleosomen, im 30 nm-Filament und in Schleifenanordnungen (siehe dazu auch Abschnitt 2.2.3) ist das Auftreten solcher Bereiche, die reich an Alu-Sequenzen sind, nicht unmittelbar zwingend. Ebenso könnte die Alu-Verteilung über den Zellkern völlig gleichmäßig sein. Insofern ist bereits das Auftreten dieser

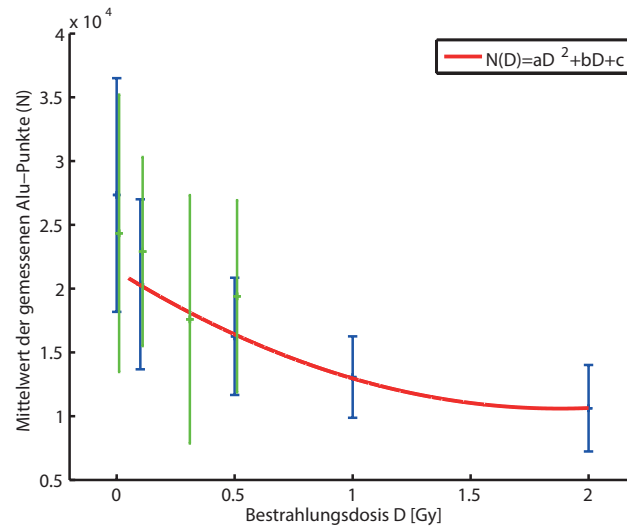


Abbildung 7.29: Einfluss von Bestrahlung auf die Anzahl der gemessenen Alu-Punkte. Auf der x -Achse ist die Dosis aufgetragen. Die y -Achse stellt die mittlere Anzahl der gemessenen Punkte dar. In Blau sind die einzelnen Messpunkte dargestellt. In Rot eine quadratische Anpassungsfunktion durch die Messpunkte von 0,1 Gy bis 2 Gy. Die grünen Punkte stellen eine zweite durchgeführte unabhängige Messreihe dar, die allerdings bei der Anpassungsfunktion nicht berücksichtigt wird.

Alu-Cluster ein interessantes Resultat. In den so erkannten Bereichen befinden sich somit Alu-Sequenzen unterschiedlicher Abschnitte des Genoms, die sich zusammengelagert haben [137]. Es ist bereits bekannt, dass Alu-Sequenzen durch spezielle Bindungsaffinitäten zu den Histonen eine nukleosomstrukturierende Wirkung haben, die sich auch auf die unmittelbar nahegelegenen Nukleosomen auswirkt [139]. Nur in Alu-enthaltenden Spezies auftretende Nukleosomregelmäßigkeiten deuten an, dass Nukleosom-Positionierungen im ganzen Genom durch Alu-Sequenzen beeinflusst werden [139]. Das Auftreten der oben beschriebenen Alu-Cluster stützt die Annahme, dass Alu-Sequenzen eine genomstrukturierende Wirkung haben.

Die Abbildungen 7.30 und 7.31 zeigen Beispiele von Alu-Clustern, die im Zusammenhang mit Heterochromatin auftauchen. Es ist zu erkennen, dass die Alu-Cluster sich um heterochromatische Bereiche anordnen und es nahezu zu keiner Kolo-kalisation kommt. In den Abbildungen stellt A jeweils den ganzen Zellkern und B den markierten Bereich vergrößert dar. In Grün ist das Heterochromatin-Dichtebild gezeigt und in Rot die gefundenen Alu-Cluster zu den oben angegebenen Parametern. In C ist der markierte Ausschnitt dargestellt, wobei jedes erkannte Fluorophor als Punkt dargestellt wird. Jeder Punkt entspricht einem erkannten Fluorophor. D entspricht C, allerdings werden hier nur die erkannten Alu-Cluster gezeigt und in Schwarz zusätzlich die erkannten Schwerpunkte der Cluster markiert. Die Clusterdarstellung hebt deutlich her-

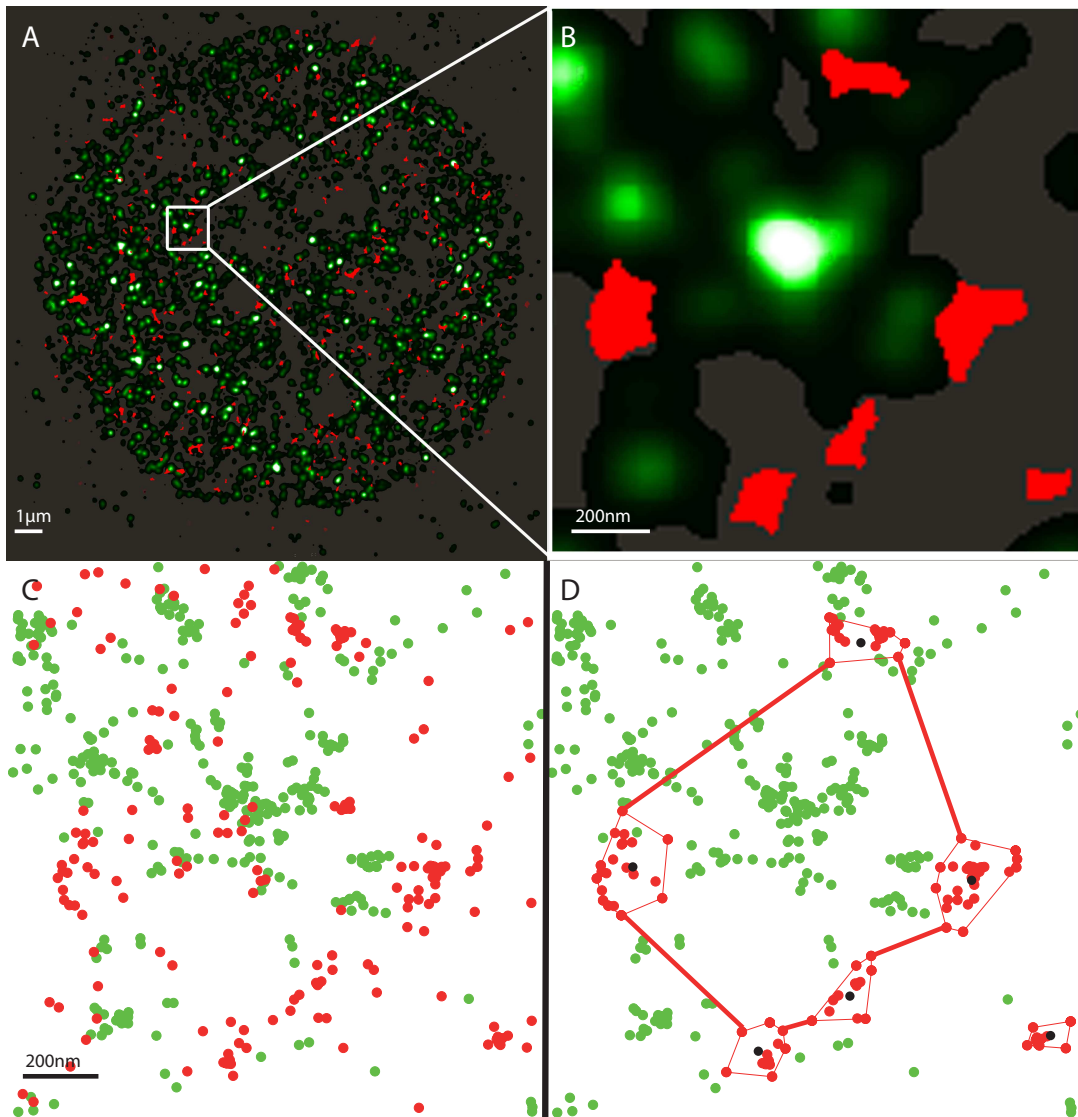


Abbildung 7.30: Alu-Regionen im Zusammenhang mit Heterochromatin (100 mGy, 30 min nach Bestrahlung). Grün: Heterochromatin, rot: Alu. A: Gesamtansicht des Zellkerns als Heterochromatin Dichtebild (Parameter zur Dichtebildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaussfilterradius=50 nm) und Alu-Clusterbild (Parameter zur Clusterbildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, $\epsilon=100$ nm, $N_{min}=10$). B: Vergrößerung des weiß markierten Bereichs. C: Darstellung des unter B abgebildeten Ausschnittes, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. D: Gleiche Darstellung wie in C, allerdings werden von Alu die erkannten Cluster dargestellt. Die Verteilung der Alu-Punkte und die heterochromatischen Bereiche schließen sich nahezu komplett aus. Besonders deutlich wird dies durch die Clusterdarstellung, die nur die Alu-Bereiche zeigt, die den Cluster-Parametern genügen (und somit besonders Alu-dichte Bereiche sind).

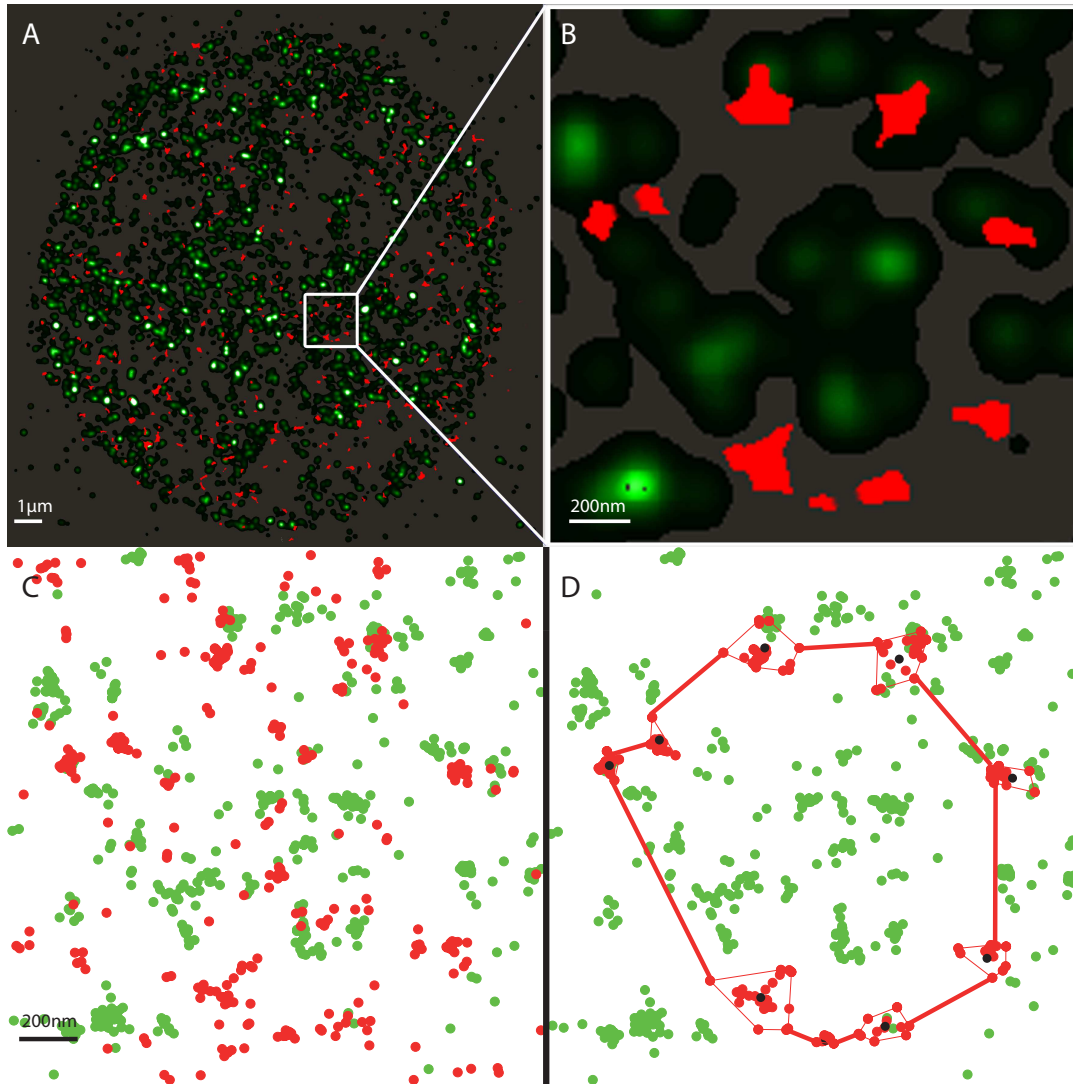


Abbildung 7.31: Alu-Regionen im Zusammenhang mit Heterochromatin (500 mGy, 30 min nach Bestrahlung). Grün: Heterochromatin, rot: Alu. A: Gesamtansicht des Zellkerns als Heterochromatin Dichtebild (Parameter zur Dichtebildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, Radius=1000 nm, Gaussfilterradius=50 nm) und Alu-Clusterbild (Parameter zur Clusterbildherstellung: Pixelsize=10 nm/px, $\epsilon=100$ nm, $N_{min}=10$). B: Vergrößerung des weiß markierten Bereichs. C: Darstellung des unter B abgebildeten Ausschnittes, wobei hier jeder Punkt einem erkannten Fluorophor entspricht. D: Gleiche Darstellung wie in C, allerdings werden von Alu die erkannten Cluster dargestellt. Wie in Abbildung 7.30 zeigt sich erneut, dass Heterochromatin und Alu sich nahezu komplett ausschließen.

vor, dass die Alu-Cluster sich zwischen und um heterochromatische Bereiche anordnen. Außerdem zeigen die Darstellungen in C und D, dass es nahezu zu keiner Kolo-kalisation zwischen Alu-Sequenzen und Heterochromatin kommt. In Abschnitt 7.3.5.1 wurden Darstellungen von γ H2AX-Clustern und deren Kontakt mit Heterochromatin gezeigt. Dort kam es nicht zu völliger Kolo-kalisation, allerdings war die Assoziierung der γ H2AX-Cluster zum Heterochromatin deutlich erkennbar. Die Alu-dichten Bereiche tauchen im Gegensatz dazu nahezu komplementär zu Heterochromatin auf. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur, die besagt, dass Alu-Sequenzen eher in der Nähe genreicher und damit euchromatischer Bereiche gefunden werden [90, 91].

Jeder Zellkern enthält ca. 200 solcher Alu-Cluster. Bei Betrachtung der Mikroskopbilder zeigt sich, dass es nur zu einem sehr kleinen Ausmaß von Kolo-kalisation von Alu-Clustern und Heterochromatin-dichten Bereichen kommt. Zur weiteren Analyse wurde die Heterochromatindichteverteilung um die Schwerpunkte der Alu-Cluster bestimmt (siehe dazu auch die Abschnitte 5.7). Für die in Abbildung 7.32 A gezeigte Verteilung wurden die mittlere Dichteverteilungen der Alu-Cluster eines Zellkerns berechnet. Abbildung 7.32 B zeigt die mittleren Verteilungen über alle in einer Messreihe enthaltenen Zellkerne.

Deutlich zu erkennen ist die erhöhte Heterochromatindichte um Alu-Cluster bei unbestrahlten Zellen. Die Daten zeigen, dass nach Bestrahlung die Dichte von Heterochromatin um die Alu-Cluster abnimmt. Das Verhalten ist für die Bestrahlungen mit 0.1 Gy bis 2 Gy ähnlich. Der zugrundeliegende Mechanismus, der zu dieser Veränderung führt, scheint auf Bestrahlung zu reagieren und ist dabei dosisunabhängig. Die Daten zeigen, dass die Bestrahlung einen erheblichen Einfluss auf Alu-Sequenzen und das sie umgebende Chromatin hat. Im Vergleich zu γ H2AX, wo eine je nach Reparaturbedarf schwankende Dichte vorliegt, scheint in der Umgebung der Alu-Cluster nur eine generelle Heterochromatin-Relaxierung stattzufinden. Auch wenn Alu in der Strukturierung von Chromatin involviert ist, so sind Alu-assoziierten Proteine scheinbar nicht direkt DNA-Schäden räumlich zuordenbar. Dies ist in γ H2AX-Clustern differenzierter. γ H2AX definiert die Rekrutierungsorte für Reparaturproteine und sind daher direkt zu Bruchstellen räumlich assoziiert. Da die Rolle von Alu-Sequenzen bei der DNA-Reparatur und DNA-Strukturierung molekularbiologisch bisher nur unvollständig verstanden ist, kann über den zugrundeliegenden Mechanismus nur gesagt werden, dass räumliche Effekte definierbar und nicht zufällig sind.

Repetitive Sequenzen und dabei wegen ihres häufigen Auftretens besonders Alu-Sequenzen könnten bei DNA-Doppelstrangbrüchen leicht zu Translokationen führen [140], wenn mehrere Doppelstrangbrüche in naher Umgebung passieren und mehrere Alu-Sequenzen beschädigt wurden. Durch das NHEJ könnte es leicht zur Verknüpfung falscher Bruchstellen kommen. Trotzdem kommt es in Alu-Sequenz-reichen Bereichen nicht zu einem höheren Maß an Translokationen oder Gendeletionen [141], was andeutet, dass die Reparatur von DNA-Schäden in diesen Sequenzen mit besonderer Sorgfalt abläuft. Warum den Alu-Sequenzen dieser Reparaturaufwand gewidmet wird, ist bisher nicht bekannt und könnte mit

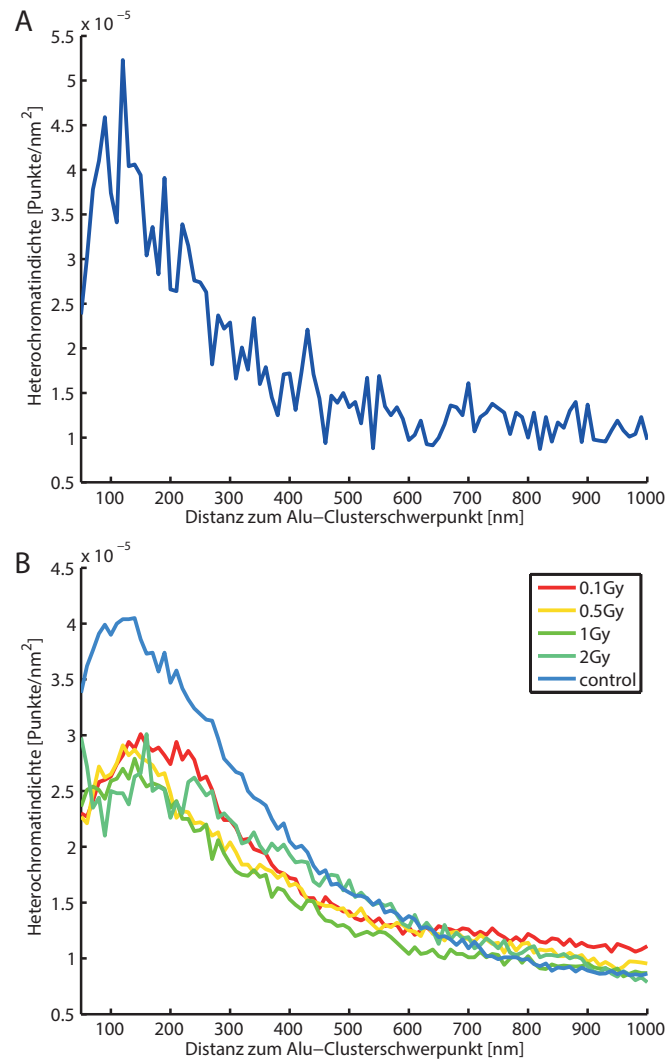


Abbildung 7.32: Heterochromatindichteverteilung um Alu-Cluster. Die Dichteverteilung wird wie in Abschnitt 5.7 bestimmt (Minstdistanz=50 nm, Schrittweite=10 nm, Maximaldistanz=1000 nm). A: Beispielhafter Mittelwert aller Cluster für eine Zelle. B: Mittelwert aller Cluster aller Zellen einer Messreihe. Dargestellt sind alle durchgeführten Messreihen. Der Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen ist auffällig. Die Dosis der Bestrahlung scheint allerdings nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Bestrahlung scheint einen erheblichen Einfluss auf das Verhältnis von Heterochromatin zu Alu-dichten Bereichen zu haben.

ihrer genomstrukturierenden Wirkung zusammenhängen. In jedem Fall könnten diese Reparaturvorgänge ein Erklärungsansatz sein, weshalb eine Bestrahlung einen solch erheblichen Einfluss auf die Heterochromatindichte um Alu-Sequenzreiche Bereiche nach Bestrahlung hat.

Abschließende Betrachtung

8.1 Zusammenfassung

Die Lokalisationsmikroskopie und andere Nanoskopiemethoden bieten großes Potential in der biophysikalischen Forschung. Die Erforschung der Genomstruktur nach Bestrahlung ist sicher ein Bereich, in dem der Gewinn an Mikroskopiegenauigkeit erhebliche neue Möglichkeiten eröffnet. Allerdings stellen diese Möglichkeiten die Forschung auch vor neue Herausforderungen, da lokalisationsmikroskopische Daten sich von konventionellen Mikroskopbildern unterscheiden. Während ein Lokalisationsmikroskop eine Koordinatenmatrix mit den Positionen der Fluorophore im Nanometerbereich produziert, liefert ein konventionelles Mikroskop ein Bild mit einer Auflösung von ca. 200 nm. Eine solche Koordinatenmatrix bedarf einer gänzlich neuen Herangehensweise, um den zehntausenden von Punktkoordinaten die relevanten Informationen zur Beantwortung der biophysikalischen Fragestellungen zu entnehmen. Dabei ist das Fehlen von ausreichenden Modellen, um die gewonnenen Daten mit diesen zu vergleichen, ein großer Mangel.

Die etablierten Präparationsmethoden können auf zahlreiche Probleme angewendet werden. In Kombination mit den nun verfügbaren Programmen zur automatischen Auswertung und Bewertung der Messdaten können routinemäßige nanometerpräzise Aufnahmen von zahlreichen Strukturen und die Prüfung, ob die Aufnahmen für weitere quantitative Analysen geeignet sind, durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden der Datenanalyse entwickelt und überarbeitet sowie auf biophysikalische Fragestellungen angewendet. Die Filterungs- und Normierungs-Algorithmen lösen die methodisch unumgänglichen Probleme von sich deutlich unterscheidenden Punktzahlen pro Zellkern. Die Punktverteilungen wurden mit Hilfe von Cluster-, Dichte- und Distanzanalysen

und persistenter Topologie untersucht und erlaubten die Charakterisierung der Strukturen.

Die Untersuchung der Chromatinstruktur zeigte Veränderungen des Heterochromatinanteils nach Bestrahlung und es konnte gezeigt werden, dass die Nähe eines DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturzentrum zu Heterochromatin dieses strukturell beeinflusst. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass Alu-Sequenzen einen Einfluss auf die Strukturierung der DNA haben und es einen exkludierenden Zusammenhang zwischen Alu-Sequenz-dichten Bereichen und Heterochromatin gibt.

8.2 Diskussion

Präparationsmethoden Lokalisationsmikroskopie in der hier verwendeten Variante (SPDM) funktioniert mit zahlreichen etablierten Fluoreszenzfarbstoffen. Andere hochauflösende Verfahren wie Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) benötigen spezielle Farbstoffe, die u. U. aus mehreren Fluorophoren zusammengesetzt sind [142], oder sind auf technisch aufwendige Aufbauten mit mehreren Lasern angewiesen wie z. B. STED [23]. Elektronenmikroskopie bedarf verglichen mit Lichtmikroskopie gänzlicher anderer Präparationen [63]. Für SPDM hingegen sind die für konventionelle Mikroskopie verwendeten Präparationen meist mit wenigen Optimierungen auch verwendbar. Darüber hinaus ist der technische Aufwand verglichen z. B. mit STED deutlich geringer [143].

Allerdings muss beachtet werden, dass der Einfluss der Präparationen auf die zu untersuchende Struktur erheblich sein kann [144]. Durch die Genauigkeitsverbesserung von ca. 200 nm auf 10 nm müssen solche Effekte berücksichtigt werden, die in der konventionellen Lichtmikroskopie vernachlässigbar sind. Dazu gehören z. B. Modifikationen in der molekularen Zugänglichkeit, Fixierungseffekte, sterische Effekte aufgrund eines molekularen Raumbedarfs oder Effekte elektrostatischer Natur. Hier konnten Präparationsprotokolle für zwei vielgenutzte Präparationsmethoden entwickelt werden, die weitestgehend auf strukturverändernde Präparationsschritte verzichten. Diese wurden auch für Versuche, die über diese Arbeit hinausgehen, verwendet.

Die Genomstruktur wurde durch Fluoreszenzmarkierung von Histonmodifikationen analysiert und demnach nicht durch eine direkte Markierung der DNA. Daher kann z. B. die Entfaltung der DNA nach Schäden auch nicht direkt beobachtet werden. Eine direkte Färbung der DNA mit anschließender lokalisationsmikroskopischer Analyse bringt aber neue Herausforderungen mit sich [145].

Quantitative Analysemethoden Die Genauigkeitsverbesserungen durch Lokalisationsmikroskopie erlauben die Darstellung der untersuchten Strukturen im Nanometerbereich, daher ist es nicht verwunderlich, dass Lokalisationsmikrosko-

pie zunehmend verwendet wird [146]. Ihr ganzes Potential entfaltet diese Technik erst, wenn die Daten für quantitative Analysen verwendet werden. Mittlerweile existieren frei verfügbare und einfach zu benutzende Programme zur Erstellung der Koordinatenmatrix aus Lokalisationsrohdaten [146] und Methoden die Koordinaten in Echtzeit während der Aufnahme zu berechnen [147]. Methoden, die die hochaufgelösten Daten für systematische quantitative Analysen nutzen, und somit eine biophysikalische Interpretation im Bezug zu zellulären Funktionen bieten, fehlen jedoch weitestgehend. Dies zeigt sich vor allem bei der Analyse z. B. von γ H2AX-Reparaturzentren, deren komplexe innere Strukturierung sie einer quantitativen Analyse nur schwer zugänglich macht. In z. B. [148] und [149] beschreiben die Autoren Vor- und Nachteile der verschiedenen hochauflösenden Mikroskopiemethoden und ihrer möglicher Anwendungen. Allerdings wird die oft vernachlässigte Herausforderung in diesem Bereich, wie die mit hochauflösender Mikroskopie untersuchten und häufig komplex angeordneten Objekte quantitativ analysiert werden können, nicht diskutiert, sondern lediglich die visuellen Effekte in Betracht gezogen. Hier hat die hochauflösende Mikroskopie noch ein großes Entwicklungspotential, insbesondere wenn die betrachterbezogene Bildinterpretation durch Analyse mittels mathematische Konzepte ersetzt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchführung aller Schritte von der Zellkultur, über die Präparation bis hin zur Mikroskopie und Auswertung optimiert. So konnten die Herausforderungen der einzelnen Schritte erkannt werden und eine angepasste Entwicklung der Analysemethoden wurde ermöglicht.

Filter- und Normierungsverfahren wurden entwickelt, die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität ausgleichen. Diese Unterschiede sind bedingt durch Präparation und Mikroskopie, aber vor allem durch die Inhomogenität der Zellen, und sind somit nicht vermeidbar. Sie stellen für jede quantitative Auswertung ein erhebliches Problem dar, das durch die entwickelten Normierungsverfahren beseitigt wird. Dieses Verfahren ist allerdings nicht beliebig verwendbar. Es gibt Grenzen für die Normierung von Lokalisationsdaten. Dies kann leicht an einem Extrembeispiel illustriert werden: wird die Punktzahl einer genomweiten Nukleosommarkierung auf fünfzehn Punkte reduziert, so ist offensichtlich klar, dass diese geringe Anzahl die zugrundeliegende Struktur nicht mehr angemessen wiedergibt.

Es zeigte sich, dass Distanzanalysen ein mächtiges Werkzeug zur quantitativen Analyse von Lokalisationsdaten sind. Sie ermöglichen die Analyse der am häufigsten auftretenden Distanzen der Punktverteilungen und liefern so Informationen über deren zugrundeliegende Struktur. Die Distanzverteilungen ersetzen hier gänzlich die Analyse der lokalen Dichte, da die Dichteanalyse durch Parameterwahl zu stark beeinflusst wird.

Die Lokalisationsdaten, die als Punktverteilung vorliegen, erlauben besonders präzise Clustererkennungen. Eine automatisierte Clustersuche erlaubt die Analyse großer Datenmengen, allerdings muss, da es sich um eine parameterbehaftete Analyse handelt, stets beachtet werden, welchen Einfluss die Parameter haben.

Wird dies beachtet, so können Clustersuchalgorithmen vielseitige Werkzeuge sein. Sie können eingesetzt werden, um Bereiche zu erkennen, die als kleine Regionen mit hoher Dichte vorkommen (z.B. DNA-Reparaturzentren). Sie können aber auch dabei helfen zu erkennen, inwieweit in einer zellkernweiten Markierung Bereiche hoher Dichte auftreten. Dies wurde hier genutzt, um Alu-Sequenz-dichte Bereiche zu erkennen und das umliegende Heterochromatin zu untersuchen. Erst durch diese Cluster-Analysen konnte überhaupt festgestellt werden, dass diese Alu-Sequenz-dichten Bereiche auftreten, und ihre genomstrukturierende Wirkung konnte erkannt werden.

Darüber hinaus ist es gelungen, mit Hilfe von persistenter Topologie einen gänzlich neuen Auswerteansatz auf Experimente zu übertragen. Ein nicht zu unterschätzender Vorteil dieser Methode ist, dass sie, ohne a priori molekularbiologische Effekte hinzuziehen zu müssen, funktioniert und Strukturinformationen in mehreren Größenskalen liefern kann. Diese Methodik erlaubt die Charakterisierung von Punktstrukturen, wobei implizit Dichte- und Distanzanalysen integriert werden. Der sehr kompliziert zu handhabenden Punktstruktur wird ein Barcode zugeordnet, der sie für Vergleiche mit anderen Punktstrukturen zugänglich macht. Er wird möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob und inwieweit zwei Punktverteilungen, die aus tausenden von Punkten bestehen können, sich ähnlich sind. Diese Methodik stellt einen Fortschritt im Bereich der hochauflösenden Mikroskopie dar, da sie es erlaubt, die topologischen Eigenschaften auf allen Größenskalen zu untersuchen, was die Überlegenheit dieser Methode gegenüber Distanz-, Cluster- und Dichteanalysen ausmacht. Sie ermöglicht, die Organisation des Genoms auf mehreren Größenskalen zu untersuchen, während z.B. die Distanzverteilungen methodisch bedingt nur die Struktur auf kleinen Größenskalen quantifizieren können. Dieser Ansatz wurde hier auf γ H2AX-Reparaturzentren angewendet und die Übertragung auf zellkernweite Strukturen wie Heterochromatin steht noch aus.

Analyse der Chromatinstruktur nach Bestrahlung Die Aufgabe, zu deren Zweck die verschiedenen methodischen Verbesserungen erzielt wurden, war die Analyse der Wirkung ionisierender Strahlung und anschließender DNA-Reparatur auf die Genomarchitektur.

Es konnte mit Hilfe von Distanzanalysen gezeigt werden, dass Heterochromatin im Gegensatz zu der Nukleosomverteilung eine charakteristische Anordnung im Bereich von ca. 30 nm hat. Diese Anordnung wurde in zwei Zelllinien gefunden. Es wurde festgestellt, dass der Anteil an Heterochromatin sich nach Bestrahlung ändert. In diesem Zusammenhang ist die weitere Erforschung der Reparaturvorgänge und wie das Auftreten der unterschiedlichen Reparaturproteine zum Anteil von Heterochromatin korreliert ist, lohnenswert. Lokalisationsmikroskopie kann hier Einblicke in die Struktur und die strukturellen Veränderungen bieten, die per konventioneller Mikroskopie nicht sichtbar gemacht werden können. Allerdings ist auch hier der Mangel an DNA-Markierungen, die mit Lokalisationsmikroskopie

kompatibel sind, ein Problem. Mit solchen Farbstoffen könnte die Entfaltung der DNA in Reparaturzentren direkt beobachtet werden. Es wäre somit auch möglich, die Bewegung eines DNA-Doppelstrangbruches an den Rand eines heterochromatischen Bereichs zu verfolgen.

Welche Möglichkeiten die Erforschung von DNA-Reparaturzentren bietet, wurde hier hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Heterochromatin und γ H2AX gezeigt. Die hochauflösenden Darstellungen von γ H2AX und Heterochromatin zeigten die komplexe Wechselwirkung der Reparaturzentren und des umliegenden Heterochromatins. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass bestimmte Reparaturzentren mit Heterochromatin assoziiert sind und dass diese Nähe zu Heterochromatin die topologischen Eigenschaften der Reparaturzentren beeinflusst. Ein solches Resultat zur Genomstrukturanalyse konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gewonnen werden und wurde durch die Kombination optimierter Präparationen, hochauflösender Mikroskopie, verbesserter Rohdatenaufbereitung und durch den innovativen Einsatz eines Punktstruktur-Analyse-Ansatzes aus der theoretischen Physik ermöglicht. Dieser Ansatz kann auf zahlreiche weitere biophysikalische Fragen angewendet werden und ermöglicht erstmals, lokalisationsmikroskopische Daten einer quantitativen Strukturanalyse zu unterziehen. Wie hier die Auswirkungen der Nähe zu Heterochromatin auf die Struktur der γ H2AX-Reparaturzentren untersucht wurde, so können mit einem analogen Ansatz die strukturellen Veränderungen durch bestimmte Reagenzien untersucht werden. Genauso ist es möglich Chromosomterritorien oder einzelne Gene auf ihre topologischen Eigenschaften zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

Die Bestrahlung von Zellen und die anschließende Analyse von Alu-Sequenzen hat einige überraschende Ergebnisse gezeigt. Zwischen der Anzahl der für Sonden zugänglichen Alu-Sequenzen und der Dosis ergibt sich ein quadratischer Zusammenhang. Dieser Zusammenhang könnte für eine biologische Dosimetrie [150] verwendet werden. Biologische Dosimetrie nutzt bisher als etablierte Verfahren das Zählen von dizentrischen Chromosomen [151] oder Mikrokernen [152]. Auch die Bestimmung der relativen Zahl von Translokationen gilt mittlerweile als etabliert [150]. Allerdings sind hier stets hohe Zellzahlen (einige hundert bei der Analyse von Translokationen, einige tausend bei dizentrischen Chromosomen oder Mikrokernen) erforderlich. Die hier gezeigte Technik unter Benutzung einer Alu-Sonde kommt bereits mit deutlich weniger Zellen zu brauchbaren Resultaten. Unter dem Aspekt einer Routinemethode bedarf es allerdings weiterer Erforschung.

Darüber hinaus konnten lokale Alu-Sequenz-Häufungen sichtbar gemacht werden, die eine genomstrukturierende Wirkung durch Alu-Sequenzen andeuten. Diese Alu-Sequenz-dichten Bereiche schließen sich nahezu vollständig mit Heterochromatin aus. Die Analysen zeigen, dass heterochromatindichte Bereiche sich stets in einem Abstand von 100 bis 300 nm zu einem Alu-Cluster befinden. Die entsprechende Heterochromatindichte wird durch Bestrahlung selbst mit kleinen Dosen massiv beeinflusst. Dies bestätigt die Theorien, dass Alu-Sequenzen bei

der Reparatur und Strukturierung des Genoms eine Rolle spielen und zeigt, dass lokalisationsmikroskopische Untersuchung einen entscheidenden Beitrag dazu leisten kann. Hier wäre es in Zukunft noch von Bedeutung den Zusammenhang der Alu-Cluster mit euchromatischen Regionen zu analysieren. Im Gegenzug wäre dann ein Vergleich zu eher heterochromatinnahen Sequenzen wie LINE1 (engl. Long Interspersed Elements 1) [153] von Interesse. Darüber hinaus wäre es zum Verständnis von Reparaturprozessen wichtig solche Regionen in Bezug zu Genregionen zu analysieren, die Proteine kodieren, die eine zentrale Rolle bei DNA-Reparaturprozessen spielen. Beispielsweise seien hier die Gene BRCA1 (engl. Breast Cancer 1) [154], das intern Alu-reich ist, und BRCA2 (engl. Breast Cancer 2) [154], das intern L1-reich ist, genannt.

Die hier zu Alu-Sequenzen gewonnenen Resultate zeigen erstmals mikroskopisch die genomstrukturierende Wirkung von Alu-Sequenzen [136, 137, 138, 139]. Hier zunächst für Alu und Heterochromatin gezeigt, allerdings lässt der Ansatz sich z. B. auf Euchromatin oder die Histonverteilung übertragen.

Erstmals wurde hier hochauflösende Mikroskopie systematisch für quantitative Analysen optimiert und so konnten Aussagen über die Genomstruktur nach Strahlenexposition gemacht werden. Im Gegensatz zu den üblichen Verfahren (wie der Analyse per Durchflusszytometrie [155] oder per Überlebenskurven [156]), die nur Aussagen über große Zellpopulationen machen können, war hier stets ein Ziel solche Aussagen auch für einzelne Zellen treffen zu können. Zwei Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen besonders deutlich, inwieweit dies mit den vorgestellten Methoden möglich ist.

1. Die Dosisabhängigkeit der Anzahl der messbaren Alu-Elemente ermöglicht es anhand von Alu-Messungen Aussagen über die auf eine Zelle applizierte Bestrahlungsdosis zu machen.
2. Es konnte gezeigt werden, dass γ H2AX-Reparaturzentren eine bestimmte Struktur haben, wenn sie zu Heterochromatin assoziiert sind. Diese Struktur wurde durch Barcodes charakterisiert und so einem Vergleich zugänglich gemacht. Es ist somit also auch möglich bei einem γ H2AX-Reparaturzentren aufgrund seiner Struktur eine Vorhersage zu machen, ob es zu Heterochromatin assoziiert ist.

8.3 Fazit

Das Potential der Lokalisationsmikroskopie bei der Erforschung der Genomarchitektur und ihrer Veränderung nach Strahlenexposition ist aufgrund der Genauigkeitsverbesserung bei Struktur-Distanz-Messungen um mehr als eine Größenordnung im Vergleich zu konventioneller Mikroskopie groß. Allerdings ist die hochauflösende Untersuchung mit anschließender quantitativer Analyse eine Herausforderung. Durch die Abstimmung der Präparationsoptimierungen und der quantitativen Auswertemethoden kann aus den lokalisationsmikroskopischen Daten ein großer Mehrwert verglichen mit konventioneller Mikroskopie gewonnen werden, wodurch sich neue wissenschaftliche Perspektiven insbesondere auf die Bedeutung biologischer Nanostrukturierung ergeben. Es war hier zum ersten Mal möglich, bestimmte Theorien der Strahlenbiophysik mikroskopisch zu verifizieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen einerseits, welche Möglichkeiten ein hochauflösendes Mikroskopsystem in Kombination mit einer quantitativen Analyse bietet und andererseits, dass strukturelle — nanoskalige — Veränderungen der Genomarchitektur für das Verständnis von strahleninduzierten Reparaturprozessen von weitreichender Bedeutung sind. Der verwendete Ansatz lässt sich auf vielfältige Fragestellungen anwenden und macht die Ausnutzung des ganzen Potentials der nanometergenauen hochauflösenden Mikroskopie möglich.

KAPITEL 9

Danksagung

Ohne die Hilfe zahlreicher Personen wäre die Fertigstellung einer solchen wissenschaftlichen Arbeit kaum möglich. Bedanken möchte ich mich besonders bei:

- Herrn Prof. Dr. Michael Hausmann für das entgegengebrachte Vertrauen. Ich danke für seine Betreuung, die mir stets weiter geholfen hat ohne mich je einzuschränken. Die motivierenden und kurzweiligen Gespräche, die lebhaften wissenschaftlichen Diskussionen und die Anekdoten aus seinem schier unerschöpflichen Schatz aus Allgemeinwissen und wissenschaftlicher Erfahrung werden mir unvergesslich bleiben.
- Herrn Prof. Dr. Rainer Fink dafür, dass er sich die Zeit genommen hat, meine Arbeit zu begutachten.
- Herrn Prof. Dr. Dieter Heermann für die Möglichkeit einer Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe.
- Dr. Götz Pilarczyk für die Beantwortung der vielen Fragen, die ein Physiker zur Biologie hat.
- Dr. Felix Bestvater und Wladimir Schaufler für die Bereitstellung und Wartung des Lokalisationsmikroskops. Danke, dass ich mich immer auf ein funktionierendes System verlassen konnte.
- Andreas Hofmann für die produktive, interessante und freundschaftliche Zusammenarbeit.
- Und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Hausmann, die hier nicht namentlich erwähnt werden.

Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] Erwin Schrödinger. *What is life? The physical aspect of the living cell*. Canto. Cambridge Univ. Press, Cambridge, repr edition, 2010.
- [2] Donald E. Olins und Ada L. Olins. Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(10):809–814, 2003.
- [3] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [4] Stefan W. Hell, Steffen Lindek, Christoph Cremer und Ernst H. K. Stelzer. Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution. *Applied Physics Letters*, 64(11):1335–1337, 1994.
- [5] Francisco Balzarotti, Yvan Eilers, Klaus C. Gwosch, Arvid H. Gynna, Volker Westphal, Fernando D. Stefani, Johan Elf und Stefan W. Hell. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6325):606–612, 2017.
- [6] Thomas Cremer, Marion Cremer, Barbara Hubner, Hilmar Strickfaden, Daniel Smeets, Jens Popken, Michael Sterr, Yolanda Markaki, Karsten Rippe und Christoph Cremer. The 4D nucleome: Evidence for a dynamic nuclear landscape based on co-aligned active and inactive nuclear compartments. *FEBS letters*, 589(20 Pt A):2931–2943, 2015.
- [7] Sergey V. Razin, Olga V. Iarovaia und Yegor S. Vassetzky. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. *Chromosoma*, 123(3):217–224, 2014.

- [8] Bahaa E. A. Saleh und Malvin C. Teich. *Fundamentals of photonics*. Wiley series in pure and applied optics. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 2nd ed. edition, 2007.
- [9] Christiaan Huygens. *Traité de la lumiere, où sont expliquées les causes de ce qui luy arrive dans la reflexion, & dans la refraction. Et particulièrement dans l'étrange refraction du cristal d'Islande*, 1690.
- [10] Min Gu. *Advanced optical imaging theory*, volume 75 of *Springer series in optical sciences*. Springer, Berlin, 2000.
- [11] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York, NY, 3. ed., corr. 4. print edition, 2010.
- [12] Martina Vogel, Achim Gruber, Jörg Wrachtrup und Christian von Borczyskowski. Determination of Intersystem Crossing Parameters via Observation of Quantum Jumps on Single Molecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(41):14915–14917, 1995.
- [13] Michal Martynski, Jolanta Zydlewicz, Noël Boens und Andrzej Molski. Determination of photophysical parameters from photon arrival time trajectories in single molecule fluorescence spectroscopy. *The Journal of chemical physics*, 122(13):134507, 2005.
- [14] Robert M. Dickson, Andrew B. Cubitt, Roger Y. Tsien und Moerner, W. E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640):355–358, 1997.
- [15] Tim B. McAnaney, Wei Zeng, Doe, Camille F E, Nina Bhanji, Stuart Wakelin, David S. Pearson, Paul Abbyad, Xinghua Shi, Steven G. Boxer und Clive R. Bagshaw. Protonation, photobleaching and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): a unifying mechanism. *Biochemistry*, 44(14):5510–5524, 2005.
- [16] Daniel Sinnecker, Philipp Voigt, Nicole Hellwig und Michael Schaefer. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry*, 44(18):7085–7094, 2005.
- [17] Jörg Schuster, Frank Cichos und Christian von Borczyskowski. Blinking of single molecules in various environments. *Optics and Spectroscopy*, 98(5):712–717, 2005.
- [18] Jan Vogelsang, Christian Steinhauer, Carsten Forthmann, Ingo H. Stein, Britta Person-Skegro, Thorben Cordes und Philip Tinnefeld. Make them blink: probes for super-resolution microscopy. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 11(12):2475–2490, 2010.

- [19] Rob Zondervan, Florian Kulzer, Sergei B. Orlinskii und Michel Orrit. Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(35):6770–6776, 2003.
- [20] Nathan J. Henderson, Hui-Wang Ai, Robert E. Campbell und S. James Remington. Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16):6672–6677, 2007.
- [21] Thermo Fisher Scientific Inc. Spectralviewer, 2017.
- [22] Tyler J. Chozinski, Lauren A. Gagnon und Joshua C. Vaughan. Twinkle, twinkle little star: photoswitchable fluorophores for super-resolution imaging. *FEBS letters*, 588(19):3603–3612, 2014.
- [23] Thomas A. Klar und Stefan W. Hell. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 24(14):954, 1999.
- [24] Volker Westphal und Stefan W. Hell. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Physical review letters*, 94(14):143903, 2005.
- [25] Dieter W. Pohl, Ulrich. C. Fischer und Urs T. Dürig. Scanning near-field optical microscopy (SNOM). *Journal of Microscopy*, 152(3):853–861, 1988.
- [26] Daniel Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. In Gerard Marriott und Ian Parker, editors, *Biophotonics*, volume 361 of *Methods in Enzymology*, pages 1–33. Academic Press, San Diego, Calif, 2003.
- [27] Sabrina Rossberger, Thomas Ach, Gerrit Best, Christoph Cremer, Rainer Heintzmann und Stefan Dithmar. High-resolution imaging of autofluorescent particles within drusen using structured illumination microscopy. *The British journal of ophthalmology*, 97(4):518–523, 2013.
- [28] Christoph Cremer und Barry R. Masters. Resolution enhancement techniques in microscopy. *The European Physical Journal H*, 38(3):281–344, 2013.
- [29] Marcus Dyba und Stefan W. Hell. Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Physical review letters*, 88(16):163901, 2002.
- [30] Paul Lemmer, Manuel Gunkel, David Baddeley, Rainer Kaufmann, Alexander Urich, Yanina Weiland, Jürgen Reymann, Patrick Müller, Michael Hausmann und Christoph Cremer. SPDM: Light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Applied Physics B*, 93(1):1–12, 2008.

- [31] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, Wolf O. Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz und Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793):1642–1645, 2006.
- [32] Travis J. Gould, Vladislav V. Verkhusha und Samuel T. Hess. Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy. *Nature protocols*, 4(3):291–308, 2009.
- [33] Harald Bornfleth, Kurt Satzler, Roland Eils und Christoph Cremer. High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 189(2):118–136, 1998.
- [34] George H. Patterson und Jennifer Lippincott-Schwartz. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, 297(5588):1873–1877, 2002.
- [35] Rainer Kaufmann, Paul Lemmer, Manuel Gunkel, Yanina Weiland, Patrick Müller, Michael Hausmann, David Baddeley, Roman Amberger und Christoph Cremer. SPDM: single molecule superresolution of cellular nanostructures. In Jörg Enderlein, Zygmunt K. Gryczynski und Rainer Erdmann, editors, *Single Molecule Spectroscopy and Imaging II*, SPIE Proceedings, page 71850J. SPIE, 2009.
- [36] Norman Bobroff. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Review of Scientific Instruments*, 57(6):1152, 1986.
- [37] Russell E. Thompson, Daniel R. Larson und Watt W. Webb. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*, 82(5):2775–2783, 2002.
- [38] James D. Watson und Francis H. C. Crick. The Structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18(0):123–131, 1953.
- [39] Terry A. Brown und Birgit Jarosch. *Genome und Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik*. Spektrum Akad. Verl., Berlin, 3. Aufl. [der orig.-ausg.] = 1. Aufl. [der dt. ausg.] edition, 2007.
- [40] Karolin Luger, Mekonnen L. Dechassa und David J. Tremethick. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(7):436–447, 2012.
- [41] Christopher L. Woodcock und Rajarshi P. Ghosh. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5):a000596, 2010.

- [42] James D. Watson und Mario Mörl. *Molekularbiologie*. Biologie. Pearson Studium, München, 6., aktualisierte aufl., [1., dt. ausg.] edition, 2011.
- [43] Gina Arents und Evangelos N. Moudrianakis. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24):11170–11174, 1995.
- [44] Eran Segal und Jonathan Widom. What controls nucleosome positions? *Trends in genetics : TIG*, 25(8):335–343, 2009.
- [45] Patrick Cramer und Cynthia Wolberger. Proteins: histones and chromatin. *Current opinion in structural biology*, 21(6):695–697, 2011.
- [46] Sepideh Khorasanizadeh. The Nucleosome. *Cell*, 116(2):259–272, 2004.
- [47] Dirk Schubeler, David M. MacAlpine, David Scalzo, Christiane Wirbelauer, Charles Kooperberg, Fred van Leeuwen, Daniel E. Gottschling, Laura P. O’Neill, Bryan M. Turner, Jeffrey Delrow, Stephen P. Bell und Mark Groudine. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes & development*, 18(11):1263–1271, 2004.
- [48] Justin S. Becker, Nicetto Dario und Kenneth S. Zaret. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends in genetics : TIG*, 32(1):29–41, 2016.
- [49] Ping Zhu und Guohong Li. Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber. *Current opinion in structural biology*, 36:106–115, 2016.
- [50] Peter Tessarz und Tony Kouzarides. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(11):703–708, 2014.
- [51] Yi-Li Feng, Ji-Feng Xiang, Na Kong, Xiu-Jun Cai und An-Yong Xie. Buried territories: heterochromatic response to DNA double-strand breaks. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 48(7):594–602, 2016.
- [52] Kathryn L. Huisinga, Brent Brower-Toland und Sarah C. R. Elgin. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma*, 115(2):110–122, 2006.
- [53] Yvonne Lorat, Sara Timm, Burkhard Jakob, Gisela Taucher-Scholz und Claudia E. Rube. Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 121(1):154–161, 2016.

- [54] Jamy C. Peng und Gary H. Karpen. Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Current opinion in genetics & development*, 18(2):204–211, 2008.
- [55] Antoine H. F. M. Peters, Donal O’Carroll, Harry Scherthan, Karl Mechtler, Stephan Sauer, Christian Schöfer, Klara Weipoltshammer, Michaela Pagani, Monika Lachner, Alexander Kohlmaier, Susanne Opravil, Michael Doyle, Maria Sibilica und Thomas Jenuwein. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell*, 107(3):323–337, 2001.
- [56] Angela Taddei, Christele Maison, Daniele Roche und Genevieve Almouzni. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nature cell biology*, 3(2):114–120, 2001.
- [57] David R. Hawkins, Gary C. Hon, Leonard K. Lee, Queminh Ngo, Ryan Lister, Mattia Pelizzola, Lee E. Edsall, Samantha Kuan, Ying Luu, Sarit Klugman, Jessica Antosiewicz-Bourget, Zhen Ye, Celso Espinoza, Saurabh Agarwahl, Li Shen, Victor Ruotti, Wei Wang, Ron Stewart, James A. Thomson, Joseph R. Ecker und Bing Ren. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell stem cell*, 6(5):479–491, 2010.
- [58] Shiv I. S. Grewal und Songtao Jia. Heterochromatin revisited. *Nature reviews. Genetics*, 8(1):35–46, 2007.
- [59] Christele Maison und Genevieve Almouzni. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(4):296–304, 2004.
- [60] Idan Cohen, Elzbieta Poreba, Kinga Kamieniarz und Robert Schneider. Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes & cancer*, 2(6):631–647, 2011.
- [61] Raja S. Vasireddy, Tom C. Karagiannis und Assam El-Osta. gamma-radiation-induced gammaH2AX formation occurs preferentially in actively transcribing euchromatic loci. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(2):291–294, 2010.
- [62] Patrick Trojer und Danny Reinberg. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular cell*, 28(1):1–13, 2007.
- [63] Claudia E. Rube, Yvonne Lorat, Nadine Schuler, Stefanie Schanz, Gunther Wennemuth und Christian Rube. DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. *DNA repair*, 10(4):427–437, 2011.

- [64] Thomas Cremer und Christoph Cremer. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *European journal of histochemistry : EJH*, 50(3):161–176, 2006.
- [65] Thomas Cremer und Christoph Cremer. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *European journal of histochemistry : EJH*, 50(4):223–272, 2006.
- [66] Thomas Cremer und Marion Cremer. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3):a003889, 2010.
- [67] Takashi Nagano, Yaniv Lubling, Tim J. Stevens, Stefan Schoenfelder, Eitan Yaffe, Wendy Dean, Ernest D. Laue, Amos Tanay und Peter Fraser. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*, 502(7469):59–64, 2013.
- [68] Jochen Graw. *Genetik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015.
- [69] Heiner Albiez, Marion Cremer, Cinzia Tiberi, Lorella Vecchio, Lothar Schermelleh, Sandra Dittrich, Katrin Küpper, Boris Joffe, Tobias Thormeyer, Johann von Hase, Siwei Yang, Karl Rohr, Heinrich Leonhardt, Irina Solovei, Christoph Cremer, Stanislav Fakan und Thomas Cremer. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 14(7):707–733, 2006.
- [70] Andrew J. Fritz, Rasim A. Barutcu, Lori Martin-Buley, Andre J. van Wijnen, Sayyed K. Zaidi, Anthony N. Imbalzano, Jane B. Lian, Janet L. Stein und Gary S. Stein. Chromosomes at Work: Organization of Chromosome Territories in the Interphase Nucleus. *Journal of cellular biochemistry*, 117(1):9–19, 2016.
- [71] Hilmar Strickfaden, Andreas Zunhammer, Silvana van Koningsbruggen, Daniela Kohler und Thomas Cremer. 4D chromatin dynamics in cycling cells: Theodor Boveri’s hypotheses revisited. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1(3):284–297, 2010.
- [72] Martine E. Lomax, Lisa K. Folkes und Peter O’Neill. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 25(10):578–585, 2013.

- [73] Michael J. Kruhlak, Arkady Celeste, Graham Dellaire, Oscar Fernandez-Capetillo, Waltraud G. Muller, James G. McNally, David P. Bazett-Jones und Andre Nussenzweig. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology*, 172(6):823–834, 2006.
- [74] Emil Mladenov, Simon Magin, Aashish Soni und George Iliakis. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Seminars in cancer biology*, 37-38:51–64, 2016.
- [75] Ali Sak, Dennis Kubler, Kristina Bannik, Michael Groneberg und Martin Stuschke. Dependence of radiation-induced H2AX phosphorylation on histone methylation: evidence from the chromatin immunoprecipitation assay. *International journal of radiation biology*, 91(4):346–353, 2015.
- [76] Taehyun Ryu, Brett Spatola, Laetitia Delabaere, Katherine Bowlin, Hannah Hopp, Ryan Kunitake, Gary H. Karpen und Irene Chiolo. Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nature cell biology*, 17(11):1401–1411, 2015.
- [77] Katerina Tsouroula, Audrey Furst, Melanie Rogier, Vincent Heyer, Anne Maglott-Roth, Alexia Ferrand, Bernardo Reina-San-Martin und Evi Soutoglou. Temporal and Spatial Uncoupling of DNA Double Strand Break Repair Pathways within Mammalian Heterochromatin. *Molecular cell*, 63(2):293–305, 2016.
- [78] Olga Zlobinskaya, Thomas E. Schmid, Günther Dollinger, Volker Hable, Christoph Greubel, Dörte Michalski, Jan Wilkens, Guanghua Du, Michael Molls und Barbara Röper. Differences in Gamma-H2AX Foci Formation after Irradiation with Continuous and Pulsed Proton Beams. In Olaf Dössel und Wolfgang C. Schlegel, editors, *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, volume 25/3 of *IFMBE Proceedings*, pages 142–145. Springer, Berlin, 2009.
- [79] Jung-Ae Kim, Michael Kruhlak, Farokh Dotiwala, Andre Nussenzweig und James E. Haber. Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *The Journal of cell biology*, 178(2):209–218, 2007.
- [80] Olga Zlobinskaya, Günther Dollinger, Dörte Michalski, Volker Hable, Christoph Greubel, Guanghua Du, Gabriele Multhoff, Barbara Roper, Michael Molls und Thomas E. Schmid. Induction and repair of DNA double-strand breaks assessed by gamma-H2AX foci after irradiation with pulsed or continuous proton beams. *Radiation and environmental biophysics*, 51(1):23–32, 2012.

- [81] Jan Ole Kriegs, Gennady Churakov, Jerzy Jurka, Jurgen Brosius und Jurgen Schmitz. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends in genetics : TIG*, 23(4):158–161, 2007.
- [82] Catherine M. Houck, Frank P. Rinehart und Carl W. Schmid. A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *Journal of Molecular Biology*, 132(3):289–306, 1979.
- [83] Mark A. Batzer und Prescott L. Deininger. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature reviews. Genetics*, 3(5):370–379, 2002.
- [84] Alkes L. Price, Eleazar Eskin und Pavel A. Pevzner. Whole-genome analysis of Alu repeat elements reveals complex evolutionary history. *Genome research*, 14(11):2245–2252, 2004.
- [85] Maria E. Morales, Travis B. White, Vincent A. Streva, Cecily B. DeFreece, Dale J. Hedges und Prescott L. Deininger. The contribution of alu elements to mutagenic DNA double-strand break repair. *PLoS genetics*, 11(3):e1005016, 2015.
- [86] Nadezhda M. Usmanova, Vasiliy I. Kazakov und Nikolai V. Tomilin. SINEs in mammalian genomes can serve as additional signals in formation of facultative heterochromatin. *Cell and Tissue Biology*, 2(3):217–221, 2008.
- [87] Chongjian Chen, Takeshi Ara und Daniel Gautheret. Using Alu elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Molecular biology and evolution*, 26(2):327–334, 2009.
- [88] Richard Cordaux und Mark A. Batzer. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews. Genetics*, 10(10):691–703, 2009.
- [89] Prescott Deininger. Alu elements: know the SINEs. *Genome biology*, 12(12):236, 2011.
- [90] Ming Su, Dali Han, Jerome Boyd-Kirkup, Xiaoming Yu und Jing-Dong J. Han. Evolution of Alu elements toward enhancers. *Cell reports*, 7(2):376–385, 2014.
- [91] Andreas Bolzer, Gregor Kreth, Irina Solovei, Daniela Koehler, Kaan Saracoglu, Christine Fauth, Stefan Muller, Roland Eils, Christoph Cremer, Michael R. Speicher und Thomas Cremer. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology*, 3(5):e157, 2005.
- [92] Thomas Bettecken, Zakharia M. Frenkel und Edward N. Trifonov. Human nucleosomes: special role of CG dinucleotides and Alu-nucleosomes. *BMC genomics*, 12(1):273, 2011.

- [93] Ella W. Englander und Bruce. H. Howard. Nucleosome Positioning by Human Alu Elements in Chromatin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(17):10091–10096, 1995.
- [94] Tobias A. Knoch. *Approaching the three-dimensional organization of the human genome: Structural, scaling and dynamic properties in the simulation of interphase chromosomes and cell nuclei ; long range correlations in complete genomes, in vivo analysis of the chromatin distribution, construct conversions in simultaneous co-transfections*. T. A.. Knoch, Mannheim, [dvd-rom-ausg. der gedr.] 2. ed. edition, 2002.
- [95] Lyubomir T. Vassilev. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(22):2555–2556, 2006.
- [96] David O. Morgan. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518):131–134, 1995.
- [97] David O. Morgan. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and micro-processors. *Annual review of cell and developmental biology*, 13:261–291, 1997.
- [98] Jorrit M. Enserink und Richard D. Kolodner. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell division*, 5:11, 2010.
- [99] Cathy M. Price. Fluorescence in situ hybridization. *Blood Reviews*, 7(2):127–134, 1993.
- [100] Margit Schardin, Thomas Cremer, Hans-Dieter Hager und Martin Lang. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Human Genetics*, 71(4):281–287, 1985.
- [101] Jeffrey M. Levisky und Robert H. Singer. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of cell science*, 116(Pt 14):2833–2838, 2003.
- [102] Michael Hausmann, Ralph Winkler, Georg Hildenbrand, Jutta Finsterle, Andrea Weisel, Alexander Rapp, Eberhard Schmitt, Siegfried Janz und Christoph Cremer. COMBO-FISH: specific labeling of nondenatured chromatin targets by computer-selected DNA oligonucleotide probe combinations. *BioTechniques*, 35(3):564–70, 572–7, 2003.
- [103] Christoph Cremer, Michael Hausmann und Thomas Cremer. Markierung von Nukleinsäuren mit speziellen Probengemischen (Labelling of nucleic acids by specific probe mixtures), (Offenlegungsschrift DE 198 06 962 A1). *Deutsches Patentamt München (Offenlegungstag 1.10.1998)*, 1997.

- [104] Michael Stuhlmüller, Jutta Schwarz-Finsterle, Edward G. Fey, Jaroslav Lux, Margund Bach, Christoph Cremer, Katrin Hinderhofer, Michael Hausmann und Georg Hildenbrand. In situ optical sequencing and structure analysis of a trinucleotide repeat genome region by localization microscopy after specific COMBO-FISH nano-probing. *Nanoscale*, 7(42):17938–17946, 2015.
- [105] Jutta Schwarz-Finsterle, Stefan Stein, Constance Grossmann, Eberhard Schmitt, Luba Trakhtenbrot, Gideon Rechavi, Ninette Amariglio, Christoph Cremer und Michael Hausmann. Comparison of triple helical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of abl/bcr positions in cell nuclei. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(3):397–406, 2007.
- [106] Eberhard Schmitt, Jenny Wagner und Michael Hausmann. Combinatorial selection of short triplex forming oligonucleotides for fluorescence in situ hybridisation COMBO-FISH. *Journal of Computational Science*, 3(5):328–334, 2012.
- [107] Friedrich Lottspeich. *Bioanalytik*. Spektrum, Heidelberg., 3. aufl. edition, 2012.
- [108] Fariat. A. Tanious, James M. Veal, Henryk Buczak, Lynda S. Ratmeyer und David W. Wilson. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31(12):3103–3112, 1992.
- [109] Shinshichi Hamada und Setsuya Fujita. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry*, 79(2):219–226, 1983.
- [110] Frederik Grull, Manfred Kirchgessner, Rainer Kaufmann, Michael Hausmann und Udo Kebschull. Accelerating Image Analysis for Localization Microscopy with FPGAs. In Peter Athanas, Dionisios Pnevmatikatos und Nicolas Sklavos, editors, *21st International Conference on Field Programmable Logic and Applications*, pages 1–5, [United States], 2011. IEEE.
- [111] Michael Stuhlmüller und Michael Hausmann. Selection of COMBO-FISH Probes for Multi-Purpose Applications. *Journal of Theoretical and Computational Science*, 02(03), 2015.
- [112] Eberhard Schmitt, Jutta Schwarz-Finsterle, Stefan Stein, Carmen Boxler, Patrick Müller, Andriy Mokhir, Roland Kramer, Christoph Cremer und Michael Hausmann. COMBINatorial Oligo FISH: directed labeling of specific genome domains in differentially fixed cell material and live cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 659:185–202, 2010.

- [113] Jurek Dobrucki und Zbigniew Darzynkiewicz. Chromatin condensation and sensitivity of DNA in situ to denaturation during cell cycle and apoptosis — a confocal microscopy study. *Micron*, 32(7):645–652, 2001.
- [114] Irina Solovei und Marion Cremer. 3D-FISH on cultured cells combined with immunostaining. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 659:117–126, 2010.
- [115] Julie Chaumeil, Mariann Micsinai und Jane A. Skok. Combined immunofluorescence and DNA FISH on 3D-preserved interphase nuclei to study changes in 3D nuclear organization. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (72):e50087, 2013.
- [116] Jörg Sander, Martin Ester, Hans-Peter Kriegel und Xiaowei Xu. Density-Based Clustering in Spatial Databases: The Algorithm GDBSCAN and Its Applications. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2(2):169–194, 1998.
- [117] Heris, Mostapha K. Implementation of DBSCAN Clustering in MATLAB: Yarpiz Project Code: YPML110, 2015.
- [118] Bart Braden. The Surveyor’s Area Formula. *The College Mathematics Journal*, 17(4):326, 1986.
- [119] Shahid Banday, Zeenat Farooq, Romana Rashid, Ehsaan Abdullah und Mohammad Altaf. Role of Inner Nuclear Membrane Protein Complex Lem2-Nur1 in Heterochromatic Gene Silencing. *The Journal of biological chemistry*, 291(38):20021–20029, 2016.
- [120] Xin Bi, Yue Ren und Morgan Kath. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) contributes to the high-order structure and stability of heterochromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 2016.
- [121] Gabriell Mate, Andreas Hofmann, Nicolas Wenzel und Dieter W. Heermann. A topological similarity measure for proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1838(4):1180–1190, 2014.
- [122] Robert Ghrist. Barcodes: The persistent topology of data. *Bulletin of the American Mathematical Society*, 45(01):61–76, 2008.
- [123] Paul Jaccard. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bull. del la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37:547–579, 1901.
- [124] Yusuke Minakawa, Yuko Atsumi, Akira Shinohara, Yasufumi Murakami und Ken-Ichi Yoshioka. Gamma-irradiated quiescent cells repair directly

- induced double-strand breaks but accumulate persistent double-strand breaks during subsequent DNA replication. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 21(7):789–797, 2016.
- [125] Mireia Borrás-Fresneda, Joan-Francesc Barquinero, Maria Gomolka, Sabine Hornhardt, Ute Rössler, Gemma Armengol und Leonardo Barrios. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line. *Scientific reports*, 6:27043, 2016.
- [126] Yang Zhang, Gabriell Mate, Patrick Muller, Sabina Hillebrandt, Matthias Kruczyk, Margund Bach, Rainer Kaufmann, Michael Hausmann und Dieter W. Heermann. Radiation induced chromatin conformation changes analysed by fluorescent localization microscopy, statistical physics, and graph theory. *PloS one*, 10(6):e0128555, 2015.
- [127] Roman Zinner, Heiner Albiez, Joachim Walter, Antoine H. F. M. Peters, Thomas Cremer und Marion Cremer. Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochemistry and cell biology*, 125(1-2):3–19, 2006.
- [128] Yvonne Lorat, Stefanie Schanz, Nadine Schuler, Gunther Wennemuth, Christian Rube und Claudia E. Rube. Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy. *PloS one*, 7(5):e38165, 2012.
- [129] Adele Murrell, Vardhman K. Rakyan und Stephan Beck. From genome to epigenome. *Human molecular genetics*, 14 Spec No 1:R3–R10, 2005.
- [130] Takaji Ikushima, Hisako Aritomi und Jun Morisita. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 358(2):193–198, 1996.
- [131] Christophe E. Redon, Asako J. Nakamura, Ksenia Gouliava, Arifur Rahman, William F. Blakely und William M. Bonner. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PloS one*, 5(11):e15544, 2010.
- [132] Dana Branzei und Marco Foiani. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(4):297–308, 2008.
- [133] Harry Scherthan, Ludwig Hieber, Herbert Braselmann, Victor Meineke und Horst Zitzelsberger. Accumulation of DSBs in gamma-H2AX domains fuel chromosomal aberrations. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4):694–697, 2008.

- [134] Megumi Hada und Alexandros G. Georgakilas. Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *Journal of Radiation Research*, 49(3):203–210, 2008.
- [135] Kai Rothkamm und Markus Lobrich. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5057–5062, 2003.
- [136] Kenji Ichiyanagi. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes & Genetic Systems*, 88(1):19–29, 2013.
- [137] Zhuoya Gu, Ke Jin, James C. Crabbe, Yang Zhang, Xiaolin Liu, Yanyan Huang, Mengyi Hua, Peng Nan, Zhaolei Zhang und Yang Zhong. Enrichment analysis of Alu elements with different spatial chromatin proximity in the human genome. *Protein & cell*, 7(4):250–266, 2016.
- [138] Mireia Jorda, Anna Diez-Villanueva, Izaskun Mallona, Berta Martin, Sergi Lois, Víctor Barrera, Manel Esteller, Tanya Vavouri und Miguel A. Peinado. The epigenetic landscape of Alu repeats delineates the structural and functional genomic architecture of colon cancer cells. *Genome Research*, 27(1):118–132, 2017.
- [139] Yoshiaki Tanaka, Riu Yamashita, Yutaka Suzuki und Kenta Nakai. Effects of Alu elements on global nucleosome positioning in the human genome. *BMC genomics*, 11:309, 2010.
- [140] Michael R. Lieber und Zarir E. Karanjawala. Ageing, repetitive genomes and DNA damage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(1):69–75, 2004.
- [141] Elena Kolomietz, M. Stephen Meyn, Ajay Pandita und Jeremy A. Squire. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 35(2):97–112, 2002.
- [142] Michael J. Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10):793–795, 2006.
- [143] Paul Lemmer, Manuel Gunkel, Yanina Weiland, Patrick Muller, David Baddeley, Rainer Kaufmann, Alexander Urich, Heinz Eipel, Roman Amberger, Michael Hausmann und Cremer Cremer. Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. *Journal of Microscopy*, 235(2):163–171, 2009.
- [144] Fabien Mongelard, Claire Vourc’h, Michel Robert-Nicoud und Yves Usson. Quantitative assessment of the alteration of chromatin during the course of FISH procedures. *Cytometry*, 36(2):96–101, 1999.

- [145] Aleksander T. Szczurek, Kirti Prakash, Hyun-Keun Lee, Dominika J. Zurek-Biesiada, Gerrit Best, Martin Hagmann, Jurek W. Dobrucki, Christoph Cremer und Udo Birk. Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 5(4):331–340, 2014.
- [146] Steve Wolter, Anna Loschberger, Thorge Holm, Sarah Aufmolkolk, Marie-Christine Dabauvalle, Sebastian van de Linde und Markus Sauer. rapid-STORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nature methods*, 9(11):1040–1041, 2012.
- [147] Steve Wolter, Mark Schuttpelz, Marko Tscherepanow, Sebastian van de Linde, Mike Heilemann und Markus Sauer. Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *Journal of Microscopy*, 237(1):12–22, 2010.
- [148] Lothar Schermelleh, Rainer Heintzmann und Heinrich Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 190(2):165–175, 2010.
- [149] Bo Huang, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual review of biochemistry*, 78:993–1016, 2009.
- [150] Philippe Voisin. Standards in biological dosimetry: A requirement to perform an appropriate dose assessment. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 793:115–122, 2015.
- [151] Radhia M’kacher, Elie E. L. Maalouf, Michelle Ricoul, Leonhard Heidingsfelder, Eric Laplagne, Corina Cuceu, William M. Hempel, Bruno Colicchio, Alain Dieterlen und Laure Sabatier. New tool for biological dosimetry: reevaluation and automation of the gold standard method following telomere and centromere staining. *Mutation research*, 770:45–53, 2014.
- [152] Anne Vral, Michael Fenech und Hubert Thierens. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1):11–17, 2011.
- [153] Jeremy S. Myers, Bethaney J. Vincent, Hunt Udall, Scott W. Watkins, Tammy A. Morrish, Gail E. Kilroy, Gary D. Swergold, Jurgen Henke, Lotte Henke, John V. Moran, Lynn B. Jorde und Mark A. Batzer. A comprehensive analysis of recently integrated human Ta L1 elements. *American journal of human genetics*, 71(2):312–326, 2002.
- [154] Ashok R. Venkitaraman. Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2):171–182, 2002.

- [155] Wenjing Wang, Maomin Lv, Yanlin Wang und Jingang Zhang. Development of novel application of 3,3'-diindolylmethane: sensitizing multidrug resistance human breast cancer cells to gamma-irradiation. *Pharmaceutical biology*, 54(12):3164–3168, 2016.
- [156] Caroline Steenken, Jens Fleckenstein, Stefan Kegel, Lennart Jahnke, Anna Simeonova, Linda Hartmann, Jens Kubler, Marlon R. Veldwijk, Frederik Wenz, Carsten Herskind und Frank Anton Giordano. Impact of flattening-filter-free radiation on the clonogenic survival of astrocytic cell lines. *Strahlentherapie und Onkologie*, 191(7):590–596, 2015.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle gemäß der geometrischen Optik	6
2.2	Abbildung von zwei punktförmigen Quellen durch eine Linse	8
2.3	Darstellung eines Objekträgers mit Mikroskopobjektiv	9
2.4	Jablonski-Diagramm eines Fluorophores	11
2.5	Anregungs- und Emissionsspektrum von zwei häufig eingesetzten Fluorophoren (Alexa 488 und Alexa 568)	13
2.6	Darstellung einer Heterochromatin-Markierung in einem Zellkern	16
2.7	Funktionsprinzip von Lokalisationsmikroskopie	18
2.8	Ausschnittes des DNA-Moleküls	22
2.9	Darstellung des 10 nm-Filaments	23
2.10	Nukleosom	24
2.11	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines DNA-Stückes, das als 30 nm-Filament angenommen wird	25
2.12	Schematische Darstellung der Verpackungsstufen der DNA	25
2.13	Histonschwanzmodifikationen	26
2.14	Mögliche Reparaturen von DNA-Doppelstrangbrüchen	29
3.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	37
3.2	Bindungsstellen der Alu-Sonde	38
3.3	Immunofluoreszenz	39
3.4	Objekträgeraufbau	39
3.5	Aufbau des verwendeten Lokalisationsmikroskops	41
3.6	Positionsbestimmung aus der gemessenen Intensität	44
3.7	Bilderstellung aus Lokalisationsdaten	49

5.1	Normierung und Filterung	62
5.2	Normierung und Filterung (Fortsetzung)	63
5.3	DBSCAN-Algorithmus	65
5.4	Typische Distanzverteilungen	67
5.5	Dichtebestimmung	70
5.6	Darstellung einer Fehlmessung	71
5.7	Mehrkanalanalyse	74
5.8	Komplexbildung in Abhängigkeit von α	76
5.9	Bildung eines Barcodes aus einer Punktstruktur	78
5.10	Barcodevergleich	80
6.1	Grafische Benutzeroberfläche zu dem Programm „Chromatinana- lyse“	82
6.2	Bildausgaben Chromatinanalyse	85
6.3	Übersichtsausgaben Chromatinanalyse	86
6.4	Distanzverteilungen Chromatinanalyse	87
6.5	Programmablauf „Fit-Optimierung“	89
6.6	Beispiel einer Fitoptimierung	90
6.7	Grafische Benutzeroberfläche des Programms „Overlay“	92
7.1	Mikroskopieaufnahmen einer SKBR3-Zelle 30 min nach Bestrah- lung mit 1Gy	96
7.2	Dichtebilder einiger HeLa-Zellkerne mit H3 (tri methyl K9)- Markierung	98
7.3	Distanzverteilungen zu den in Abbildung 7.2 A,C gezeigten HeLa- Zellkernen	98
7.4	Dichtebilder einiger SKBR3-Zellkerne mit H3 (tri methyl K9)- Markierung	100
7.5	Distanzverteilungen zu den in Abbildung 7.4 B,F gezeigten SKBR3- Zellkernen	100
7.6	Distanzverteilung einer H3 (tri methyl K9)-Markierung	103
7.7	H2B-Distanzverteilung	104
7.8	Distanzverteilung der H3 (tri methyl K9)-Markierung im Vergleich der beiden verwendeten Zelllinien	105
7.9	H2B- und H3 (tri methyl K9)-Dichtebilder eines HeLa-Zellkerns	105
7.10	Mittelwerte der x -Positionen der Maxima für die während der Reparatur und Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen	107
7.11	Gesamtdistanzverteilungen der in der G2-Phase synchronisierten Zellen	108
7.12	Anzahl des Auftretens der charakteristischen Distanzen in den Gesamtdistanzverteilungen der in der G2-Phase synchronisierten Zellen	110

7.13	Mittelwerte der x -Positionen der Maxima für die während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen	111
7.14	Gesamtdistanzverteilungen der während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen	112
7.15	Anzahl des Auftretens der charakteristischen Distanzen in den Gesamtdistanzverteilungen der während der Bestrahlung in der G2-Phase synchronisierten Zellen	113
7.16	γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (1 Gy, 30 min nach Bestrahlung)	114
7.17	γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (2 Gy, 30 min nach Bestrahlung)	115
7.18	γ H2AX-Reparaturcluster im Heterochromatin (1 Gy, 30 min nach Bestrahlung)	116
7.19	Heterochromatin-Dichtevertelung um γ H2AX-Cluster	119
7.20	Mittlere Heterochromatindichtevertelung um γ H2AX-Reparaturzentren	120
7.21	Vorgehen bei der topologischen Datenanalyse.	122
7.22	Dichteerteilung um γ H2AX-Cluster	123
7.23	Darstellung eines Zellkerns und γ H2AX-Reparaturclusters, anhand dessen beispielhaft die Erstellung des Barcodes gezeigt wird	124
7.24	Bestimmung des Barcodes eines γ H2AX-Clusters (weitere Darstellungen des Zellkerns und des Cluster in Abbildung 7.23)	125
7.25	Schematische Darstellung einer Heatmap	126
7.26	Dichte- und Größenvergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung	129
7.27	Topologischer Vergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung	130
7.28	Topologischer Vergleich der analysierten Cluster per Heatmapdarstellung	131
7.29	Einfluss von Bestrahlung auf die Anzahl der gemessenen Alu-Punkte	132
7.30	Alu-Regionen im Zusammenhang mit Heterochromatin (100 mGy, 30 min nach Bestrahlung)	133
7.31	Alu-Regionen im Zusammenhang mit Heterochromatin (500 mGy, 30 min nach Bestrahlung)	134
7.32	Heterochromatindichtevertelung um Alu-Cluster	136

ANHANG C

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht der durchgeführten Aufnahmen, die zu einem Lokalisationsdatensatz in den Kanälen 561 nm und 491 nm gehören. . . .	44
3.2	Inhalt der Koordinatenmatrix	46
4.1	Verwendete Antikörper und zugehörige Färbebedingungen	53
6.1	Übersicht Ausgabediagramme Chromatinanalyse	86
7.1	Übersicht der durchgeführten Experimente an SKBR3-Zellen . . .	99

ANHANG D

Datenblätter


D.1 Zelllinie SKBR3




Product Sheet

SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
**liquid nitrogen
vapor
temperature**



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue:

mammary gland/breast; derived from metastatic site: pleural effusion

Disease: adenocarcinoma

Age: 43 years

Gender: female

Morphology: epithelial

Growth Properties: adherent

Isoenzymes:

AK-1, 1-2

ES-D, 1

G6PD, B

GLO-I, 2

PGM1, 1-2

PGM3, 1

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 12

D13S317: 11,12

D16S539: 9

D5S818: 9,12

D7S820: 9,12

THO1: 8,9

TPOX: 8,11

vWA: 17

Cytogenetic Analysis: This is a hypertriploid human cell line with the modal chromosome number of 84, occurring in 34% of cells. Cells having 80 chromosomes also occurred at a high rate (28%); the higher ploidy cells occurred at 7.3%. This cell line has a very complex chromosome composition. Thirty-five to 40% of chromosomes in a cell complement with a modal chromosome number of 84 consisted of structurally altered marker chromosomes. Several markers are longer than chromosome N1. The origins of most of these markers, however, are not clear. Some markers may have at least three individual chromosome segments. The markers [i.e., ?der(1)t(1;21) (p13;q21) [or ?t(1q21q)], ?del(2) (q13), and t(7pter--cen--?), present in some cells only] were the only ones in which portions of chromosome segments could be identified. Most cells had about three normal X chromosomes and five or more N7. The structurally normal N1, N14 and N17 were generally absent.

Batch-Specific Information

Refer to the Certificate of Analysis for batch-specific test results.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.



1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out



Product Sheet

SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC®) HTB-30™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor temperature
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

under strict aseptic conditions.

3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 xg for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a 25 cm² or a 75 cm² culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.



Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 mL of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 x g for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 mL of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Volumes are given for a 75 cm² flask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes. Corning® T-75 flasks (catalog #430641) are recommended for subculturing this product.

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin, 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
6. Incubate cultures at 37°C.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week



Cryopreservation Medium

Complete culture medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

The patient, a White, Caucasian female, age 43, blood type A+, had been treated with radiation, steroids, cytoxan and 5-fluorouracil.

No virus particles.

Ultrastructural features include microvilli and desmosomes, glycogen granules, large lysosomes, bundles of cytoplasmic fibrils.

The SK-BR-3 cell line overexpresses the HER2/c-erb-2 gene product.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Product Sheet

SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC®) HTB-30™

Please read this **FIRST**

Storage Temp.
**liquid nitrogen
vapor
temperature**

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™)



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2015. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [02/02]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

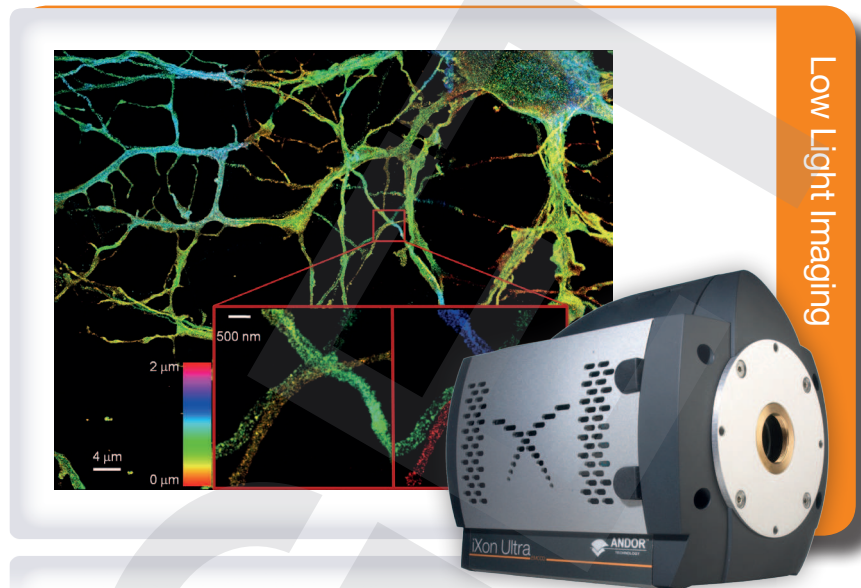
800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

D.2 EM-CCD-Kamera

Features and Benefits

- **Overclocked to 17 MHz readout**
Industry fastest frame rates; 56 fps full frame.
- **TE cooling to -100°C**
Critical for elimination of dark current detection limit
- **OptAcquire**
Optimize the highly flexible iXon for different application requirements at the click of a button
- **Count Convert**
Quantitatively capture and view data in electrons or incident photons. Real-time or post-processing
- **Cropped Sensor Mode**
Specialised acquisition mode for continuous imaging with fastest possible temporal resolution. 595 fps with 128 x 128 ROI.
- **RealGain™**
Absolute EMCCD gain selectable directly from a linear and quantitative scale
- **EMCAL™**
Patented user-initiated self-recalibration of EM Gain
- **Direct Data Access**
Camera Link output port to facilitate direct access to data for 'on the fly' processing.
- **Spurious Noise Filters**
Intelligent algorithms to filter clock induced charge events from the background. Real time or post-processing
- **iCam**
The market-leading exposure time fast-switching software
- **Minimal Clock-Induced Charge**
Unique pixel clocking parameters, yielding minimized spurious noise floor
- **UltraVac™ *1**
Critical for sustained vacuum integrity and to maintain unequalled cooling and QE performance, year after year
- **Selectable amplifier outputs – EMCCD and conventional**
'2 in 1' flexibility. EMCCD for ultra-sensitivity at speed, conventional CCD for longer acquisitions
- **Superior Baseline Clamp and EM stability**
Quantitative accuracy of dynamic measurements
- **USB 2.0**
Universal plug and play capability
- **Built-in C-mount compatible shutter**
Easy means to record reference dark images



Market leading back-illuminated EMCCD, now over 60% faster.

The new iXon Ultra platform takes the popular back-illuminated 512 x 512 frame transfer sensor and overclocks readout to 17 MHz, pushing speed performance to an outstanding 56 fps (full frame), whilst maintaining single photon sensitivity and quantitative stability throughout.

The iXon Ultra maintains all the advanced performance attributes that have defined the industry-leading iXon range, such as deep vacuum cooling to -100°C, extremely low spurious noise, and Andor's patented EM gain recalibration technology (EMCAL™). Count Convert functionality allows real time data acquisition in units of electrons or incident photons and OptAcquire facilitates one-click optimization of this versatile camera to a variety of application conditions.

Additional new features of the iXon Ultra include plug and play USB connectivity, a lower noise conventional CCD mode and an additional Camera Link output, offering the unique ability to directly access data for 'on the fly' processing, ideally suited to data intensive applications such as adaptive optics or super-resolution microscopy.

Specifications Summary

Active pixels	512 x 512
Pixel size (W x H)	16 x 16 µm
Active area pixel well depth	160,000 e ⁻
Gain register pixel well depth	800,000 e ⁻
Maximum readout rate	17 MHz
Frame rate	56 - 11074 fps
Read noise	< 1 e ⁻ with EM gain
Maximum cooling	-100°C

System Specifications ^{*2}

Model number	897
Sensor options	BV: Back Illuminated CCD, Vis optimized UVB: Back Illuminated CCD with UV coating BB: Back illuminated, blue optimized AR coating
Active pixels	512 x 512
Pixel size	16 x 16 μm
Image area	8.2 x 8.2 mm with 100% fill factor
Minimum temperature air cooled Coolant recirculator Coolant chiller, coolant @ 10°C, 0.75 l/min	-85°C -95°C -100°C
Digitization	True 16 bit @ all readout speeds
Triggering	Internal, External, External Start, External Exposure, Software Trigger
System window type	Single window with double-sided AR coating (standard for BV model)
Blemish specification	Grade 1 sensor (CCD97), as defined by the sensor manufacturer e2V For further details see www.e2v.com
PC Interface	USB 2.0
Lens Mount	C-mount
Direct Data Access	Camera Link 3-tap output

Advanced Performance Specifications ^{*2}

Dark current and background events ^{*3,4}		
Dark current (e ⁻ /pixel/sec) @ -85°C		0.001
Spurious background (events/pix) @ 1000x gain / -85°C		0.005
Gain register pixel well depth ^{*5}		800,000 e ⁻
Pixel readout rates	Electron Multiplying Amplifier Conventional Amplifier	17, 10, 5, 1 MHz 3, 1 & 0.08 MHz
Read noise (e ⁻) ^{*6}	Typical	With Electron Multiplication
17 MHz through EMCCD amplifier	90	< 1
10 MHz through EMCCD amplifier	55	< 1
5 MHz through EMCCD amplifier	42	< 1
1 MHz through EMCCD amplifier	21	< 1
1 MHz through conventional amplifier	6	-
80 kHz through conventional amplifier	3.5	-
Linear absolute Electron Multiplier gain	1 - 1000 times via RealGain™ (calibration stable at all cooling temperatures)	
Linearity ^{*7}	Better than 99%	
Vertical clock speed	0.3 to 3.3 μs (variable)	
Timestamp accuracy	10 ns	

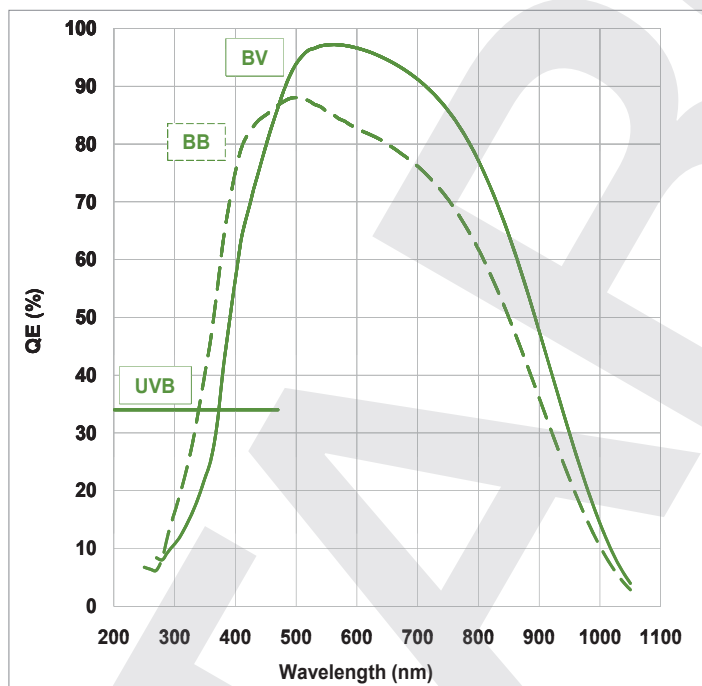
Frame Rates (Standard Mode) ^{**}

Binning	Array size						
	512 x 512	256 x 256	128 x 128	64 x 64	512 x 100	512 x 32	512 x 1
1 x 1	55.87	109.8	212.3	396.8	277.01	704.23	2857.1
2 x 2	108.7	210.1	393.7	699.3	502.5	1136.4	
4 x 4	206.2	384.6	680.3	1099	840.3	1612.9	

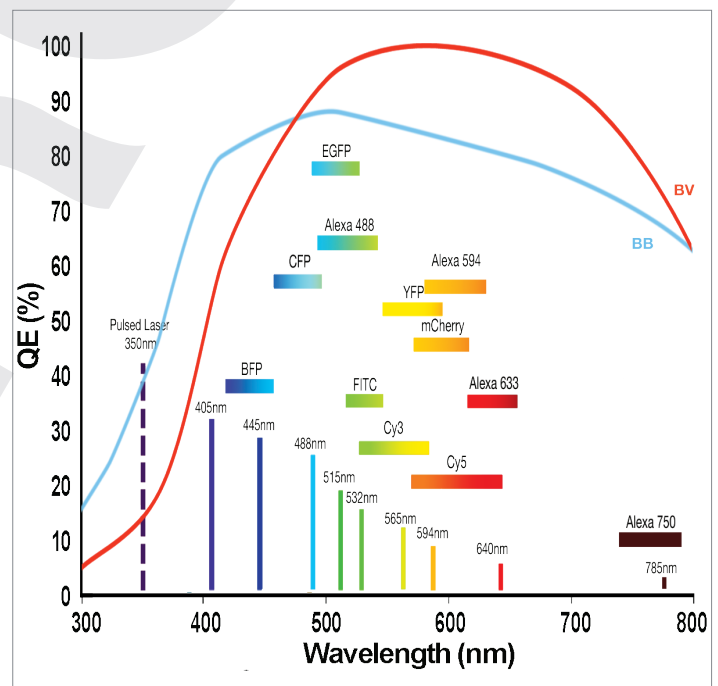
Frame Rates (Cropped Sensor Mode) ^{**}

Binning	Array size						
	256 x 256	128 x 128	64 x 64	32 x 32	512 x 100	512 x 32	512 x 1
1 x 1	111.08	595.17	1432.9	3532.3	295.83	857.41	11074
2 x 2	214.94	1084.5	2432.5	5324.8	570.19	1588.8	
4 x 4	401.77	1802.1	3576.5	6578.9	1050	2682.4	

Quantum Efficiency Curves ^{**}



QE v Fluorophores Curve



Creating The Optimum Product for You

How to customize the iXon Ultra 897:

Step 1.

The iXon Ultra 897 comes with 3 options for sensor types. Please select the sensor which best suits your needs.

Step 2.

Please indicate alternative window option if required.

Step 3.

Please indicate which software you require.

Step 4.

For compatibility, please indicate which accessories are required.

DU-897U-CS0-#BV
example shown

Step 1.

Choose sensor finish option

#BV: Back-illuminated, mid-band AR coated sensor
UVB: Back-illuminated, UV coated sensor
#BB: Back-illuminated, blue optimized AR coated sensor

Step 2. (Optional)

The iXon Ultra 897 with #BV sensor is supplied with an AR coated Quartz window as standard, optimized for the 400 to 900 nm. The UVB and #BB models are supplied with an uncoated Quartz window.

The following **alternative** window choices are available and must be ordered at time of build (if selected):

WIN-35MM-250/450-W Quartz window, AR coated for 250-450 nm. 97% transmission at 260 nm
WIN-35MM-600/1100-W Quartz window, AR coated for 600-1100 nm. 98% transmission at 1000 nm

Step 3.

The iXon Ultra requires at least one of the following software options:

Solis for Imaging A 32-bit application compatible with 32 and 64-bit Windows (XP, Vista and 7) and Linux offering rich functionality for data acquisition and processing. AndorBasic provides macro language control of data acquisition, processing, display and export.

Andor SDK A software development kit that allows you to control the Andor range of cameras from your own application. Available as 32 and 64-bit libraries for Windows (XP, Vista and 7) and Linux. Compatible with C/C++, C#, Delphi, VB6, VB.NET, LabVIEW and Matlab.

Andor iQ A comprehensive multi-dimensional imaging software package. Offers tight synchronization of EMCCD with a comprehensive range of microscopy hardware, along with comprehensive rendering and analysis functionality. Modular architecture for best price/performance package on the market.

Third party software compatibility

Drivers are available so that the iXon range can be operated through a large variety of third party imaging packages. See Andor web site for detail: andor.com/software

Step 4.

The following accessories are available:

OPTOMASK Optomask microscopy accessory, used to mask unwanted sensor area during Cropped Sensor mode acquisition.

XW-RECR Re-circulator for enhanced cooling performance

ACC-XW-CHIL-160 Oasis 160 Ultra compact chiller unit

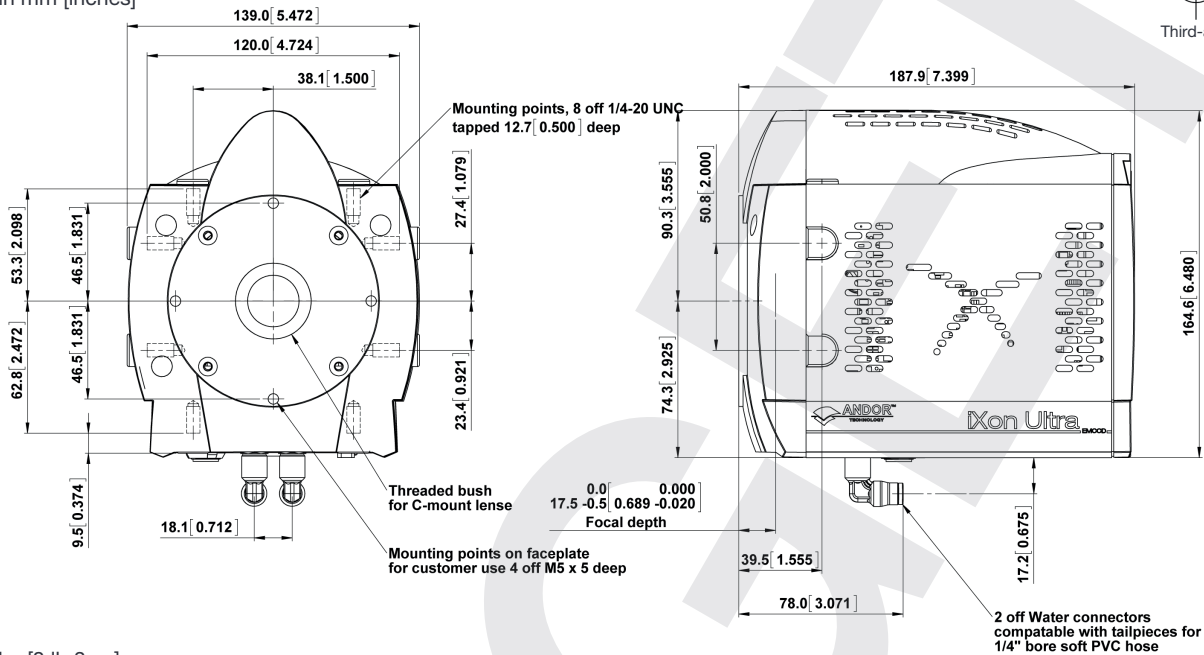
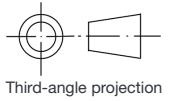
OA-CNAF C-mount to Nikon F-mount adapter

OA-COFM C-mount to Olympus adapter

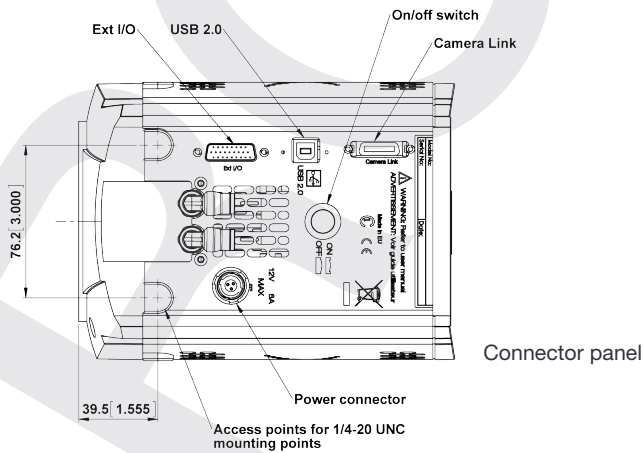
OA-CTOT C-mount to T-mount adapter

Product Drawings

Dimensions in mm [inches]



Weight: 3.7 kg [8 lb 3 oz]



Connecting to the iXon Ultra

Camera Control

Connector type: USB 2.0

TTL / Logic

Connector type: 26 way D Type with 8 programmable digital inputs or outputs for control and sensing of up to 8 external device

Camera Link Out

Base 3-tap output (MDR 26 connector). Used as a parallel output for embedded applications.

Minimum cable clearance required

90 mm

Typical Applications

Single molecule detection	Cell Motility
Super resolution (PALM, STORM)	Whole genome sequencing
TIRF microscopy	FRET / FRAP
Spinning disk confocal microscopy	Fluorescence Correlation Microscopy (multi-beam)
Vesicle trafficking	Microspectroscopy / Hyperspectral imaging
Selective/single plane illumination microscopy (SPIM)	Lucky astronomy
Ion signalling (Calcium flux)	Adaptive Optics
Voltage sensitive dyes	Single Photon Counting



Order Today

Need more information? At Andor we are committed to finding the correct solution for you. With a dedicated team of technical advisors, we are able to offer you one-to-one guidance and technical support on all Andor products. For a full listing of our local sales offices, please see: andor.com/contact

Our regional headquarters are:

Europe

Belfast, Northern Ireland
Phone +44 (28) 9023 7126
Fax +44 (28) 9031 0792

Japan

Tokyo
Phone +81 (3) 3518 6488
Fax +81 (3) 3518 6489

North America

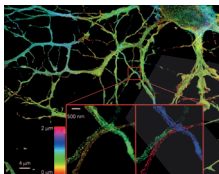
Connecticut, USA
Phone +1 (860) 290 9211
Fax +1 (860) 290 9566

China

Beijing
Phone +86 (10) 5129 4977
Fax +86 (10) 6445 5401

Items shipped with your camera:

- 1x Andor ACZ-03452: 2m Multi I/O timing cable, offering Fire, External Trigger, Shutter and Arm
- 1x 3m USB 2.0 cable Type A → Type B
- 1x Power supply with mains cable
- 1x Quick launch guide
- 1x CD containing Andor user manuals
- 1x Individual system performance booklet



Front cover image: A large scale 3D STORM image of a cultured hippocampal neuron colored in z. Courtesy of Melike Lakadamyali, Institute of Photonic Sciences, ICFO, Barcelona, Spain and Hazen Babcock from Harvard University, Cambridge, MA

Footnotes: Specifications are subject to change without notice

1. Assembled in a state-of-the-art cleanroom facility, Andor's UltraVac™ vacuum process combines a permanent hermetic vacuum seal (no o-rings), with a stringent protocol to minimize outgassing, including use of proprietary materials.
2. Figures are typical unless otherwise stated.
3. The dark current measurement is averaged over the sensor area excluding any regions of blemishes.
4. Using Electron Multiplication the iXon is capable of detecting single photons, therefore the true camera detection limit is set by the number of 'dark' background events. These events consist of both residual thermally generated electrons and Clock Induced Charge (CIC) electrons (also referred to as Spurious Noise), each appearing as random single spikes above the read noise floor.
A thresholding scheme is employed to count these single electron events and is quoted as a probability of an event per pixel. Acquisition conditions are full resolution and max frame rate (17 MHz readout; frame-transfer mode; 0.5 μs vertical clock speed; x 1000 EM gain; 10 ms exposure; -85°C).
5. The EM register on CCD97 sensors has a linear response up to ~400,000 electrons max. and a full well depth of ~800,000 electrons max.
6. Readout noise is for the entire system. It is a combination of sensor readout noise and A/D noise. Measurement is for Single Pixel readout with the sensor at a temperature of -75°C and minimum exposure time under dark conditions. Under Electron Multiplying conditions, the effective system readout noise is reduced to sub 1 e⁻ levels.
7. Linearity is measured from a plot of counts vs. exposure time under constant photon flux up to the saturation point of the system.
8. All measurements are made at 17 MHz pixel readout speed with 0.3 μs vertical clock speed. It also assumes internal trigger mode of operation.
9. Quantum efficiency of the sensor at 20°C, as measured by the sensor Manufacturer.

Recommended Computer Requirements:

- 3.0 GHz single core or 2.6 GHz multi core processor
- 2 GB RAM
- 100 MB free hard disc to install software (at least 1 GB recommended for data spooling)
- USB 2.0 High Speed Host Controller capable of sustained rate of 40MB/s
- 10,000 rpm SATA hard drive preferred for extended kinetic series
- Windows (XP, Vista and 7) or Linux

Operating & Storage Conditions

Operating Temperature 0°C to 30°C ambient
Relative Humidity < 70% (non-condensing)
Storage Temperature -25°C to 50°C

Power Requirements

110 - 240 VAC, 50/60 Hz



LIXonU897SS 1111 D3

Publikationen

Yang Zhang, Gabriell Mate, Patrick Müller, Sabina Hillebrandt, **Matthias Krufczik**, Margund Bach, Rainer Kaufmann, Michael Hausmann und Dieter W. Heermann. Radiation Induced Chromatin Conformation Changes Analysed by Fluorescent Localization Microscopy, Statistical Physics, and Graph Theory. *PLoS One*, 10(6): e0128555, 2015.

Matthias Krufczik, Aaron Sievers, Annkathrin Hausmann, Jin-Ho Lee, Georg Hildenbrand, Wladimir Schaufler und Michael Hausmann. Combining low temperature fluorescence DNA-hybridization, immunostaining and super-resolution localization microscopy for nano-structure analysis of ALU elements and their influence on chromatin structure. *MDPI – International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1005, 2017.

Jan Philipp Eberle, Alexander Rapp, **Matthias Krufczik**, Marion Eryilmaz, Manuel Gunkel, Holger Erfle und Michael Hausmann. Super-Resolution Microscopy Techniques and their Potential for Applications in Radiation Biophysics. *Springer Protocols* (Manuskript eingereicht und vom Journal zur Publikation angenommen).

Michael Hausmann, Emma Wagner, **Matthias Krufczik**, Gerrit Schrock, Matthias Port, Felix Bestvater und Harry Scherthan. Super-resolution localization microscopy discloses radiation-induced histone H2AX phosphorylation in the periphery of heterochromatin clusters of human cells. *MDPI – International Journal of Molecular Sciences* (Manuskript eingereicht).

Michael Hausmann, Franziska Theda, Florian Schock, Natasa Ilic, Aurora Paola Borroni, Nadine Waltrich, **Matthias Krufczik**, Jan Neumann, Maksym Gachkivskyi, Götz Pilarczyk, Georg Hildenbrand, Christoph Cremer und Michael Blank. Challenges for super-resolution microscopy and fluorescent nano-probing: Understanding mechanisms behind tumour development and treatment. *Wiley Online Library - Cancer Medicine (Manuskript eingereicht)*.

Marion Eryilmaz, Eberhard Schmitt, **Matthias Krufczik**, Franziska Theda, Wladimir Schaufler, Felix Bestvater, Georg Hildenbrand und Michael Hausmann. Super-resolution Microscopy Meets Radiation Biophysics: Localization Microscopy Analyses of MRE11 in 3D-conserved Cell Nuclei. *MDPI photonics (Manuskript eingereicht)*.

Andreas Hofmann, **Matthias Krufczik**, Michael Hausmann und Dieter W. Heermann. Analyzing DNA Double-Strand Break Repair Processes with High-Resolution Localization Microscopy and Persistent Topology. *(Manuskript in Vorbereitung)*.

Margund Bach, Claudia Savini, **Matthias Krufczik**, Christoph Cremer, Frank Rösl und Michael Hausmann. Super-Resolution Localization Microscopy of γ -H2AX and Heterochromatin after Folat Deficiency. *(Manuskript in Vorbereitung)*.

Konferenzbeiträge

Michael Hausmann, **Matthias Krufczik**, Emma Wagner, Robert Chojowski, Franziska Theda, Marion Eryilmaz, Jin-Ho Lee, Michel Peper, Götz Pilarczyk, Georg Hildenbrand und Harry Scherthan. Radiation-induced re-arrangements of molecular complexes studied in 3D-conserved cells und cell nuclei by super-resolution localization microscopy. *22nd Nuclear Medical Defense Conference – ConRad 2017, München, Deutschland.*

Andreas Hofmann, **Matthias Krufczik**, Michael Hausmann und Dieter W. Heermann. Analyzing DNA Double-Strand Break Repair Processes with High-Resolution Localization Microscopy and Persistent Topology. *Annual Meeting – Biophysical Society 2017, New Orleans, USA.*

Michael Hausmann, **Matthias Krufczik**, Götz Pilarczyk, Johannes Zillner, Marion Eryilmaz, Franziska Theda, Ines Nesnidal, Emma Wagner, Nicolas Kocher, Felipe Moser, Margund Bach, Florian Schock, Patrick Müller, Frederik Wenz, Christoph Cremer, Harry Scherthan, Felix Bestvater und Georg Hildenbrand. Lessons from super-resolution localization microscopy: Mechanisms behind radiation induced olecular re-arrangements. *Annual Meeting of the European Radiation Research Society 2016, Amsterdam, Niederlande.*

Matthias Krufczik, Georg Hildenbrand, Nicolas Kocher, Johannes Zillner, Franziska Theda, Margund Bach, Wladimir Schaufler, Christoph Cremer, Felix Bestvater und Michael Hausmann. Analysing Nucleosomal Arrangements after Irradiation and during Repair with High Resolution Localisation Microscopy. *Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research 2016, Erlangen, Deutschland.*

Matthias Krufczik, Georg Hildenbrand, Johannes Zillner, Marion Eryilmaz, Franziska Theda, Jin-Ho Lee, Margund Bach, Wladimir Schaufler, Christoph Cremer, Felix Bestvater and Michael Hausmann. Analysing Nucleosomal Arrangements after Irradiation and during Repair with High Resolution Localisation Microscopy. *Focus on Microscopy 2016, Taipei, Taiwan*.

Matthias Krufczik, Georg Hildenbrand, Abin Biswas, Franziska Theda, Jan Philipp Eberle, Jin-Ho Lee, Margund Bach, Wladimir Schaufler, Christoph Cremer, Felix Bestvater und Michael Hausmann. Analysing Nucleosomal Arrangements after Irradiation and during Repair with High Resolution Localisation Microscopy. *International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology 2015, Ermatingen, Schweiz*.

Georg Hildenbrand, **Matthias Krufczik**, Abin Biswas, Jan Philipp Eberle, Franziska Theda, Patrick Müller, Yang Zhang, Gabriell Mate, Margund Bach, Jutta Schwarzfisterle, Dieter W. Heermann, Christoph Cremer, Marlon Veldvijk, Frederik Wenz und Michael Hausmann. Entering the nano-cosmos of cell nuclei: Changes of nucleosomal arrangements after irradiation and during repair. *International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology 2015, Ermatingen, Schweiz*.

Matthias Krufczik, Georg Hildenbrand, Franziska Theda, Abin Biswas, Yang Zhang, Gabriell Mate, Felipe Moser, Jan Philipp Eberle, Margund Bach, Jutta Schwarzfisterle, Patrick Müller, Fraderik Wenz, Harry Scherthan, Christoph Cremer, Dieter W. Heermann, Michael Hausmann. Changes of nucleosomal arrangements after irradiation and during repair as detected by super resolution localization microscopy. *International Congress of Radiation Research 2015, Kyoto, Japan*.

Georg Hildenbrand, **Matthias Krufczik**, Abin Biswas, Jan Philipp Eberle, Franziska Theda, Patrick Müller, Yang Zhang, Garbiell Mate, Margund Bach, Jutta Schwarzfisterle, Dieter W. Heermann, Christoph Cremer, Marlon Veldvijk, Frederik Wenz und Michael Hausmann. Entering the Nano-Cosmos of Cell Nuclei: Changes of Nucleosomal Arrangemetns after Irradiation und during Repair. *Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research 2014, Tübingen, Deutschland*.

Michael Hausmann, Georg Hildenbrand, Patrick Müller, Abin Biswas, Margund Bach, Alexander Al Saroori, Felipe Moser, **Matthias Krufczik**, Manuela Felix, Johannes Thölking, Dominik Kretz, Udo Birk, Christoph Cremer und Frederik Wenz. Radiation induced changes of the chromatin nanostructure. *Annual Meeting of the European Radiation Research Society 2013, Dublin, Irland*.

Matthias Krufczik, Patrick Müller, Yang Zhang, Gabriell Mate, Georg Hildebrand, Abin Biswas, Udo Birk, Christoph Cremer, Dieter W. Heermann und Michael Hausmann. Radiation induced changes of the chromatin nanostructure. *Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research 2013, Darmstadt, Deutschland*.

Erklärung:

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg, den 22.5.2017

.....

(Matthias Krufczik)