

Dirk Lars Kienle  
Dr. med.

## **Untersuchungen zur Chromatinarchitektur in Zellkernen von menschlichen Fruchtwasserzellen und Neuroblastomzellen**

Geboren am 29.03.1972 in Heilbronn  
Reifeprüfung am 11.06.1991 in Heilbronn  
Studiengang der Fachrichtung Humanmedizin vom WS 1992/1993 bis WS 1998/1999  
Physikum am 30.08.1994 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium an der Universität Heidelberg/Heidelberg  
Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Heidelberg  
Staatsexamen am 03.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Th. Cremer

Im Vergleich zu dem zwischenzeitlich hohen Wissensstand bezüglich der linearen Organisation der DNA, gibt es noch wenige Erkenntnisse über die dreidimensionale Organisation des Chromatins. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an morphologisch erhaltenen Zellkernen, Aufnahme der Fluoreszenzsignale durch ein konfokales Laser Scanning- Mikroskop (CLSM) und anschließende Bildverarbeitung, wurden in dieser Arbeit dreidimensionale Informationen über die Chromatinstruktur im Interphasezellkern von menschlichen Fruchtwasserzellen und Neuroblastomzellen gewonnen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden p- und q- Arme sowie telomernahe Regionen des Chromosoms 3 in Fruchtwasserzellkernen dargestellt. Es zeigte sich, daß die Chromosomenarme im Interphasezellkern distinkte, weitgehend kompakte Territorien einnehmen. Eine Überlappung mit benachbartem Chromatin bleibt auf eine enge Grenzzone beschränkt. Auch die telomernahen Regionen stellten sich als deutlich separierte chromosomale Subkompartimente dar. Die räumliche Anordnung der Chromosomenarme und Telomere zueinander war höchst variabel. Die gewonnenen Telomer- Telomer- Abstände wurden mit den zu erwartenden Werten nach dem „Random Walk/ Giant Loop- Modell“ verglichen. Dieses Modell geht von einem „Proteinrückgrat“ der Chromosomen aus, das aus kleinen Einheiten frei beweglicher Proteinverbindungsstücke besteht. Es fand sich keine überzeugende Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment. Eine gute Übereinstimmung erbrachte dagegen das „Multiloop Subkompartiment- Modell“, das von definierten chromosomalen Subkompartimenten ausgeht. Zusammengenommen sprechen diese Befunde für eine Untergliederung der Chromosomen in chromosomale Subkompartimente. Möglicherweise entsprechen diese Subkompartimente den „Subchromosomalen Foci“, die in Replikationsexperimenten als funktionelle Einheiten der DNA- Replikation beschrieben wurden und die mit den R- bzw. G- Banden des mitotischen Chromosoms korrespondieren. Die große Variabilität in der Anordnung der Subkompartimente zueinander könnte Ausdruck dynamischer Prozesse im Zellkern sein und dient möglicherweise der Positionierung bestimmter Chromatineinheiten in funktionellen Zellkernkompartimenten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Morphologie und Topologie sowie das Replikationsverhalten tumorspezifischen Chromatins untersucht. Die verwendeten Neuroblastomzelllinien enthalten das MYCN- Gen in amplifizierter Form, entweder als extrachromosomale „Double Minutes“ (DMs) oder als „Homogeneously Staining Region“ (HSR). Die Amplifikation dieses Genes spielt in der Tumorentstehung und - progression eine

große Rolle und ist transkriptionell hochaktiv. Die DMs wurden zur räumlichen Zuordnung im Verhältnis zu ausgewählten Chromosomenterritorien dargestellt. Es wurde um die segmentierte Oberfläche des Chromosomenterritoriums herum ein „peripheres Volumen“ und im Inneren des Territoriums ein „inneres Volumen“ festgelegt. Nun konnte die Dichte der DMs im jeweiligen Kompartiment bestimmt werden. Die Anzahl der DMs/  $\mu\text{m}^3$  war an der Territoriums Oberfläche hochsignifikant größer als im Territoriumsinneren, DMs sind also präferentiell an der Oberfläche von Chromosomenterritorien lokalisiert. Dies könnte ein Indiz für die Existenz des „Interchromosome Domain (ICD) Compartments“ sein. Das ICD- Modell geht von distinkten Chromosomenterritorien und -subterritorien aus, zwischen denen sich ein interchromosomaler Spalt ausbreitet, der direkt in nukleäre Funktionsvorgänge wie Splicing, Transkription, DNA- Reparatur und RNA- Transport involviert ist. Demnach wäre für transkriptionell aktive Gene eine räumliche Nähe zu diesem funktionellen Zellkernkompartiment erforderlich.

HSRs wurden ebenfalls im Vergleich zu Chromosomenterritorien dargestellt. HSRs nahmen distinkte Territorien im Interphasezellkern ein. Allerdings zeigten sie im Gegensatz zu Chromosomenterritorien eine auffallende morphologische Variabilität mit teilweise sehr kompakter, häufiger aber sehr aufgelockerter Morphologie. Dies könnte auf unterschiedliche Funktionszustände des Chromatins hindeuten. Umfassende Remodellierungsvorgänge von Chromatin abhängig von seiner transkriptionellen Aktivität wurden bereits beschrieben. Überträgt man bisherige Erkenntnisse auf unsere Experimente, so wären die stark aufgelockerten (dekondensierten) HSRs transkriptionell hochaktiv, die kompakten (kondensierten) eher inaktiv. Eine mit einer solchen Dekondensation verbundene Oberflächenvergrößerung aktiven Chromatins könnte im Sinne des ICD- Modells den Zugang zu Transkriptionsfaktoren des ICD- Spaltes erleichtern.

Das DNA- Replikationsverhalten der HSRs in der S- Phase wurde mittels Doppelpulsmarkierung mit Nukleotidanaloga im Vergleich zu Chromosomenterritorien untersucht. In den chromosomalen Replikationsregionen zeigte sich eine klare Trennung von früh und spät replizierenden „Subchromosomalen Foci“. HSRs replizierten dagegen häufig diffus über das gesamte HSR- Territorium verteilt mit einer deutlichen, teilweise vollständigen Überlappung früher und später Replikationszonen. Ursache hierfür ist möglicherweise die fehlende Subkompartimentierung der HSRs, sodaß die Replikation weder räumlich noch zeitlich strukturiert ablaufen kann. Dies würde auch mit dem Befund der fehlenden Bänderung der HSRs in der Metaphase korrespondieren.

Zur weiteren Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Chromatintopologie und transkriptioneller Aktivität wäre eine unmittelbare Darstellung transkriptioneller Aktivität, beispielsweise durch die Visualisierung von mRNA, im Zusammenhang mit entsprechenden Chromatinregionen sinnvoll. Außerdem ist zusätzlich zur räumlichen Erfassung funktioneller Vorgänge insbesondere auch deren zeitlicher Ablauf von Bedeutung („4D“), sodaß „in vivo“- Untersuchungen zur Erfassung räumlicher und zeitlicher Zusammenhänge erstrebenswert sind. Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung chromosomaler Substrukturen stellt die momentan limitierende lichtmikroskopische Auflösung dar. Eine Weiterentwicklung der mikroskopischen Verfahren mit einer Verbesserung der Auflösungsgrenzen ist hierfür unabdingbare Voraussetzung.