

Martin Granzow  
Dr. med.

## **Größe, Gestalt und Grenzen dreidimensional rekonstruierter Territorien von Interphasechromosomen in menschlichen Fruchtwasserzellkernen**

Geb.: 17.03.1970 in Heidelberg  
Reifeprüfung: 11.5.1989  
Studiengang der Fachrichtung Medizin ab SoSe 1991.  
Physikum: 22.3.1993 an der Universität zu Mainz.  
Klinisches Studium in Mannheim und Heidelberg.  
Praktisches Jahr in Mannheim.  
3. Staatsexamen: 2.6.99 an der Universität Heidelberg

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

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH), konfokaler Laserscanning-Mikroskopie und computergestützter Bildverarbeitung an menschlichen Fruchtwasserzellen durchgeführt. Die Territorien von Interphasechromosomen wurden selektiv und unterscheidbar sichtbar gemacht, um zum einen die Messung morphologischer Parameter zu ermöglichen und zum anderen das mögliche Überlappen von direkt benachbarten Chromosomenterritorien zu untersuchen.

Die morphologischen Parameter, die berechnet wurden, stellen das Volumen, die Oberflächengröße und einen Rundheitsfaktor, der Volumen in Relation zur Oberfläche setzt, von den einzelnen Territorien dar. Das Volumen und die Oberflächengröße wurden mit dem DNA-Gehalt der jeweiligen Chromosomen in Bezug gesetzt.

Die Untersuchung bezüglich des Überlappens von Chromatin benachbarter Chromosomenterritorien wurde mit zwei in unterschiedlicher Farbe gefärbten Chromosomen durchgeführt, um eine eindeutige Unterscheidung zwischen beiden treffen zu können.

### **Berechnung morphologischer Daten von Interphasechromosomen**

Insgesamt wurden neun verschiedene Experimente durchgeführt, die jeweils zwei Chromosomen direkt miteinander vergleichen konnten. Die Vergleiche erfolgten zwischen den Chromosomen 4 und 8, 4 und 10, 4 und 16, 4 und 19, sowie zwischen Chromosom 8 und 2 (in zwei Experimenten), 8 und 13, 2 und 11 und 18 und 19. Alle Experimente zusammen genommen ergibt das die Untersuchung von 456 Zellkernen mit 1824 Chromosomenterritorien.

## **Signalintensitäten der Interphasehybridisierungen**

In drei dieser Experimente konnte nachträglich festgestellt werden, daß die Intensitäten der Fluoreszenzsignale, die von den Chromosomenterritorien aufgenommen wurden, zwischen den beiden Chromosomenpaaren nicht gleich stark waren, sondern ein Paar stärkere Signale aufwies als das zusammen mit diesem im selben Experiment hybridisierte. Da im Rahmen der computergestützten Bildverarbeitung und Berechnung der Parameter dieselben Schwellenwerte für alle vier Chromosomenterritorien aus Gründen der Vergleichbarkeit gewählt wurden, mußten die schwächer gefärbten Territorien kleiner ausfallen, als dies bei gleichstarker Fluoreszenzintensität der beiden Chromosomenpaare der Fall gewesen wäre. Die betreffenden Experimente 4/8, 4/10 und 2/8 wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die beschriebene Fehlerquelle bei Untersuchungen mit diesen Methoden verlangt nach einer Standardisierung mit internen Kontrollen, um dreidimensionale Rekonstruktionen von Chromosomenterritorien vergleichen zu können. Die verbleibenden sechs Experimenten zeigten keine Unterscheide in der Signalintensität der Chromosomenterritorien.

### **Vergleiche zwischen Chromosomenterritorien sind nur innerhalb eines Experimentes durchführbar**

Die Vergleiche zwischen den Werten der mehrfach in verschiedenen Experimenten untersuchten Chromosomen machen deutlich, daß solche Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten nur sehr bedingt möglich sind. Die Vergleiche der Volumen und Oberflächengrößen der Territorien des gleichen Chromosoms in unterschiedlichen Experimenten zeigen signifikante Unterschiede in ihren Verteilungen. Dies kann an natürlich vorkommenden Unterschieden von Chromosomengrößen bei in Kultur gehaltenen Zellen und an der Schwellenwertabhängigkeit der Parameter liegen. Die Werteverteilungen der Rundheitsfaktoren zeigten jedoch ebenso signifikante Unterschiede, obgleich der Rundheitsfaktor unabhängig vom Schwellenwert ist.

### **Die Korrelation der Volumen und der Oberflächengrößen von Territorien mit dem DNA-Gehalt der Chromosomen**

Die Volumen der untersuchten Chromosomenterritorien konnten in drei Vergleichen gut mit dem DNA-Gehalt korreliert werden. Die Ergebnisse zeigten, daß der Volumenvergleich der Chromosomen 4/16, 4/19 und 8/13 gut mit dem Vergleich des entsprechenden DNA-Gehalts in Einklang zu bringen waren. Bei den Experimenten 2/8, 2/11 und 18/19 wies das Chromosomen mit dem niedrigeren DNA-Gehalt ein größeres Volumen auf, als es der DNA-Gehalt erwarten ließe. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß der DNA-Gehalt nicht generell als Indikator für das Volumen des entsprechenden Chromosomenterritoriums in Interphasekernen betrachtet werden kann.

Bei den Vergleichen der Oberflächengrößen zeigte lediglich das Experiment der Chromosomen 8 und 13 eine gute Übereinstimmung mit dem DNA-Gehalt. Alle übrigen Vergleiche wiesen den Chromosomen mit dem niedrigeren DNA-Gehalt größere Oberflächen zu. Die Oberflächengrößen von Chromosomenterritorien können also nur selten durch den DNA-Gehalt abgeschätzt werden.

## **Unterschiede zwischen den Parametern homologer Chromosomen in Interphasekernen**

Die Untersuchung der Experimente auf Unterschiede in Volumen, Oberflächengröße und Form homologer Chromosomenterritorien konnte zeigen, daß sich die Volumen und Oberflächengrößen im Mittel lediglich um weniger als den Faktor 1,3 unterscheiden und in den meisten Fällen um weniger als das 1,5-fache variiert. Die Form der Territorien homologer Chromosomen, durch den Rundheitsfaktor ausgedrückt, weicht etwas mehr voneinander ab. Der Rundheitsfaktor differiert in den untersuchten Zellkernen im Mittel um weniger als den Faktor 1,6, zeigt aber in Einzelfällen recht große Unterschiede.

## **Territorien benachbarter Chromosomen zeigen eine auf die Randbereiche beschränkte Vermischung des Chromatins**

Vierzig Zellkerne, die in einem Zwei-Farben-FISH-Experiment mit unterschiedlichen Farben gefärbt wurden, konnten nach Aufnahmen mit dem CLSM und dreidimensionaler Bildverarbeitung rekonstruiert werden. Die Kerne zeigen eng benachbarte Territorien von mindestens zwei der Chromosomen X und 7. Die dreidimensionale Rekonstruktion mit Darstellung der Oberflächengrenzen zeigte in keinem Fall ein ausgeprägtes gegenseitiges Durchdringen von Chromatin der Territorien. Vielmehr war die Vermischung von Chromatin auf Randbereiche beschränkt, die offen läßt, inwiefern derzeitige Präparationstechniken und/oder Auflösungsgrenzen des verwendeten konfokalen Mikroskops hierfür verantwortlich sind, oder ob sich hier tatsächliche in vivo-Verhältnisse zeigen.

Es könne zwei Schlußfolgerungen aus den durchgeführten Untersuchungen gezogen werden. Erstens kann die Größe der Interphaseterritorien nicht in jedem Fall mit dem DNA-Gehalt der entsprechenden Chromosomen korreliert werden.

Zweitens findet eine Vermischung von Chromatin benachbarter Chromosomenterritorien höchstens in den Randbereichen statt. Der Territorienkern bleibt vom Chromatin anderer Chromosomen unberührt.