

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

vorgelegt von
Diplom-Trophologin Claudia Batram
aus Cottbus
Tag der mündlichen Prüfung:

Hochpräzisionsgrößenmessung und Bestimmung der Topologie
subchromosomaler Domänen
nach molekularer Markierung unter Berücksichtigung des Einflusses
der Zellfixierung

Gutachter: PD Dr. Karsten Rippe
Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer

Hochpräzisionsgrößenmessung und Bestimmung der Topologie subchromosomaler Domänen nach molekularer Markierung unter Berücksichtigung des Einflusses der Zellfixierung - Lichtoptische Untersuchungen der dynamischen Zellkernarchitektur *in vivo* benötigen zum jetzigen Zeitpunkt aufwendige Markierungs- und Detektionstechniken. Für einige Fragestellungen, wie zum Beispiel die Größe und Lage von Genen, sind Messungen in fixierten Präparaten sinnvoll. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Fixierung auf die Morphologie von Zellkernen sowie auf die Größe und Position subchromosomaler Domänen im Zellkern quantitativ untersucht. Die Quantifizierung der Größen als laterale Ausdehnung erfolgte mittels dem *multi point model*. Die Morphologie der Zellkerne wird durch die Art der Fixierung und die Hybridisierung nicht einheitlich beeinflusst. Die laterale Ausdehnung der untersuchten Domänen unterscheidet sich nur gering zwischen den Fixierungen. Eine unterschiedliche Sensitivität innerhalb mitotischer Chromosomen gegenüber denaturierenden Prozessen konnte ebenfalls quantifiziert werden.

High precision size measurement and determination of the topology of subchromosomal domains after molecular labelling under consideration of the influence of cell fixation - Current light optical measurements of the dynamic nuclear cell architecture *in vivo* require elaborate labelling and detection techniques. Questions regarding the size and position of subchromosomal domains can be addressed more easily in fixed cells. In the present work the influence of fixation on the morphology of cell nuclei as well as on the size and the position of subchromosomal domains in nuclei were quantitatively investigated. The quantification of the lateral extent was calculated using the *multi point model*. The fixation and hybridization procedure had a non-uniform influence on the morphology of the cell nuclei. The lateral extent of the subchromosomal domains are only a slightly modified between different fixations. A different sensitivity inside mitotic chromosomes to denaturation could be also quantified.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Organisation des Interphase-Chromatins	9
1.1.1	Chromosomenterritorien (CT)	10
1.1.2	Interchromatische Domänen (ICD) und perichromatische Regionen (PR)	13
1.1.3	Zellkernorganisation und Transkription/Replikation	14
1.1.4	Kernmatrix	16
1.2	Kondensation von Chromatin und dessen Organisation	16
1.3	Molekulare Pathologie des Prostatakrebs	20
1.4	Fluoreszenzspektroskopie	24
1.4.1	Elektromagnetische Wellen	24
1.4.2	Grundlagen der Fluoreszenz	25
1.4.3	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (CLSM)	28
1.4.4	<i>Spatially Modulated Illumination</i> (SMI) <i>Microscopy</i>	30
1.4.5	Weitere Mikroskopietechniken	32
1.5	Zielsetzung	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Biologische Objekte	37
2.2	Physikalische Objekte (Beads)	38
2.3	Fluorochrome und verwendete Sonden	38
2.4	Adhärenente Zellen (LNCAP, VH7)	39
2.4.1	Kultur adhärenenter Zellen	39
2.4.2	Hypotone und nicht-hypotone Suspension	44

2.4.3	Formaldehydfixierung	45
2.5	Suspensionszellen	45
2.5.1	Isolierung mononuklearer Zellen (MNC) aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation	45
2.5.2	Kultur mononuklearer Zellen (MNC)	47
2.5.3	Hypotone und nicht-hypotone Suspension	47
2.5.4	Formaldehydfixierung	48
2.6	Proteinnachweis	50
2.7	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	52
2.7.1	Vorbehandlung der Zellen	53
2.7.2	Vorbehandlung von Gewebe	54
2.7.3	Vorbehandlung der Sonden	56
2.7.4	Hybridisierung und Nachbehandlung	56
2.8	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	57
2.9	Detektion	58
2.9.1	<i>Confocal Laser Scanning Microscop</i> (CLSM)	58
2.9.2	<i>Spatially Modulated Illumination</i> (SMI) <i>Microscop</i>	58
2.10	Bildauswertung	59
2.10.1	Volumen und Ausdehnung von Zellkernen	59
2.10.2	Laterale Ausdehnung und Anisotropie subchromosomaler Domänen	61
2.10.3	Relative radiale Position subchromosomaler Domänen	66
2.10.4	Distanz zwischen subchromosomalen Domänen	67
2.10.5	Modulationstiefe und axiale Ausdehnung	68
2.11	Statistik	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur	71
3.1.1	Lymphozyten	71
3.1.2	VH7	78
3.1.3	LNCAP	85
3.2	Bestimmung der Zellzyklusphase	92

3.2.1	VH7	92
3.2.2	LNCAP	92
3.3	Bestimmung der c-Myc-Expression in VH7 und LNCAP	95
3.4	Bestimmung der AMACR-Proteinexpression in VH7 und LNCAP	98
3.5	Laterale Ausdehnung und Anisotropie von <i>Beads</i>	100
3.6	Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> .	103
3.6.1	VH7	103
3.6.2	LNCAP	108
3.7	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Prostatakrebsgewebe	114
3.8	Bindungsspezifität der Oligo Centromer 9 Sonde in Lymphozyten und PCa-Gewebe	115
3.9	Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten .	118
3.10	Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 9 in PCa-Gewebe .	122
3.11	Laterale Ausdehnung subchromosomaler Domänen vs. laterale Ausdeh- nung der Zellkerne	125
3.12	Modulationstiefe von 100 nm <i>Beads</i>	126
3.13	Modulationstiefe von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in VH7	130
3.14	Radiale Lage und Distanz von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i>	134
3.14.1	VH7	134
3.14.2	LNCAP	136
3.15	Radiale Lage und Distanz von Centromer 9 in Lymphozyten	138
3.16	Topologie der subchromosomalen Domänen vs. Zellkernvolumen	140
4	Diskussion	143
4.1	Einfluss der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur auf die Morphologie von Zellkernen	143
4.2	c-Myc-Expression in Abhängigkeit des Synchronisierungsstatus von VH7 und LNCAP	147
4.3	Größen der subchromosomalen Domänen unter Berücksichtigung der Fi- xierung	149
4.4	Topologie subchromosomaler Domänen unter Berücksichtigung der Fixie- rung	162

5 Zusammenfassung und Ausblick	169
Abbildungsverzeichnis	176
Tabellenverzeichnis	178
Literaturverzeichnis	187

Abkürzungsverzeichnis

- BSA** Bovines Serumalbumin
- CCD** *charged coupled device* (hochsensitive digitale Kamera)
- CHO** *chinese hamster ovary cells*
- CT** Chromosomenterritorium/-en
- DAPI** 4,6-Diaminidino-2-phenylindol
- DMSO** Dimethylsulfoxid
- FISH** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
- FITC** Fluoreszeinisothiocyanat
- FWHM** *full width at half maximum*
- IC** interchromatisch (biol.), *internal conversion* (phys.)
- ICD** Interchromatische Domäne(n)
- Ig** Immunglobulin
- ISC** *intersystem crossing*
- kDa** Kilo-Dalton
- λ Wellenlänge in nm
- LOH** *loss of heterozygosity*
- min** Minute
- Mbp** Megabasenpaar(e)

- n** Anzahl
- n** nach FISH
- nt** Nukleotide
- PBS** *phosphat buffered saline*
- PCR** *polymerase chain reaction*
- PR** perichromatische Region(en)
- PSF** *point spread function* (Punktbildfunktion)
- RT** Raumtemperatur
- s** Sekunde
- SSC** Natriumchlorid/Sodiumcitrat
- TAE** Tris-Acetat-EDTA-Puffer
- TE** Tris-EDTA-Puffer
- TEM** Transmissions-Elektronenmikroskopie
- T_m** Schmelztemperatur
- TP-FWHM** *ten point-full width at half maximum*
- U** Units/Einheiten
- v** vor FISH
- VH7** humane embryonale Vorhautfibroblasten

1 Einleitung

Die spezielle Struktur der Desoxiribonukleinsäure (DNA) erlaubt das Kopieren, Ablezen, Reparieren und Rekombinieren der genetischen Information, wobei für die genaue Funktion neben der Primärstruktur auch die lokale Konformation wichtig ist. Diese wird entweder im Wechsel mit Proteinen oder durch spezielle Sequenzen der DNA direkt erzeugt. J. Watson und F. Crick beschrieben 1953 als erstes mit der Bezeichnung Doppelhelix die grundlegende dreidimensionale Struktur der DNA [82]. Seitdem haben sich zahlreiche Methoden entwickelt, die die statische (*in situ*) und dynamische Struktur (*in vivo*) der DNA im Zellkern untersuchen, um daraus Schlüsse zum Ablauf physiologischer bis hin zu pathologischer Prozesse zu ziehen. Die gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die (Früh-) Diagnostik, Therapie und Prognose von Krankheiten, wie beispielsweise Tumore der Prostata, Brust oder des lymphatischen Systems.

Bemühungen, die dreidimensionale Struktur der DNA in Form des Chromatins im Interphasezellkern zu untersuchen und zu verstehen, ebenfalls im Hinblick auf mögliche Beziehungen zur Krankheitsentstehung, riefen das Forschungsfeld der Zellkernarchitektur ins Leben. Grundlegende Gedanken dieses Gebietes sind, dass die Chromosomen im Zellkern nicht zufällig strukturiert sind und dass Abberationen auf Grund der Architektur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit entstehen. Zur Quantifizierung genomischer Strukturveränderungen wird nach molekularer Markierung bestimmter Bereiche der DNA im Zellkern, beispielsweise mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit anschließender Detektion am Fluoreszenzmikroskop, die Topologie mittels digitaler Bildauswertung berechnet. Dabei wird allgemein die Lage des Signals relativ zum Kernmittelpunkt und die Bestimmung der Distanz zwischen den Signalen als Parameter der Zellkerntopologie verwendet.

Weiterhin wird angenommen, dass die Architektur des Chromatins im Zellkern von der Aktivität (Transkription, Replikation) bestimmter chromosomaler Bereiche, zum Teil auch Zellzyklus-abhängig, bestimmt wird. Zur quantitativen Betrachtung der Aktivität wird deshalb angenommen, dass sich neben der Lokalisation im Kern auch die Größe der subchromosomalen Domänen verändert. Die Möglichkeiten, die mittels FISH markierten chromosomalen Regionen im nm-Bereich vertrauenswürdig zu vermessen, sind aufgrund verschiedener präparativer und optischer Grenzen limitiert.

Bezüglich der Präparation wären *in vivo* Markierungen subchromosomaler Regionen ohne Fixierung wünschenswert. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht in ausreichender Qualität möglich. Aus diesem Grund werden fluoreszenzmikroskopische Studien zur Zellkernarchitektur an fixierten und denaturierten biologischen Objekten durchgeführt. Dabei bleibt die Diskussion des Einflusses der Fixierung sowie der Denaturierung durch die Hybridisierungsprozedur bei der Interpretation der Daten nicht aus.

In der Fluoreszenzmikroskopie stehen ständig neue Verfahren zur Verfügung mit immer höher auflösender Technik. Trotz aller Entwicklung wird weitestgehend das konfokale Laser-Rastermikroskop in der Routine angewendet, welches für Objekte über 250 nm lateraler Ausdehnung sehr gut geeignet ist. Will man zusätzlich Informationen über die axiale bzw. dreidimensionale Ausdehnung biologischer Objekte machen, ist ein Wechsel der Mikroskopiertechnik, z.B. auf die 4Pi-Mikroskopie, wobei auch eine Entfaltung (Deconvolution) der Bilder nötig wird, möglich.

In dieser Arbeit werden quantitative Messungen an den subchromosomalen Domänen 8q24/*c-myc*, Centromer 8 und 9 nach Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden hinsichtlich der Lage sowie der Größe in unterschiedlichen Fixierungen durchgeführt. Für die Bestimmung der Lage der Signale im Kern wird der Parameter der relativen radialen Position in einer für speziell für Fibroblastenzellkernen neuen, angepassten Form aufgegriffen. Zur Kalkulation der Größe der markierten Regionen wurde ein ebenfalls neu entwickeltes Auswertungsprogramm mit hoher Präzision angewendet.

1.1 Organisation des Interphase-Chromatins

Die filamentöse Struktur des Chromatins im Zellkern wurde erstmals in den 1950er und 1960er Jahre beobachtet. Diese Vorstellung wurde dann in den 1970er Jahren durch die Entdeckung der Nukleosomen als sich wiederholende Untereinheiten des Chromatins mittels biochemischen und elektronenmikroskopischen Techniken weiterverfolgt. Seit den 1980er Jahren wird, auch durch die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie sowie von Ultrastrukturanalysen, eine höhere Organisation des Chromatins im Zellkern postuliert, was vor allem auf der Beobachtung, dass Chromosomen in bestimmten Territorien des Zellkerns liegen [56] [67], gründet. [22]

Zahlreiche revolutionäre Studien wurden in dieser Zeit durchgeführt, wovon einige Bilder in der Abbildung 1.1 gezeigt sind. Beispielsweise haben Gall et al. 1963 Blutzellen auf einer wäßrigen Oberfläche flach ausgebreitet und nach hypotoner Zerstörung der Zellen, die Chromatinfäden auf ein Carbonsgrid aufgebracht. Nach dem Trocknen konnte mittels Elektronenmikroskopie das Chromatin von Interphasezellen als zylindrische Fasern mit 40-60 nm Durchmesser detektiert werden (Abbildung 1.1 **A**). 1968 zeigten Wolfe und Martin, dass diese Fasern durch Fixierung stabilisiert werden können und wiesen einen Durchmesser von 10 nm in fixierten als auch in unfixierten Präparaten nach. [22] Olins und Olins beobachteten 1972 in Leberzellen von Ratten, dass es Regionen im Kern mit verdichtetem und mit ausgebreitetem Chromatin gibt. Die mittlere Breite dieses Chromatins reicht von 10 bis 19 nm. Auch Woodcock beschreibt 1973 Fasern mit 10 bis 30 nm Durchmesser und begründet die Variationen im Faserdurchmesser mit einem irregulären Aufwickeln und Falten von einzelnen Chromatinfasern. In der Abbildung 1.1 **B** ist eine von Olins und Olins spätere Studie (1974) an gereinigtem Chromatin gezeigt, bei der eine lineare Anordnung von sphärischen Chromatinpartikeln (Nukleosomen) mit ca. 7 nm Durchmesser beschrieben wird, die über einen 1,5 nm Strang verbunden sind. [22] Die Entdeckung der Chromosomenterritorien (Kapitel 1.1.1) war mit unter der Ausgangspunkt für die Entwicklung von Modellen zur Erklärung der Organisation von Chromatin im Zellkern basierend auf Fluoreszenzmikroskopie. Mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) konnten dann später unterschiedliche Niveaus der Chromatinpackung in den Territorien als auch Chromatin-

freie Bereiche im Nukleus aufgedeckt werden. Belmont und Bruce beobachteten 1994 in CHO¹ Zellen in früher G₁ und später G₁/früher S-Phase Chromatinfasern mit zum einen 100-130 nm und zum andern 60-80 nm Durchmesser (siehe Abbildung 1.1 **G** und **H**). Diese Chromatinfasern nannten die Autoren dann Chromonemafasern, woraus sich das Chromonema-Model entwickelte. Dieses von Belmont 1999 beschriebene Model besagt, dass sich eine Chromosomenfaser mit einem Durchmesser von ca. 100 nm zu einem im Durchmesser 200-300 nm Prophasechromatid faltet, welches dann durch Aufwickeln zum Metaphasechromosom wird. [22] Im Folgenden werden verschiedene Modelle zur Beschreibung der Chromatinorganisation im Interphasekern vorgestellt. Dabei wird beispielsweise auf die Organisation in Territorien, die filamentöse Struktur des Chromatins sowie die perichromatischen Strukturen in den interchromatischen (IC) Bereichen des Zellkerns eingegangen.

1.1.1 Chromosomenterritorien (CT)

Carl Rabl (1885) und Theodor Boveri (1909) hatten bereits vor etwa hundert Jahren die Vorstellung formuliert, dass jedes Chromosom ein umschriebenes Territorium in einem tierischen Zellkern einnimmt [67]. Der erste direkte Nachweis von CT im Zellkern gelang allerdings erst Jahrzehnte später. [18] Mittels Hybridisierung von gesamtgenomischer menschlicher DNA auf somatischen Hybrid-Zelllinien, welche ein oder mehrere menschliche Chromosomen enthielten, wurde eine distinkte Organisation der Chromosomen in Interphase nachgewiesen [56] [67]. Maßgebliche Experimente, welche grundlegend für das Erstellen des CT-Models waren, wurden von Cremer et al. (1988) und Lichter et al. (1988) publiziert (siehe Abbildung 1.1 **E** und **F**). In diesen Studien wurden die CT individueller Chromosomen in humanen Fibroblastenkernen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung unter Verwendung Chromosomen-spezifischer DNA-Sonden (*whole chromosome paints*) sichtbar gemacht [22]. Später wurde von Boyle et al. (2001) nach dem selben Verfahren die CT aller humanen Chromosomen dargestellt [8]. Cremer und Cremer beschrieben 2001 die distinkte Positionierung von Chromosomen unter anderem auch in Hühnerfibroblasten (siehe Abbildung 1.2), die mittels Mehrfarben-FISH markiert wurden [17].

¹chinese hamster ovary cells

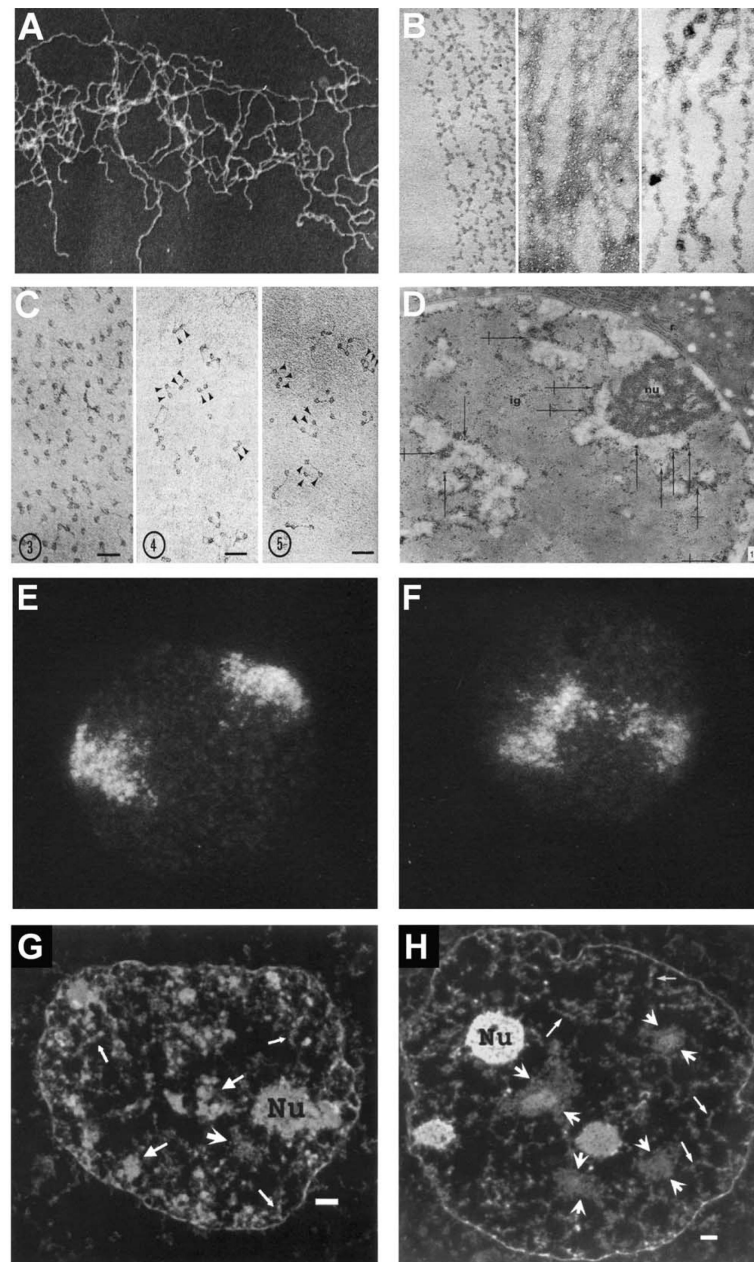


Abbildung 1.1: Bilder von Chromatin bedeutender Experimente zwischen 1963 und 1994

A DNA-Fasern auf einer Wasseroberfläche; **B** lineare, sphärische Chromatinpartikel mit 70 Å Durchmesser isoliert aus dem Thymus einer Ratte sowie Erythrozytenkerne des Huhns; **C** Chromatinfragmente nach DNaseII-Behandlung, Pfeile zeigen Monomere, Dimere und Trimere; **D** Rattenleberzellen, r...Ribosomen, nu...Nukleolus, ig...Interchromatingranula, →...Perichromatingranula, +...Perichromatinfibrillen; **E** und **F** Chromosom 1 in humanen Lymphozytenkernen; **G** und **H** CHO Zellen in G₁-Phase, dicke Pfeile zeigen kondensiertes Chromatin, dünne Pfeile markieren die Chromonemafaser. [22]

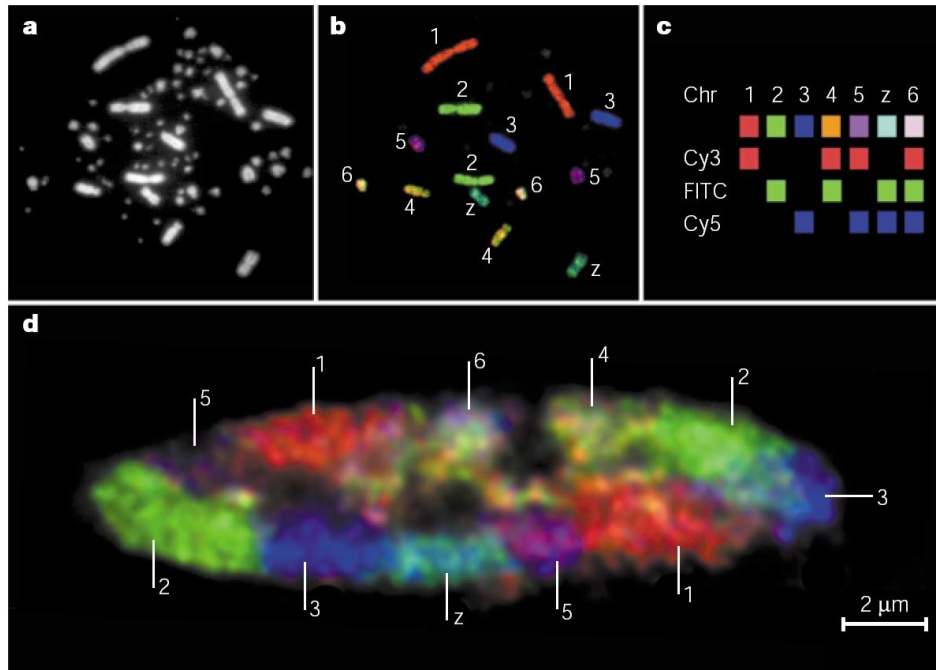


Abbildung 1.2: Chromosomenterritorien verschiedener Chromosomen im Fibroblasten vom Huhn

a Metaphasespread mit DAPI-DNA-Färbung, Makro- und Mikrochromosomen; **b** Metaphasespread von **a** nach Multicolour FISH (Pseudo-Farben); **c** Kodierungsmuster der verwendeten Farben; **d** mittlerer lichtoptischer Schnitt durch einen Hühner-Fibroblastenkern mit den markierten CT. [17]

Wie genau die CT nach dem Model aufgebaut sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur vermutet werden. Vorstellbar ist, dass die CT aus Chromatinrosetten gebildet werden. Die Rosetten wiederum könnten aus kleinen Chromatinschleifen von ca. 50-200 kbp Länge aufgebaut sein. Weiterhin denkbar ist, dass sich CT aus riesigen Schleifen aufbauen, die aus einer bis mehreren Mbp bestehen. Eine Mischung aus kurzen und langen Schleifen ist ebenfalls denkbar. Die Vorstellung der Rosettenstruktur bildet die Grundlage für das *spherical 1-Mbp-chromatin domain*-Model, bei dem jede 1 Mbp-Domäne mit Chromatin-Linker der benachbarten Domäne verbunden ist. [18]

1.1.2 Interchromatische Domänen (ICD) und perichromatische Regionen (PR)

Die Organisation in einzelne Chromosomenterritorien läßt vermuten, dass das Chromatin innerhalb der Territorien dicht gepackt ist und zwischen den CT Bereiche entstehen, die als Interchromatin-Domänen (ICD) bezeichnet werden. Die Transkription würde dann aufgrund der besseren Zugänglichkeit für beteiligte Faktoren hauptsächlich in der Peripherie der CT stattfinden. Visser et al. 1998 und Verschure et al. 2003 zeigten durch Untersuchungen an Enzymkomplexen sowie naszenten Transkripten mittels Thymidin-Analoga und FISH, dass die Transkription nicht nur auf die Peripherie begrenzt ist, sondern im ganzen Territorium stattfindet [22]. Dies wiederum kann erklärt werden durch die bei [18] vorgeschlagene Vergrößerung der CT-Oberfläche durch Einstülpungen nach Innen. Laut dem erweiterten ICD-Model verbinden somit dünne Kanäle innerhalb der CT die interchromatischen Domänen. Diese feinen Kanäle ermöglichen die Diffusion von Transkriptionsfaktoren oder Splicing-Faktoren zum Inneren der Territorien. Prozesse im Kern, wie beispielsweise die Transkription oder die RNA-Aufbereitung, werden dann vermutlich nicht zwingend nur am Rand der CT, sondern auch in diesen Kanälen stattfinden. [22]

Mittels Elektronenmikroskopie (EM) wurde auch gezeigt, dass Randbereiche von de-kondensiertem Chromatin weniger stark gefärbt erscheinen. Diese Bereiche werden als perichromatische Regionen (PR) bezeichnet. Sie besitzen einer Dicke von 100 bis 200 nm und trennen die hoch-organisierten Chromatindomänen von dem eigentlichen Inneren der Interchromatinbereiche. Dass PR kleine Chromatinschleifen beinhalten, die an der Transkription und am prä-mRNA-Splicing sowie an der Replikation beteiligt sind, wird in [27] beschrieben. [18] Außerdem sollen laut Monneron und Bernhard 1969 die PR aus Ribonukleoprotein-enthaltenden Strukturen bestehen, die als perichromatische Fibrillen (PF) bezeichnet werden. Heute weiß man, dass diese PF Akkumulationen von snRNPs, m³G cap von snRNAs, SC-35-Protein, Poly(A)-Polymerase und SMN²-Protein darstellen, alles Faktoren, die mit der Aufarbeitung der prä-mRNA assoziiert sind. [27] Letzteres ist beispielsweise ein zytoplasmatisches als auch nukleäres 38 kDa Protein,

²*survival of motor neuron*

dass im Kern nach Immunofluoreszenz-Markierung in der unmittelbaren Nachbarschaft zu den sogenannte *coiled* (Cajal) *bodies* (CBs) vorkommen [55]. CBs beinhalten nukleoplasmatische (snRNP und snRNA) als auch Nukleolus-bildende (Fibrillin, U3 snRNA) Bestandteile, sind involviert in der Aufbewahrung der *Splicing*faktoren und sind zudem auch neben den interchromatischen granulären Kluster (IGs, *speckles*) Hauptbestandteil der ICD. Die Interchromatingranulae akkumulieren auch prä-mRNA *Splicing*faktoren, wie beispielsweise snRNPs, den Slicingfaktor SC-35 und die m₃G *cap* der snRNAs. [27]

1.1.3 Zellkernorganisation und Transkription/Replikation

Grundlage des heutigen Modells zur Beschreibung der Organisation des Zellkerns von Säugetieren ist, dass diese nicht zufällig ist. Diese nicht zufällige Verteilung gilt für das Genom im Kern, für die Kernkompartimente sowie für die Kernproteine. Als Parameter für die Beschreibung der Organisation von Strukturen im zwei- und besser im dreidimensionalen Kern wird die *relative radiale Position* herangezogen. Die radiale Position beschreibt die Lokalisation von Strukturen relativ zum Kernmittelpunkt oder zur Kernperipherie. In diesem Modell wird auch angenommen, dass aktiv-transkribierte Gene und Gene, denen eine Transkription bevorsteht, in dekondensierten, *offenen* Bereichen des Chromatins lokalisiert sind und permanente stille Gene im kompakten, *geschlossenen* Chromatin zu finden sind. Dabei besteht auch die Annahme, dass nur ein kleiner Anteil des Chromatins für die Transkription bereit ist und wirklich dekondensiert als 10 und 30 nm Faser vorliegt. Dies führt im Zusammenhang mit den perichromatischen Regionen zu der Vorstellung, dass es eine dynamische Beziehung zwischen dekondensiertem Chromatin in der PR und der kompakteren Organisation des Chromatins unterhalb der PR gibt. Somit würden offene Chromatindomänen in der PR transkribiert werden, anschließend zur kompakteren Konformation übergehen und dabei die PR verlassen, wodurch eine neue offene Region in die PR nachkommen kann, um abgelesen zu werden. Das transkribierte Chromatin könnte als *loop* von 50 bis 100 kbp Länge in die PR hineinreichen. [18]

Die Organisation des Zellkerns wird außerdem durch die zwei verschiedenen Typen von Chromatin bestimmt, das Euchromatin und das Heterochromatin, welche ebenfalls,

wie die CT, distinkte Kompartimente im Zellkern beschreiben. Transkriptionell-aktives Euchromatin ist bevorzugt im Inneren des Zellkerns lokalisiert, wogegen heterochromatische Bereiche eher in der Peripherie des Zellkerns beobachtet werden. Eines der bekanntesten Beispiele für die Korrelation zwischen Lage des Chromosoms und der Aktivität der Gene des Chromosoms stellen die Untersuchungen an den Chromosomen 18 und 19 dar. Das Gen-reiche Chromosom 19 (67 Mbp) ist im Inneren des Zellkerns positioniert, das ähnlichgroße Gen-arme Chromosom 18 (85 Mbp) befindet sich in der Kernperipherie [19]. [8] Diese beiden Chromosomen zeigen aber nicht nur eine gegensätzliche Positionierung, sondern auch Unterschiede in der Funktion und Struktur [19]: Das Chromosom 19 beinhaltet eine hohe Dichte an CpG-Inseln und Alu-Sequenzen, der meiste Anteil der DNA wird in der frühen S-Phase repliziert und es besitzt einen Überschuss an hyperazetylierten Histon H4. Dagegen besitzt das Chromosom 18 weit weniger Gene als bei der Größe erwartet werden könnte, es hat eine geringere CpG-Inseldichte, eine höhere Konzentration an L1-*family*-Wiederholungen und einen hohen Anteil an spät-replizierender DNA.

Ein Beispiel für die Beziehung zwischen Aktivität eines Gens und dessen Position im Zellkern wird bei Williams et al. 2006 beschrieben. Hier wurde die nukleare Position des *Mash1* Gens untersucht, welches in embryonalen Stammzellen bei Unterdrückung der Transkription in der Peripherie lokalisiert ist, aber bei Induktion (Aktivität) der Transkription (*up*-Regulation) seine Position zum Inneren des Zellkerns hin wechselt [86]. Ein früheres Model zur Positionierung von Genen bezüglich ihres CT nahm an, dass aktive Gene auf der Oberfläche der CT lokalisiert sind. Diese Annahme basierte auf Studien mit geringer optischer Auflösung und der Vorstellung, dass CT eher undurchlässige Strukturen sind und die Zugänglichkeit für z.B. Transkriptionsfaktoren nur auf der Oberfläche gegeben ist. Heute ist bekannt, dass die meisten Kernproteine *in vivo* sehr mobil sind. Parada und Misteli (2002) fassen die Ergebnisse hochauflösender Licht- und Elektronenmikroskopie in dem Vorschlag zusammen, dass die CT eine große innere Oberfläche besitzen, die durch ein Netzwerk von gut zugänglichen Kanälen gebildet wird (siehe 1.1.2). Somit können bzw. sind aktiv-transkribierte Bereiche im Inneren von CT zu finden. [62]

1.1.4 Kernmatrix

Aufgrund der komplexen Organisation des Zellkerns entstand das Model, dass es im Zellkern ein strukturiertes Netzwerk in Form eines Karyoskeletts oder einer Kernmatrix geben muß. Beweise für dieses Kernskelett/-gerüst sind aber bisher nur schwer zu erfassen. Beispielsweise wurde in humanen Thymozyten das SATB1-Protein identifiziert, dass anscheinend ein Korb-ähnliches Netzwerk aus proteinösen Filamenten bildet, an denen Gene anhaften können. So eine Assoziation verschiedener Thymozyten-spezifischer Gene scheint mit der Aktivität dieser Gene zu korrelieren. Misteli (2005) vermutet in der Assoziation von Genen und dem Gerüst eine regulatorische Funktion der Matrix. [60] Weitere Proteine, die im Verdacht stehen am Aufbau der Kernmatrix beteiligt zu sein, sind die Intermediärfilamente der Laminproteine unterhalb der Kernhülle. Goldman et al. (2000) beobachteten, dass sich die Lamine A, B und C auch im Inneren des Kerns befinden und unter Umständen Bedeutung bei der Transkription und Replikation haben [32] [34]. Ebenfalls im Inneren des Kerns befindet sich monomeres Aktin mit funktioneller Relevanz bezüglich der Bildung von Transkriptionskomplexen [60].

1.2 Kondensation von Chromatin und dessen Organisation

Während der Mitose kondensiert das Chromatin und wird auch im Lichtmikroskop sichtbar. In der Abbildung 1.3 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt, die den unterschiedlichen Kondensationsgrad von Interphasechromatin und Chromatin in Metaphasechromosomen veranschaulicht.

Die Kondensation an sich ist nicht sehr gut untersucht, da die Beobachtung der Chromosomen während der Faltung *in vivo* schwer zu realisieren ist. Aus diesem Grund werden die meisten Studien zur Chromosomenstruktur an Metaphasechromosomen in Form eines fixierten Präparats *in vitro* durchgeführt. Die extreme Packung der DNA und damit die Verdichtung von Chromatin zum Aufbau mitotischer Chromosomen ist in der Abbildung 1.4 verdeutlicht. Durch die Aufwindung der ca. 2 m langen DNA-Doppelhelix wird eine Komprimierung bis zu $>10^4$ in einem Durchschnittszellkern von 5 μm Durchmesser erreicht.

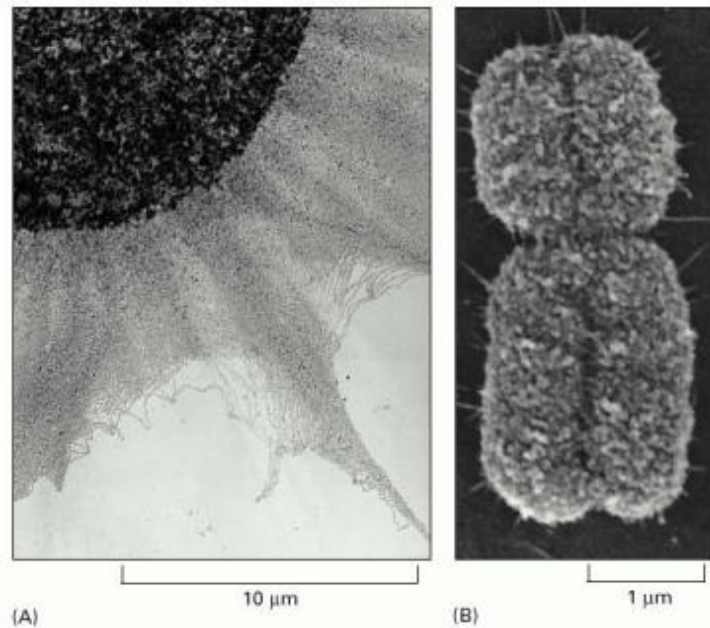


Abbildung 1.3: Vergleich des ausgedehnten Chromatins in Interphase mit Chromatin in Mitosechromosomen

A Elektronenmikroskopische Aufnahme eines lysierten Zellkerns, Chromatin tritt aus dem Kern aus; **B** kondensiertes dupliziertes Chromosom, bei dem beide Arme noch verbunden sind. [6]

Gesichert scheint, dass an der Kondensation des Chromatins das phosphorylierte Histone H3 beteiligt ist. Mittels Antikörpermarkierung konnte nachgewiesen werden, dass es eine starke räumliche und zeitliche Korrelation zwischen phosphoryliertem H3 und der Kondensation von Chromatin gibt. Als mögliche Funktion wird angenommen, dass phosphoryliertes H3 direkt Faktoren zur Kondensation rekrutieren kann. Eine Beteiligung des Linkerhistons H1 ist umstritten, da es beispielsweise auch zur Kondensation kommt ohne eine Hypermethylierung von H1.

Größere Bedeutung bei der Kondensation von Chromatin wird allerdings dem Kondensin-Komplex zugeschrieben. Im *Xenopus*-Eiextrakt ist der Kondensin-Komplex alle 5-10 kbp der DNA zu finden, ebenso in *Schizosaccharomyces pombe*. Dieser Komplex besteht aus

mehreren Untereinheiten. Ein wichtiges identifiziertes Polypeptid von Untereinheiten des Kondensin-Komplexes gehört zu einem der vier SMC-Proteine (*structural maintenance of chromosomes*), dem SMC2. SMC-Proteine sind chromosomale ATPasen mit einer hohen Konservierung in Bakterien bis hin zum Menschen. SMC-Proteine sind charakterisiert durch ein amino-terminales Nukleotid-Bindungsmotif (Walker A Motif), zwei zentrale *coiled-coil* Motife und einer carboxy-terminalen konservierten Sequenz mit dem Walker B Motif. Die beiden *coiled-coil* Motife sind über eine nichthelikale *hinge*-Sequenz verbunden, die sehr flexibel ist und ein zwei-armiges, V-förmiges Molekül bildet. Jeder der beiden Arme kann mit ATP und der DNA interagieren und somit unter Umständen als DNA-Linker fungieren, dessen Konformation durch ATP moduliert wird.

Zwei weitere Komponenten sind das XCAP³-C und das XCAP-E, die ebenfalls zu der SMC-Familie gehören (SMC4 und SMC2). Sie bilden den Kern eines aus fünf Untereinheiten bestehenden Proteinkomplexes mit einem Sedimentationskoeffizienten von 13S. Dieser 13S-Komplex beinhaltet drei nicht-SMC-Untereinheiten (XCAPP-D2, XCAPP-G, XCAPP-H) und ist essentiell für die Kondensation, indem er zusammen mit der Topoisomerase I und ATP positive Supercoils in geschlossener, ringförmige DNA induziert. Trotzdem bleibt die Frage, wie das 13S-Kondensin mit nukleosomaler DNA interagiert und ob es zusammen mit anderen Proteinen (z.B. Titin), die in mitotischen Chromosomen gefunden wurden, eine Rolle in der Chromosomenarchitektur spielt.

Weiterhin werden die Schwesterchromatiden des kondensierten Chromatins bis zur Teilung in der Metaphase-Anaphase-Transition an der Centromerregion als auch entlang der Chromosomenarme zusammengehalten. Eine wichtige Rolle bei dieser Kohäsion der Chromatiden spielt der *Cohesin*-Komplex. Dieser Komplex besteht aus zahlreichen Untereinheiten. Bei *Saccharomyces cerevisiae* existieren die vier Untereinheiten Smc1p, Smc3p, Scc1p (auch Mcd1p genannt) und Scc3p. Die beiden ersten gehören ebenfalls zu der SMC-Familie. [40]

³ *Xenopus* chromosome-associated polypeptides

1.2 Kondensation von Chromatin und dessen Organisation

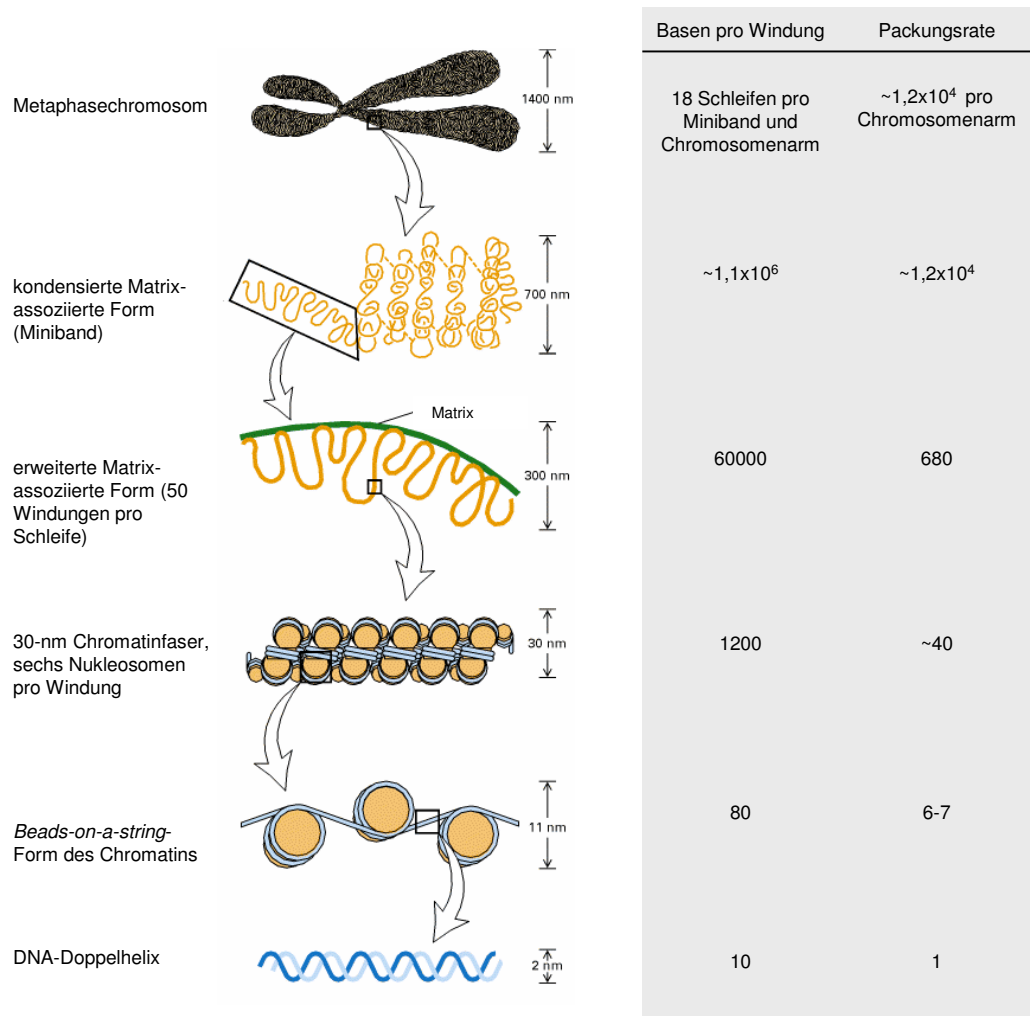


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Kompaktierung von Chromatin
Die Strukturen und das Ausmaß der Kompaktierung der DNA zwischen 11 und 700 nm sind weitestgehend hypothetisch. (modifiziert nach [52])

1.3 Molekulare Pathologie des Prostatakrebs

Prostatakrebs ist, nach Lungenkrebs, einer der zweithäufigsten Krebsarten beim Mann in den Industrieländern. Obwohl zahlreiche Gruppen mittels DNA Arrays und anderen Methoden Profile des Prostatakarzinoms erstellt haben, sind die genetischen Veränderungen und biologischen Prozesse in der Entwicklung und dem Vorranschreiten der Erkrankung noch unklar. Beispielsweise ist über das Expressionsprofil kleinerer Läsionen, wie bei der *prostatic intraepithelial neoplasia* (PIN) und *proliferative inflammatory atrophy* (PIA), wenig bekannt. [78] [1] Die Probleme bei der Aufklärung der Morphogenese des Prostatakarzinoms sind eng an den komplexen anatomischen und histologischen Aufbau der Prostata geknüpft. In der Prostata werden 30 bis 50 tubuloalveoläre Einzeldrüsen von einer aus vielen glatten Muskelzellen bestehende Bindegewebskapsel umhüllt. Ausgehend von der Kapsel wird das Innere der Prostata durch Septen unterteilt. Das Innere der Prostata wird eingeteilt in klinisch relevante Zonen. Innen liegt die zentrale Zone und umschließt die Urethra. Sie macht ca. 25 % des Volumens aus. Zwischen dieser und der großen peripheren Zone, welche ca. 70 % ausmacht, befindet sich die Übergangszone, von der die benigne Prostatahyperplasie meistens ihren Ursprung hat. Im Drüsenepithel der peripheren Zone entstehen bevorzugt maligne Adenokarzinome. [43] Eine Übersicht über einige beschriebene genetische Veränderungen wird in der Tabelle 1.1 gegeben. Neben den genetischen Veränderungen, ist das Wachstum des Prostatakarzinoms in der Regel androgen-abhängig. Vor allem der stark wirksame, physiologische Testosteron-Metabolit Dihydrotestosteron (DHT), der in der Prostata vom Enzym 5-alpha Reduktase gebildet wird, spielt eine wichtige Rolle. [43]

Bei den genetischen Veränderungen als Ursache für die Entstehung eines Prostatakarzinoms haben Veränderungen der DNA-Methylierung und der Androgen-Signal-Kaskade, sowohl Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen als auch Abberationen der Telomeraseaktivität eine große Bedeutung. Eine wichtige Rolle spielen dabei die schon aufgezählten Proto-Onkogene, die in ihrer pathologischen Form als Onkogen bezeichnet werden. Von den über 100 identifizierten Onkogenen wurden die Onkogene *ras*, *erbB2/Her2neu* und *c-myc* am populärsten. [66] Letzteres ist neben dem Prostatakarzinom in den meisten soliden Tumoren, wie Brust- und Cervixkarzinom und klein-

zelligen Lungenkarzinom, oft amplifiziert. [28] Eine signifikant höhere Myc-Expression in Adenokarzinomen der Prostata wurde schon 1986 von Fleming und 1987 von Buttyan et al. beschrieben [51]. Allerdings ist noch immer unklar, worin die genaue Bedeutung des überexprimierten c-Myc's als Folge einer Amplifikation der 8q24-Domäne bei der Entstehung des humanen Prostatakarzinoms besteht [85].

Locus	chromosomale Veränderung	identifizierte Gene	Veränderungen
1q24-25	hereditär	<i>HPC1 (RNase L)</i>	Mutation
1p		Stathmin (Hypermethylierung)	Suppression der Expression
1p33		<i>TNFRSF6</i>	Suppression der Expression
2q14		<i>BIN1</i>	Deletion
2p24		<i>GC109</i>	Expression unterdrückt im Androgen unempfindlichen PCa
3p24-26	LOH	<i>RARB</i> (Hypermethylierung)	
4		<i>EG-1</i>	Überexpression
5q31-33	Verknüpfung mit aggressiven PCa	unbekannt	
7q31.1-31.2	Deletion	Caveolin 1 und 2 (Hypermethylierung)	Suppression der Expression
8p21-8p23	Deletion	<i>N33</i>	Suppression der Expression
		<i>FEZ1/LZTS1</i>	Mutation
		Dermatin	Deletion
		<i>NKx3.1</i>	Suppression der Expression
8q	Amplifikation	<i>PSCA, myc, eIF3</i>	Überexpression
9q22		<i>DD3</i>	Überexpression
10q23-25		<i>PTEN</i>	Deletion [31]
10q21		Annexin VII	Überexpression
11q13		<i>GSTp1</i> (Hypermethylierung)	Suppression der Expression
11p11-12	<i>PB39, PSMA</i>	Überexpression	
12q12-13	Deletion	<i>p27</i>	Suppression der Expression
13q12.3		<i>BRCA2</i>	Mutation im familiären PCa
14q22-24		<i>ER</i> (Hypermethylierung)	Suppression der Expression
16q22.1	Deletion	E-Cadherin (Hypermeth. o. Deletion)	Suppression der Expression
17p11.2	hereditär	<i>HPC2/ELAC2</i>	Mutation
Xq11.2-12		<i>AR</i> (Hypermethylierung)	Suppression der Expression

Tabelle 1.1: Auswahl genetischer Veränderungen im Prostatakrebs
[www.expertreview.org]

Das Proto-Onkogen *c-myc*⁴ ist auf dem langen Arm von Chromosom 8 (8q24.1) mit einer Länge von ca. 5 kbp lokalisiert und besteht aus drei Exons. Ausgehend vom Exon 2 wird das 64 kDa- und ausgehend vom Exon 1 das längere 67 kDa-Polypeptid translatiert. Die c-Myc-Proteine sind nukleäre hoch-konservierte Phosphoproteine. [68] [20] Ruhende, differenzierte Zellen exprimieren c-Myc normalerweise auf einem niedrigen Niveau, welches fast nicht detektierbar ist. Das c-myc-mRNA- und Proteinniveau pro ruhenden Fibroblast liegt schätzungsweise in der Größenordnung von einem RNA-Transkript und 500 Proteine [14]. Nach Stimulierung von Zellen, z.B. durch Wachstumsfaktoren, kann das Niveau der Expression innerhalb von Minuten stark erhöht werden. In proliferierenden Zellen wird *c-myc* ebenfalls auf einem niedrigem Niveau exprimiert. [68] Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ für die mRNA als auch für das Protein liegen zwischen 20 und 30 min [14]. Bedeutung hat das c-Myc, direkt und/oder indirekt, bei der Regulation des Zellzykluses, der Differenzierung, dem Zellwachstum, der Angiogenese und der Apoptose. Die Rolle beim Zellzyklus ist hauptsächlich auf die Promotion der G₁-S-Transition durch Aktivierung des Zyklin/Zyklin-abhängigen Kinasekomplexes (CDK), die Stimulation der E2F-abhängigen Transkription sowie die Stimulation von Wachstumsfaktoren zurückzuführen. [28] [66]

Der Übergang von G₁- in die S-Phase bei der Zellzyklusprogression ist ein kritischer Punkt in der Tumorentstehung, da viele Tumorzellen Mutationen besitzen, die den G₁/S-Restriktionspunkt betreffen, und wodurch eine DNA-Synthese auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren möglich ist. C-Myc kann den Restriktionspunkt auch ohne Wachstumsfaktoren überwinden und dadurch die S-Phase des Zellzyklus einleiten.

Das c-Myc (Abbildung 1.5) ist durch eine N-terminale Domäne (NTD) charakterisiert, die die beiden hochkonservierten Myc-Boxen MB1 und MB2 beinhaltet, welche nur in der *myc*-Genfamilie vorkommen und essentiell für die Funktion als Transkriptionsfaktor sind. In der C-terminalen Domäne (CTD) ist das ebenfalls hochkonservierte basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper-Motiv (bHLHLZ) lokalisiert. Die basische Region macht eine sequenzspezifische Bindung an die DNA möglich. Das HLHLZ-Motiv ist

⁴*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*

dagegen bei der Protein-Protein-Interaktion von Bedeutung. Außerdem trägt das c-Myc ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), welches die Lokalisation des Proteins im Zellkern dirigiert. [85] [68]

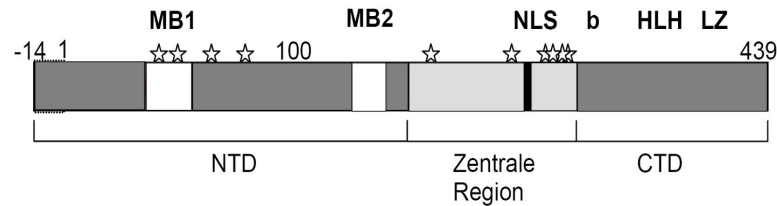


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des c-Myc-Proteins

Die mit Stern markierte Orte geben die bekannten Phosphorylierungsstellen von c-Myc an. [68]

Für die transkriptionelle Regulation muß c-Myc mit dem Max-Protein dimerisieren und gemeinsam an die DNA binden. Die basische Region des c-Myc/Max-Heterodimers vermittelt dabei die spezifische DNA-Bindung an die E-Box-Sequenz⁵ 5'-CAC GTG-3' und ähnliche Sequenzen. [85]

Die Abbildung 1.6 beschreibt eine Möglichkeit zur Aktivierung der Genexpression durch Myc/Max. Nach Dimerisierung der beiden Proteine c-Myc und Max binden sie beispielsweise an die E-Box-Sequenz des Zielgens. C-Myc rekrutiert dann den SWI/SNF-Komplex (*switch-independent, sucrose non-fermenting*). Dieser Komplex besitzt ATPase-Aktivität, durch dessen Wirken es zur Chromatinauflockerung (*Chromatin-Remodelling*) am Promotor kommt [13] [69]. Diese Auflockerung des Chromatins ermöglicht einen besseren Zugang für weitere transkriptionelle Regulatoren und die RNA-Polymerase II zur DNA.

⁵E-Box-Sequenzen befinden sich hauptsächlich im Promotor, im ersten Exon oder ersten Intron eines Gens und aktiviert nach Bindung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen.

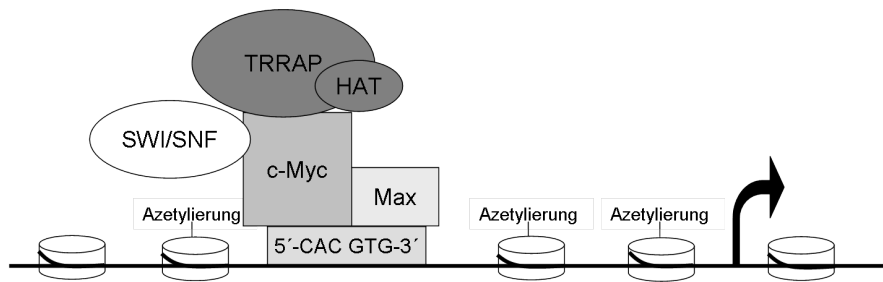


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Aktivierung der Genexpression durch Myc/Max-Bindung an die E-Box-Sequenz [68]

Weiterhin interagiert c-Myc mit dem TRRAP-Komplex (*transformation/transcription domain associated protein*), der Histon-Azetyl-Transferase (HAT)-Aktivität besitzt. Diese Aktivität ist für die Modellierung des Azetylierungsstatus der Histone von Bedeutung. Eine verstärkte Azetylierung macht die Bindung des Präinitiationskomplexes an den aktiven Promotor und damit den Start der Transkription möglich. [68]

1.4 Fluoreszenzspektroskopie

1.4.1 Elektromagnetische Wellen

Ein Licht emittierendes Atom oder Molekül strahlt, wie ein Dipol, eine elektrische und eine magnetische Welle ab (elektromagnetische Welle). Die elektrischen und magnetischen Feldkomponenten der Welle stehen zu jedem Raum-Zeit-Punkt senkrecht aufeinander und senkrecht auf der Ausbreitungsrichtung des von ihnen gebildeten elektromagnetischen Feldes. Die Ebene des magnetischen Feldes ist die Polarisationssebene, und die des elektrischen Feldes ist die Schwingungsebene der Welle. Charakteristika einer elektromagnetischen Welle sind die Frequenz f , die Wellenlänge λ und die Ausbreitungsgeschwindigkeit c , die durch $c = \lambda f$ in Beziehung zu einander stehen. Dabei berechnet sich die Frequenz aus $\omega/2\pi$, wobei ω die Kreisfrequenz der Schwingung ist, und die Wellenlänge aus $2\pi/k$, wobei k die Wellenzahl ist.

Elektromagnetische Wellen des sichtbaren Bereichs des Lichtes breiten sich im Vakuum mit Lichtgeschwindigkeit $c_0 = 2,99792 \times 10^8$ m/s aus. In allen anderen Medien ist die Lichtgeschwindigkeit c_{Medium} gegenüber c_0 um den Brechungsindex n verringert. Im Vakuum berechnet sich n aus c_0/c_{Medium} . In Abhängigkeit des Materials des Mediums und der Wellenlänge kommt es beim Übergang zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindizes zu einer Änderung der Ausbreitungsrichtung der Welle (Brechung). Dies leitet sich von der Auffassung des Huygens-Fresnel-Prinzip ab, welches darauf beruht, dass eine Wellenfront als eine Überlagerung von einzelnen Kugelwellen angesehen wird. Dabei haben die Kugelwellen ihren Ausgangspunkt im Wellenfeld selbst und überlagern sich wieder zu einer Wellenfront. Breiten sich die Wellen unterschiedlich schnell aus, kommt es zur Dispersion. Zur Reflexion kommt es, wenn an einer spiegelnden Fläche der Einfallswinkel gleich dem Ausfallswinkel der Welle ist. Eine Streuung eines Teils der Wellenfront erfolgt, wenn die Wellenfront auf ein Hindernis trifft. Das Hindernis fungiert als Erregungsort von *vonHuygens*-Kugelwellen. Wenn kohärente Wellen in einem Punkt im Raum zusammentreffen, kommt es durch Addition der elektromagnetischen Feldkomponenten der Wellen zur Interferenz. Fällt Licht an einem Objekt vorbei und breitet sich dahinter in den Schatten des Objektes hinein aus, spricht man von Beugung. An der Kante des Objektes entstehen dabei Kugelwellen, die sich in den Schatten hinein ausbreiten. [29] [70]

1.4.2 Grundlagen der Fluoreszenz

Unter *Fluoreszenz* versteht man die spontane Emission von Licht bei der Rückkehr eines Moleküls aus einem elektronisch angeregten Singulettzustand S_1 bzw. Triplettzustand T_1 (durch Lichtabsorption) in den elektronischen Grundzustand S_0 (Abbildung 1.7). Die Energiedifferenz ($S_1 - S_0$) wird in Form eines Lichtquants abgestrahlt. Die Lebensdauer τ des angeregten Zustandes ist vom Molekül abhängig und beträgt beispielsweise für Chlorophyll 6,7 ns. [70]

Dieser sogenannte Elektronenübergang erfolgt dabei nach dem *Franck-Cordon-Prinzip*. Laut diesem Prinzip ist der Übergang aus dem Grundzustand in den angeregten Zu-

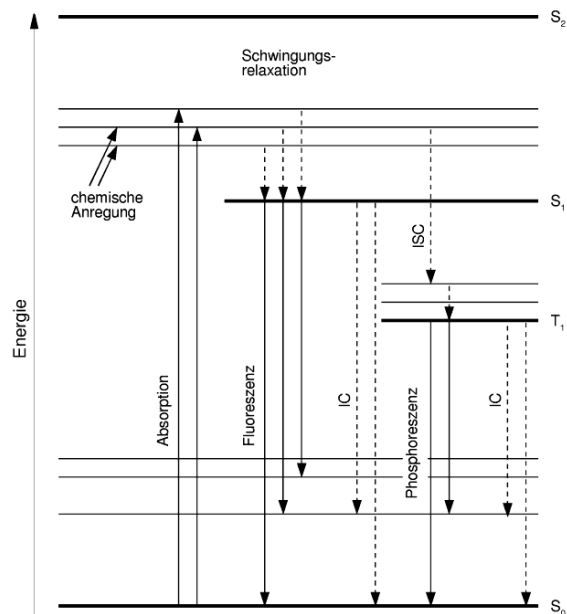


Abbildung 1.7: Vereinfachtes Energietermdiagramm (Jablonski-Diagramm)

S ... Singulett-Zustand; T ... Triplett-Zustand; Indizes: 0 ... Grundzustand, 1,2 ... erster, zweiter elektronisch angeregter Zustand; IC ... *internal conversion*; ISC ... *intersystem crossing*; durchgehender Pfeil ... Strahlungsabsorption/-emission; gestrichelter Pfeil ... strahlungslose Übergänge.

stand für den Zustand am Wahrscheinlichsten, dessen Maximum der Wellenlänge vertikal darüber liegt (ohne Änderung der Kernpositionen). Da die Atomkerne sehr viel schwerer sind als die Elektronen ($m_p=1,672 \times 10^{-27}$ kg, $m_e=9,109 \times 10^{-31}$ kg, $m_p/m_e=1835$), sind elektronische Übergänge wie Anregung durch Lichtabsorption (in 10^{-15} s), *internal conversion* (in 10^{-12} s) und Emission ($\tau \approx 10^{-8}$ s) sehr viel schneller, als die Kerne sich an die neue elektronische Umgebung anpassen können. Nach der Lichtabsorption kann es zur oben beschriebenen Abstrahlung von Licht oder zu einer schnellen strahlungslosen Relaxation des Elektrons aus dem angeregten Zustand in dessen Schwingungsgrundzustand kommen (*internal conversion*), aus dem dann die Emission von Licht stattfindet. Bei der strahlungslosen Relaxation wird die freiwerdende Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Neben der *internal conversion* kann es auch zum *intersystem crossing* kommen, wobei ein Übergang vom Singulett- zum Triplettzustand gleicher elek-

tronischer Energie stattfindet, woraus dann die Phosphoreszenz resultiert ($\tau \gg 10^{-8}$ s). Ein entscheidendes Merkmal der Emission von Fluoreszenzlicht ist, dass die Wellenlänge λ des emittierten Lichts größer ist als die des absorbierten Lichts. Diese Differenz der Wellenlänge als Folge der Energieübertragung durch strahlungslose Energieübergänge wird nach seinem Entdecker *Stokes-Shift* genannt und in nm ausgedrückt:

$$\lambda_{Stokes-Shift} = |\lambda_{Absorption} - \lambda_{Emission}| \quad (1.1)$$

Ein Maß für die Energieabnahme des emittierten Lichtes durch strahlungslose Übergänge ist die *Quantenausbeute*. Die Quantenausbeute Q der Fluoreszenz ist das Verhältnis der Anzahl emittierter zur Anzahl der absorbierten Photonen. Dabei gilt:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k} \quad (1.2)$$

wobei Γ die Photonenemissionsrate des Fluorophors und k die Rate der strahlungslosen Übergänge von S_1 nach S_0 ist. Mit Γ und k ergibt sich die Fluorophorlebensdauer τ , die Zeit, in welcher sich ein Molekül im angeregten Zustand befindet, wie folgt:

$$\tau = \frac{1}{(\Gamma + k)} \quad (1.3)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ kann, beispielsweise durch die Kollision mit Quenchern, durch Rotationsdiffusion, durch Bildung von Komplexen mit Lösungsmittelmolekülen oder anderen gelösten Stoffen negativ beeinflusst werden. Das Quenchen der Fluoreszenz durch Sauerstoff ist dabei für die angewandte Mikroskopie mit am Bedeutensten. Wenn ein Fluorophor im angeregten Zustand mit einem Sauerstoffmolekül zusammenstößt, relaxiert das Fluorophor ohne Lichtemission in den Grundzustand. Im Durchschnitt legt ein Sauerstoffmolekül innerhalb von 10^{-8} s eine Weglänge von $\Delta x = 2D\tau$ zurück. Setzt man den Diffusionskoeffizienten D den Wert für Sauerstoff ein ($D = 2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), erhält man $\Delta x = 70 \text{ \AA}$. Dies ist mit der Dicke einer Membran oder eines Proteins vergleichbar.

1.4.3 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Mit dem konfokalen Laserrastermikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) ist es möglich, nicht-invasiv dreidimensionale Bilder biologischer Strukturen zu erzeugen. Die konfokale Mikroskopie mit inkohärenten Licht wurde von Minsky entwickelt und 1961 patentiert [59]. Erst die Einführung von Laserlicht als Quelle der Anregung von Fluoreszenz machte die breite Anwendung der konfokalen Mikroskopie in der Biologie möglich [15]. In der praktischen Anwendung in der Biologie erreicht man mit dem CLSM eine Auflösung von lateral ca. 250 nm und axial ca. 600 nm. Die Besonderheit des konfokalen LSM gegenüber beispielsweise eines Weitfeldmikroskops ist die fokussierte Beleuchtung und die Unterdrückung von Streulicht und Licht außerhalb des Fokus. [73] Abbildung 1.8 zeigt den Aufbau eines konfokalen Mikroskops [84].

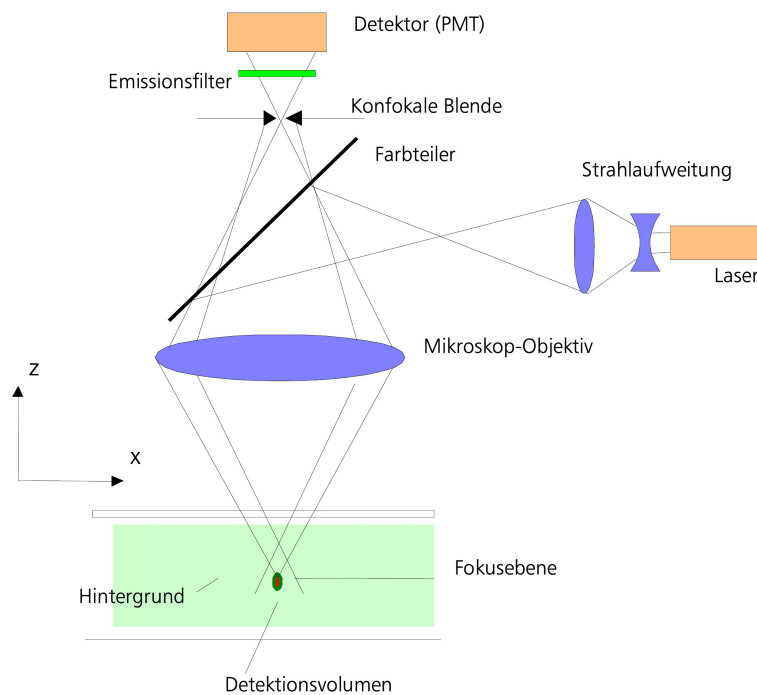


Abbildung 1.8: Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Die fokussierte Beleuchtung und Beobachtung der Probe kann, selbst bei korrigierten Systemen, punktförmige Objekte nicht als Punkt abbilden, sondern nur als verwaschenes Objekt. Die Verwaschung des Objektes bzw. Punktbildes ist quantitativ über die *Point Spread Function* (PSF) zu beschreiben. Die PSF spiegelt die Intensitätsverteilung im Bildraum wider. Für die konfokale Mikroskopie muß die PSF des Beleuchtungs- und Beobachtungsstrahlengangs berücksichtigt werden. Die Gesamt-PSF, welche hinter der Blende vorliegt, ergibt sich aus:

$$PSF_{gesamt}(\mathbf{r}) = PSF_{Beleuchtung}(\mathbf{r}) \cdot PSF_{Beobachtung}(\mathbf{r}) \quad (1.4)$$

wobei \mathbf{r} die x-, y- und z-Position darstellt [58]. Die Abbildung 1.8 veranschaulicht den Strahlengang des konfokalen Mikroskops. Das Laserlicht mit der Anregungswellenlänge $\lambda_{Absorption}$ wird vom Farbteiler (dichroitischer Spiegel) reflektiert und anschließend auf die Ebene der biologischen Probe fokussiert. Die Fokussierung erfolgt durch ein Objektiv hoher numerischer Apertur NA , welche definiert ist als:

$$NA = n \cdot \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right) \quad (1.5)$$

wo n der Brechungsindex des Immersionsmediums ist und α der Öffnungswinkel des Objektivs. Eine hohe numerische Apertur ergibt einen großen Winkel und damit sowohl eine hohe Lichtstärke als auch ein hohes Auflösungsvermögen mit gutem Kontrast in z-Richtung. Nach Erzeugung der Fluoreszenz wird das von der Probe emittierte Licht ($\lambda_{Emission}$) durch das selbe Objektiv zurück geleitet und vom Farbteiler zum Detektor durchgelassen. Vor dem Detektor befindet sich ein Emissionsfilter, der den Wellenlängenbereich selektiert, der von Interesse ist. Vor dem Filter befindet sich die Blende, wodurch Licht aus dem nicht-fokussierten Bereich der Probe nicht auf den Detektor trifft und dadurch nicht zur Bildentstehung beiträgt. Die Blende hat einen variablen Durchmesser,

der im Idealfall unendlich klein sein kann. Bei kompletter Öffnung kann allerdings nicht mehr von konfokaler Abbildung geredet werden. Die Anordnung der konfokalen Blende in einer zur Zwischenbildebene und somit auch zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene hat den Vorteil, dass nur Licht detektiert wird, welches diese Blende passiert. Da beim CLSM der Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet werden (konjugierte Ebene) spricht man vom konfokalen Strahlengang. Das Scannen der Probe erfolgt zunächst in der lateralen Ebene (xy). Nach Abschluss der lateralen Rasterung wird die nächste Ebene abgerastert. Aus den gescannten Bildstapeln ist dann eine dreidimensionale Darstellung der biologischen Probe möglich.

1.4.4 Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscopy

Da die Auflösungsgrenze eine Funktion der Wellenlänge ist, verwendet man für höhere Auflösungen kleinere Wellenlängen mit höherer Energie. Da ein Teil dieser Energie bei der Interaktion mit dem Objekt an dieses abgegeben wird, steigt bei höherer Energie vermutlich auch der Einfluss auf die Struktur des Objektes (naher UV-Bereich). Eine Möglichkeit bei Strahlung niedriger Energie auf eine Auflösung unter 200 nm zu kommen, bietet die Wellenfeldmikroskopie.

Das *Spatially Modulated Illumination* Mikroskop ist ein Spezialfall der Wellenfeldmikroskopie und basiert auf dem Prinzip der räumlich strukturierten Beleuchtung [5], wobei sich die strukturierte Beleuchtung nur auf die axiale (optische) Achse konzentriert. Die Vernachlässigung der lateralen Strukturierung ermöglicht eine höhere Meßgenauigkeit in axialer Richtung. Diese Art der Beleuchtung wird dadurch erreicht, dass zwei kollimierte, kohärente Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation in zwei, sich gegenüberliegende Objektive, eingekoppelt und zur Interferenz gebracht werden (siehe Abbildung 1.9). Dadurch bildet sich eine stehende Lichtwelle aus, die einzelne Objektbereiche selektiv zur Fluoreszenz anregt. Charakteristisch für diese Technik ist, dass die äquidistanten Intensitätsmaxima der stehenden Welle normalerweise senkrecht zur optischen Achse des Objektivs ausgerichtet sind, das zur Detektion des Fluoreszenzsignals verwendet wird. Vor der Detektionskamera befindet sich ein Block-Filter, der das Anregungslicht der Laser blockiert und das Emissionslicht der Fluorophore idealerweise

vollständig transmittiert. [58] [81] Die Intensität der stehenden Welle in der z-Richtung (optische Achse) kann durch:

$$I(z) = I_0 \cos^2\left(k_z z + \frac{\Delta\phi}{2}\right) \quad \text{mit} \quad k_z = \frac{2\pi n \cdot \cos(\theta)}{\lambda_{\text{Beleuchtung}}} \quad (1.6)$$

beschrieben werden, wobei n der Brechungsindex, θ der Winkel und $\Delta\phi$ die Phasendifferenz zwischen den interferierenden Strahlen. $\lambda_{\text{Beleuchtung}}$ ist in diesem Fall die Wellenlänge des Laserlichts im Vakuum. Die laterale Beleuchtung ist, wie beim Epifluoreszenzmikroskop, in den jeweiligen Ebenen konstant. Unter Berücksichtigung der Intensität der stehenden Lichtwelle $I(z)$ in Abhängigkeit und das Einbeziehen der Normierungskonstante PSF_0 für die PSF der Beleuchtung ergibt sich somit die Gesamt-PSF des SMI-Mikroskops wie folgt: [58]

$$PSF_{SMI}(\mathbf{r}) = PSF_{SMI, \text{Beleuchtung}}(\mathbf{r}) \cdot PSF_{\text{Detektion}}(\mathbf{r}) \quad (1.7)$$

$$= PSF_0 \cos^2\left(k_z z + \frac{\Delta\phi}{2}\right) \cdot PSF_{\text{Detektion}}(\mathbf{r}) \quad (1.8)$$

Mit dieser Mikroskopietechnik ist es möglich, die axiale Ausdehnung von sphärischen Objekten bis zu 40 nm mit einer Genauigkeit von bis zu 10 nm zu messen [81]. Die obere Grenze, der meßbaren axialen Ausdehnung bzw. Größe mittels SMI liegt momentan bei ca. 180 nm (empirisch), deutlich unterhalb der axialen PSF des CLSM. Daher ist diese Mikroskopietechnik gerade für die Größenmessung kleinerer Objekte interessant.

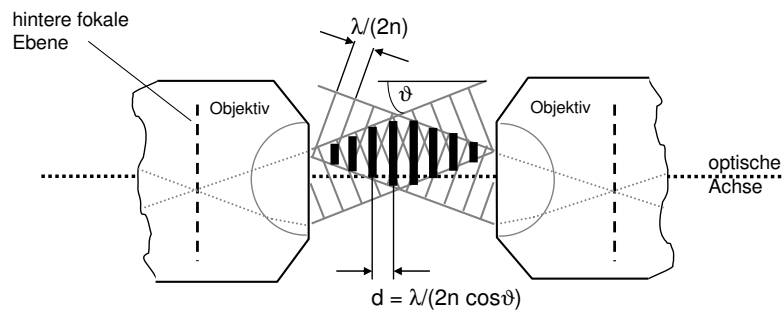


Abbildung 1.9: Objektraum des SMI-Mikroskops

n ...Brechungsindex des Mediums im Objektraum, λ ...Anregungswellenlänge, ϑ ...Winkel des ausfallenden Laserstrahls, d ...Abstand der Intensitätsmaxima im Wellenfeld. [58]

1.4.5 Weitere Mikroskopietechniken

4Pi Microscopy Eine Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie stellt das 4Pi Mikroskop dar [15] [72] [36] [37]. Ähnlich wie bei dem SMI-Mikroskop werden zwei gegenüberliegende Objektive verwendet, durch die ein 1- oder auch ein 2-Photonen-Laser eingekoppelt werden kann. Detektiert wird dann ein spezifisches Interferenzmuster mit einem Hauptmaxima und zwei Nebenmaxima (*side-lobes*). Eine Möglichkeit, die *side-lobes* zu entfernen bietet die mathematische Bearbeitung. Dazu benötigt man die Kenntnis von Höhe und Ort der Neben-Maxima. Dies ist ab einer relativen Höhe von unter 50 % möglich. Selbst bei Objektiven höchster numerischer Apertur (NA) war dies bis vor kurzem mit 1-Photonenanregung nicht der Fall (Signalverhältnis 60 % bis 70 %). Eine weitere Möglichkeit ist die 2-Photonenanregung mit konfokaler Detektion. Hier macht man sich die quadratische Abhängigkeit der Anregungseffizienz von der Beleuchtungsintensität zu Nutze. Die doppelte Wellenlänge bewirkt eine stärkere Beugung und schiebt die Nebenmaxima weiter nach außen. Durch die Detektions-PSF, welche vom Pinhole abhängig ist, kann auch eine Abschwächung der Nebenmaxima erreicht werden.

Momentan gibt es drei 4Pi-Mikroskopie-Typen. Beim Typ A erfolgt die kohärente Beleuchtung mit zwei Objektiven. Die Detektion ist aber eine gewöhnliche konfokale

Detektion mit einem Objektiv. Der Typ B benutzt die kohärente Detektion über beide Objektive, aber die Beleuchtung wird nur über ein Objektiv durchgeführt. Beim Typ C erfolgt die Beleuchtung kohärent und die Detektion mit beiden Objektiven. Eine Übersicht über die Punktbildfunktion des CLSM mit 1- und 2-Photonenanregung sowie der PSF des 2-Photonen 4Pi-Typ A sind in der Abbildung 1.10 dargestellt.

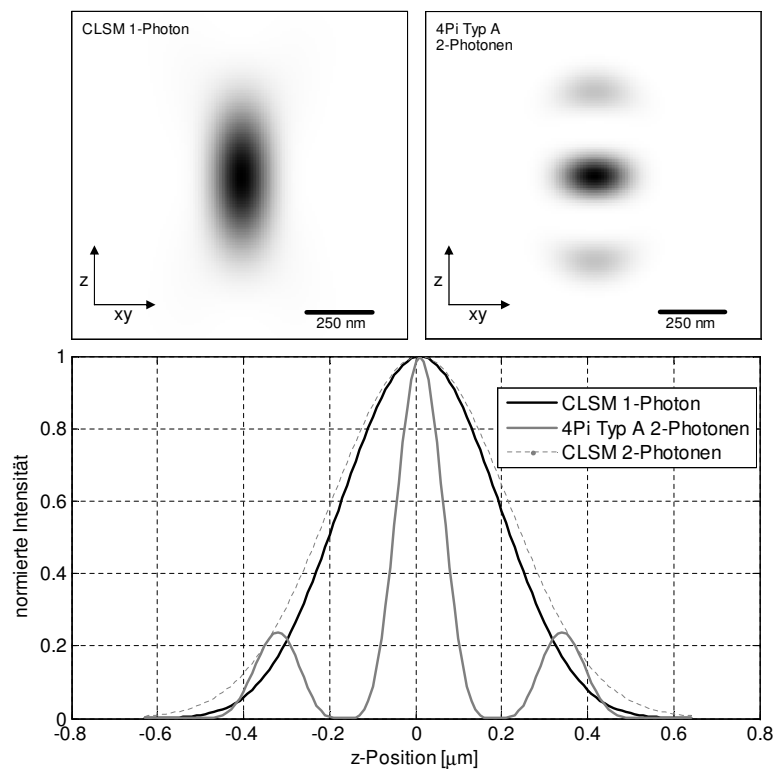


Abbildung 1.10: Theoretische Punktbildfunktionen des CLSM und des 4Pi Typ A

Die theoretischen PSFs des CLSM und des 4Pi Typ A mit den dazugehörigen Intensitätsplots wurden von David Baddeley simuliert, wobei für das CLSM 1-Photon für $NA=1.3$, $n=1.46$, $\lambda_{Absorption}=488$ nm, $\lambda_{Emission}=515$ nm, $Pinhole=0.7$ angenommen wurde und für die 2-Photonenanregung beim CLSM und 4Pi $\lambda_{Absorption}$ auf 790 nm erhöht wurde.

Stimulated Emission Depletion Eine weitere Methode zur Erhöhung der effektiven Auflösung ist die Mikroskopie mit Unterdrückung der Fluoreszenz durch stimulierte Emission (*Stimulated Emission Depletion*, STED). Bei diesem Mikroskopiesystem, das ebenfalls auf dem konfokalen Prinzip mit Fokussierung der Anregung auf die Probe beruht, wird zusätzlich zum Anregungsstrahl ein zweiter, gepulster und rotverschobener Laserstrahl in die Probe eingestrahlt. Dieser STED-Strahl wird durch optische Elemente so geformt, dass sich um den Anregungsfokus ein dreidimensionaler Ring ausbildet. In diesem Bereich findet in unmittelbarer Umgebung des Anregungsfokus eine stimulierte Emission statt, mit der die Fluoreszenz unterdrückt wird. Bei dieser Mikroskopiemethode wird folglich die Breite der Anregungs-PSF durch eine stimulierte Fluoreszenzemission von Farbstoff im Randbereich der PSF vor der eigentlichen Fluoreszenzdetektion deutlich verringert. Mit dieser Methode konnte bisher eine Auflösung bis zu 30 nm erreicht werden.

Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy Mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie kann, verglichen mit der konfokalen Mikroskopie, eine Verbesserung der z-Diskriminierung erreicht werden. Dies ist vor allem für die Detektion von Zellmembranen als auch Strukturen innerhalb dieser Membranen (z.B. Kanalproteine, Porenkomplexe) und Oberflächen von Netzwerken, wie z.B. Aktin [64], von Interesse. Allerdings ist man dabei auf die Grenzfläche zwischen Objektträger bzw. Deckglas und Probe begrenzt, da der z-Fokus nur bedingt durch Veränderung des Einfallswinkels des anregenden Lichts verstellbar ist. Grundlegendes Prinzip der TIRF-Mikroskopie ist die Totalreflektion des eingeleiteten Laserstrahls an einer ebenen Grenzfläche zwischen zwei Medien mit den Brechzahlen n_1 und n_2 , wobei $n_1 > n_2$ ist. An der Reflektionsstelle bildet sich eine evaneszente⁶ Welle aus, die beim Vorhandensein von Fluoreszenzfarbstoffen 100 bis 200 nm oberhalb der Grenzschicht ihre Energie auf eigene Kosten an diese abgibt. Laut [48] sind für die TIRF-Mikroskopie folgende Werte typisch: $\lambda_0 = 488$ nm, $n_1 = 1.518$, $n_2 = 1.33 \rightarrow \alpha_g = 61.2^\circ$, wobei λ_0 die Anregungswellenlänge und α_g der Grenzwinkel für Totalreflektion ist. [48]

⁶lat. evanescere = dahinschwinden

1.5 Zielsetzung

Um nicht nur genetische Abberationen als Krankheitsursache zu detektieren, sondern ihr Zustandekommen zu verstehen, wurden, basierend auf elektronen- und lichtmikroskopischen Studien, verschiedene Modelle zur Beschreibung der Organisation des Genoms im Zellkern entwickelt. Den meisten Modellen gemeinsam ist die Vorstellung, dass die DNA im Zellkern nicht zufällig organisiert ist und, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Größe und der Position von subchromosomalen Domänen bzw. Genen im Kern und deren Aktivität besteht. Die Aktivität von Genen soll sich demnach nicht nur in einer Änderung der Position im Zellkern sondern auch in einem Wechsel der Chromatinkondensation in Abhängigkeit der Aktivität und damit in einer Größenänderung widerspiegeln. Eine deutlich unterschiedliche Kondensation von Chromatin wird vor allem im Vergleich zwischen Chromatin im Interphasezellkern und mitotischen Chromosomen beschrieben.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) stellt bei der Untersuchung der Zellkern- und Chromatinorganisation eine bedeutende Markierungsmethode dar, wobei diese hauptsächlich in fixierten Präparaten angewendet wird. Die Analyse der Größe und der Position von subchromosomalen Bereichen in fixierten Präparaten hat den großen Vorteil, dass die Phototoxizität des Laserlichtes auf die Zellen und die Bewegungen der Domänen bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden müssen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der Fixierung auf die Morphologie von Zellkernen und subchromosomalen Domänen zu quantifizieren. Dazu soll mittels standardisierter FISH das Centromer von Chromosom 8 und die 8q24/*c-myc* Domäne als Beispiele subchromosomaler Bereiche in Methanol/Eisessig- und Formaldehyd-fixierten Zellen markiert und mit dem konfokalem Laserrastermikroskop und dem *Spatially Modulated Illumination* Mikroskop visualisiert werden. Als Zellen stehen normale humane Vorhautfibroblasten und die androgen-senitive Prostatakrebszelllinie LNCAP zur Verfügung. Zur anschließenden Bildauswertung sollen Programme verwendet werden, die in dieser Arbeitsgruppe entwickelt wurden, wobei auch Vorschläge gemacht werden sollen, welche Parameter aus den Bilddaten aus biologischer Sicht sinnvoll extrahiert werden könnten,

die von der Bildauswertungsgruppe in geeigneter Weise in den Programmen umgesetzt werden. Im Mittelpunkt der Bildauswertung soll jedoch das von David Baddeley entwickelte *multi point model* stehen, welches ohne Schwellwertsetzung die lateralen Ausdehnung und die Anisotropie subchromosomaler Domänen abschätzt. Die Genauigkeit dieser Abschätzung der Größe von Objekten soll an Beads bekannter Größe untersucht werden und der Algorithmus anschließend auf die biologischen Objekte in konfokalen Bildstapeln angewendet werden.

Am Beispiel der Hybridisierung der subchromosomalen Domänen in Metaphasechromosomen und Interphasechromatin soll ein möglicher Unterschied der lateralen Ausdehnung zwischen kondensiertem und nicht-kondensiertem Chromatin quantifiziert werden.

Weiterhin soll die Anwendbarkeit des *multi point models* zur lateralen Größenmessung auf in Gewebe markierten Domänen überprüft werden. Dazu soll ein Protokoll zur Gewebehybridisierung etabliert werden. Für diese Untersuchung steht eine einzelsträngige Sonde bekannter Sequenz zur Verfügung. Die Spezifität dieser Sonde soll an, aus Vollblut isolierten, Lymphozyten erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Biologische Objekte

Die Markierung der ausgewählten Domänen erfolgte in verschiedenen biologischen Spezies. Nach Vollblutabnahme eines männlichen Spenders (46,XY) konnten Lymphozytenpräparate hergestellt werden, die unter anderem als Kontrolle für die Spezifität der Sonden herangezogen wurden. Da sie einen normalen Karyotyp besitzen, waren sie besonders gut geeignet. Die verwendete primären humanen Vorhautfibroblasten VH7 embryonalen Ursprungs besitzen ebenfalls einen normalen Karyotyp und dienen hier als Kontrolle und zum Vergleich zwischen gesunden Fibroblasten und der Krebszelllinie LNCAP. Die VH7 Zellen wurden unserem Labor vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) bereitgestellt. Die LNCAP Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ) erworben. Letzteres ist eine humane Prostatakarzinomzelllinie, welche 1977 von der linken supraclaviculären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Mannes mit Prostatakarzinom etabliert wurde. Das Wachstum der fibroblastoiden LNCAP Zellen erfolgt adhärent als Aggregate oder auch als einzelne Zellen. Zytogenetische Angaben des Vertreibers DSMZ weisen auf einen hypotetraploiden Karyotype mit 6 % Polyploidie ($88(84-93)<4n>XXYY$) hin. M-FISH Untersuchungen von Strefford et al. (2001) bestätigen die Tetraploidie bezüglich dem Chromosom 8 (*c-myc*) [77].

Von den drei Zelltypen wurden, je nach Zielsetzung, hypotone (Lymphozyten, LNCAP) und nicht-hypotone (VH7) Metaphasesuspensionen, hypotone (Lymphozyten, LNCAP) und nicht-hypotone Interphasesuspensionen (VH7) sowie Formaldehyd-fixierte Präparate hergestellt.

Weiterhin wurde formalin-fixiertes paraffin-eingebettetes Prostatakrebsgewebe (PCa) verwendet. Die Gewebeproben sowie das histopathologische Grading des Karzinoms in G2 mit dem Gleason Score 6(3+3) und die klinische Klassifikation in pT2c, pNO, pMx, Pn1 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Professor Gröne (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

2.2 Physikalische Objekte (Beads)

Beads oder auch *fluorescent microspheres* sind Polystyrolkugeln mit definiertem Durchmesser, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen innerlich markiert sind und die in dieser Arbeit als Kalibrationsobjekte bei der Messung von Größen verwendet werden. Bei den SMI-Messungen wurden ausschließlich 100 nm Beads verwendet (*Duke Scientific's Corporation*, Palo Alto, California). Für die Messungen mittels CLSM wurden Beads mit Größen zwischen 100 nm und 560 nm der selben Firma verwendet. Letzteres als so genannte *TetraSpeck-beads* (markiert mit vier verschiedenen Fluorochromen). Die Präparation der Beads auf Objektträgern erfolgte in Verdünnung mit 100 % Ethanol in Konzentrationen zwischen 1:10 bis 1:10000, je nach Verwendung (CLSM, SMI) und Größe der Beads. Nach entsprechender Verdünnung wurden die Beads im zugedeckten Ultraschallbad für 5 bis 10 min behandelt, um eventuelle Klusterungen zu reduzieren. Anschließend wurden ca. 20 μl auf einen gereinigten Objektträger verstrichen und vollständig trocknen gelassen. Dann mit Vectashield überschichtet und als Dauerpräparat mit Deckglas und Nagellack verschlossen.

2.3 Fluorochrome und verwendete Sonden

Für die Markierung der subchromosomalen Domänen 8q24/*c-myc* und der alpha-Satelliten-Region von Chromosom 8 wurde eine *dual colour probe* von *Qbiogene* verwendet. Die jeweils verwendeten Fluorochrome mit ihren Spektren sind in der Tabelle 2.1 aufgezeigt. Die Sonde für die 8q24-Region deckt laut Hersteller einen Bereich von 220 kbp ab und ist zwischen den Markerregionen D8S1128 und D8S490 lokalisiert.

Außerdem wurde eine Oligonukleotid-Sonde für das Centromer 9 verwendet, welche

Fluorochrom	max. $\lambda_{Ex.}$	max. $\lambda_{Em.}$	Sonde
Fluorescein	495 nm	525 nm	CEN8 (<i>Dual Color probe, Qbiogene</i>) CEN9 (<i>Thermo Electron Cooperation, Heidelberg</i>)
Rhodamin	565 nm	590 nm	8q24 (<i>Dual Color probe, Qbiogene</i>) PAINT09 (<i>Qbiogene</i>)
TO-PRO-3 iodide	642 nm	661 nm	Chromatinfärbung (1mM in DMSO, <i>Molecular Probes</i>)

Tabelle 2.1: Fluorochrome und verwendete Sonden

(siehe Tabelle 2.1) von *Thermo Electron Cooperation*, Heidelberg, synthetisiert wurde. Dabei handelt es sich um einen einzelnen Strang mit einer Länge von 18 Basen mit der Sequenz 5'-AAT CAA CCC GAG TGC AAT-3', welcher mit Fluorescein doppelt markiert wurde. Ein Aliquot wurde lyophilisiert geliefert und zur Verwendung mit nukleasefreies Wasser resuspendiert. Ein weiteres wurde gelöst angefordert. Beide Aliquote haben ein Lösungsvolumen von 100 μ M. Die Schmelztemperatur T_m beträgt 47,3 °C. Zum Nachweis der Chromosomenspezifität wurde ein *whole chromosome paint* für das Chromosom 9 verwendet. Als Zellkerngegenfärbung wurde *TO-PRO-3 iodide* verwendet, welcher bevorzugt an AT-reiche DNA-Bereiche bindet.

2.4 Adhärenente Zellen (LNCAP, VH7)

2.4.1 Kultur adhärenenter Zellen

Streng adhärenente Zelllinien wachsen in der Regel nicht weiter, wenn der Zellkulturflaschenboden vollständig eingenommen worden ist. Tumorzellen und transformierte Zellen wachsen meistens unter sinkender Proliferationsrate weiter. Um Stress und ein Absterben der Zellen zu vermeiden, ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte zu verdünnen. Dies wird durch das so genannte *Passagieren* erreicht, bei dem die Zellen in verdünnter Form (LNCAP und VH7 z.B. 1:2, 1:3) in neue Kulturflaschen überführt werden.

Reagenzien

Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

Trypanblau 0,4 % *solution* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Kulturmedium VH7:

Dulbeccos Medium w/o Phenol red (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

+ 1 % Penicillin/Streptomycin (100x; PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 1 % L-Glutamin (100x; PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

Kulturmedium LNCAP:

RPMI 1640 with L-Glutamine (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 1 % Penicillin/Streptomycin (100x; PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 1 % L-Glutamin (100x; PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

Einfriermedium VH7:

Dulbeccos Medium w/o Phenol red (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

+ 30 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 10 % Dimethylsulfoxid DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Einfriermedium LNCAP:

RPMI 1640 with L-Glutamine (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 30 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

+ 10 % Dimethylsulfoxid DMSO (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Passagieren von Zellen Die am weitesten verbreitete Methode, adhärenente Zellen zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Trypsin/EDTA. Dabei sollte man darauf achten, daß die Zellen nicht zu lange dem aktiven Trypsin ausgesetzt sind, da eine lange Einwirkzeit die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigen kann. Prinzipiell werden alle Pipettierungen für die Passagierung nicht direkt auf die Zellen durchgeführt, sondern

durch Drehen der Flasche auf die zellfreie Oberseite. Das Aussäen der Zellen in neue Kulturflaschen erfolgt nach einem Verdünnungsfaktor, dessen Optimum für jede Zelllinie vorher bestimmt werden muss.

Protokoll

- Trypsin und frisches Medium auf ca. 37 °C vorwärmen
- Altes Medium absaugen
- Je nach Konfluenz der Zellen und Zellkulturflasche 2 ml (T25¹) bzw. 3-4 ml (T75²) Trypsin dazu geben
- Flasche im Brutschrank bei 37 °C 1 bis 3 min inkubieren
- Abkugeln der Zellen im Lichtmikroskop kontrollieren
- Trypsin bis auf kleinen Rest absaugen und nachinkubieren bei 37 °C ca. 1 min
- Zellen abklopfen, dabei zu starke Schaumbildung meiden
- In definierte Menge vorgewärmtes Medium aufnehmen, je nach Bedarf in neue Flaschen überführen und mit Medium auf insgesamt 5 ml (T25) bzw. 15 ml (T75) auffüllen
- Je nach Zelldichte alle 2 bis 3 Tage Mediumwechsel

Einfrieren von Zellen Wenn eine Zelllinie nicht permanent genutzt wird, ist es üblich Zellen bei -150 °C zur langfristigen bzw. bei -86 °C zur kurzfristigen Lagerung einzufrieren. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und vor allem vor Variabilität bei Subkultivierung. Als Schutzsubstanz wird Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, um zu verhindern, daß es zu Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle kommt. Weiterhin wird durch DMSO das Zytoplasma partiell dehydriert, indem es das Zellwasser bindet.

¹25 cm²-Flasche mit einer maximalen Zellausbeute von normalerweise 5x10⁶ Zellen, je nach Zelllinie

²75 cm²-Flasche mit einer maximalen Zellausbeute von normalerweise 5x10⁶ bis 2x10⁷ Zellen, je nach Zelllinie

Protokoll

- Einfriermedium, Kulturmedium und Einfrierröhrchen kalt stellen
- Zellen trypsinieren, in kaltes Kulturmedium aufnehmen und Zellzahl bestimmen
- Zentrifugieren 200 g 5 min 4 °C
- Zellzahl einstellen auf 1×10^6 Zellen pro ml Einfriermedium, dabei gut resuspendieren, zügig und ab jetzt auf Eis arbeiten
- Je 1 ml pro Einfrierröhrchen pipettieren
- Bei -150 °C bzw. -86 °C lagern

Auftauen von Zellen

Protokoll

- Ampulle zügig auftauen und überführen der Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Vorgewärmtes Medium im Überschuss zugeben und vorsichtig mischen
- Aliquot entnehmen für Bestimmung der Vitalität
- Zentrifugieren bei 200 g 5 min und Überstand verwerfen
- Resuspendieren des Pellets in Medium und Überführen in T25/T75 und Inkulturnahme

Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest Für die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten adhärennten Zellen ist die anfänglich zugesetzte Zellzahl von großer Bedeutung. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen sehr langsam, zu dicht ausgesäte Zellen müssen demgegenüber zu oft subkultiviert werden. Dies kann unter Umständen die Gesamtlebensdauer der Zelllinie verkürzen. Die Neubauerkammer, auch Hämocytometer genannt, besteht aus neun Großquadraten. Jedes Großquadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 . Dies ergibt bei

einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 μl . Zur Testung der Lebensfähigkeit von Zellen allgemein sowie vor und nach dem Auftauen wird eine Vitalfärbung durchgeführt. Das dazu verwendete Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der tote Zellen blau anfärbt, wobei lebende (vitale) Zellen ungefärbt bleiben.

Protokoll

- Zellen trypsinieren und in definierte Menge vorgewärmtes Medium aufnehmen
- 20 μl aus Zellsuspension entnehmen und mit 20 μl Trypanblau mischen
- Deckglas der Zählkammer leicht anfeuchten (anhauchen) und auf die Kammer legen, das Erscheinen sog. Newtonringe zeigt an, daß das Deckglas richtig aufgelegt und die Tiefe der Zählkammer richtig eingestellt (0,1 mm) ist
- Zellsuspensionslösung vorsichtig unter das Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer pipettieren, wobei die Kapillarkräfte die Suspension selbst in den Zwischenraum saugen
- Im Lichtmikroskop die Fokusebene einstellen; vier Großquadrate auszählen und den Mittelwert errechnen, dabei darauf achten, daß Zellen, die auf den Außenlinien liegen, nicht zweimal gezählt werden; somit nur zwei Linien zählen
- **Berechnung der Zellzahl** Mittelwert aus den vier Großquadraten mit 10^4 multiplizieren, dies ergibt die Zellkonzentration in ml; die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro ml (Verdünnungsfaktor der Zellsuspension berücksichtigen)
- **Berechnung der Vitalität** Der Prozentsatz an lebenden Zellen errechnet sich nach folgendem Schema:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100$$

2.4.2 Hypotone und nicht-hypotone Suspension

Die Präparation einer hypotonen und einer nicht-hypotonen Methanol/Eisessig-Zell-suspension von adhären Zellen unterscheidet sich nicht wesentlich von der der Suspensionszellen. Dazu muss zum Einen die Behandlung mit *Colcemid* dem Zelltyp angepaßt werden (1 bis 6 h) und zum Anderen müssen die Zellen geerntet und in Methanol/Eisessig aufgenommen werden.

Reagenzien

Kulturmedium

Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

Colcemid (10 μ /ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

Methanol (Merck, Darmstadt)

Eisessig (Fluka Biochemica GmbH, Buchs CH)

Protokoll

- Medium absaugen und 2 bis 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugeben
- Ca. 1 min im Brutschrank inkubieren
- Medium im Überschuß zugeben und alles in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen
- 5 min 200 g 4 °C zentrifugieren
- Überstand absaugen bis auf ca. 5 ml und Pellet darin resuspendieren
- Je nach Präparation: KCl-Behandlung und Aufnahme in eiskaltes Methanol/Eisessig (3:1) oder direkt Aufnahme in eiskaltes Methanol/Eisessig-Fixativ

2.4.3 Formaldehydfixierung

Paraformaldehyd (fest) ist das kurzkettige Polymer des Formaldehyds (flüssig) und wird bei niedrigem pH-Wert sowie unter Erhitzung in Formaldehyd aufgespalten. Diese Formaldehyd-Lösung wird zur Fixierung von Geweben oder Zellkulturen verwendet. Es wirkt, indem es Proteine reversibel vernetzt.

Reagenzien

PBS (10x Konzentrat; Fluka Biochemica, Buchs CH)

Paraformaldehyd (Fluka Biochemica, Buchs CH)

Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA)

Fixogum (Marabu, Gelsenkirchen)

Protokoll

- Aussaat der Zellen mit geringer Zellzahl auf sterile Slides
- Inkulturnahme bis Konfluenz der Zellen
- Absaugen des Mediums; Waschen mit 1xPBS (ab hier kein steriles Arbeiten nötig)
- mindestens 10 min mit frischem 4 % PFA/1xPBS inkubieren
- Waschen mit 1xPBS
- Überschichten mit Vectashield und Versiegeln mit Fixogum

2.5 Suspensionszellen

2.5.1 Isolierung mononuklearer Zellen (MNC) aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Bei der Dichtegradientenzentrifugation entstehen vier Phasen. Die oberste Schicht enthält das Plasma, danach eine opaque weißliche Schicht mit den Lymphozyten, dann das Lymphozytentrennmedium und als Pellet die restlichen Erythrozyten mit den Granulozyten.

Reagenzien

FicoLite-H (Linaris, Bettingen)

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

Chromosomenmedium B (Biochrom KG, Berlin)

Protokoll

- In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml FicoLite-Dichtegradienten-Lösung (1,077 g/ml) vorlegen und mit 30 ml Vollblut vorsichtig überschichten
- 20 min bei 1000 g zentrifugieren (ohne Bremse)
- Den hellen Ring der Interphaseschicht mit den mononukleären Zellen in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen, den Rest verwerfen
- Die gewonnene Interphaseschicht mit RPMI/FCS (1:1) auf 50 ml auffüllen, gut resuspendieren und 10 min bei 1000 g zentrifugieren (ohne Bremse)
- Überstand abpipettieren, Pellet erneut in RPMI/FCS (1:1) waschen
- Überstand abpipettieren, Pellet in 10 ml Chromosomenmedium B ($1-5 \times 10^6$ Zellen/ml) aufnehmen und Inkulturnahme für maximal 72 h im Brutschrank → weitere Verwendung: Herstellung einer hypotonen oder nicht-hypotonen Methanol/Eisessig-Zellsuspension oder Formaldehydfixierung

Lymphozyten können über mehrere Teilungsschritte (bis zu 5) in Kultur gehalten werden. Um allerdings eine Teilung der normalerweise nicht proliferierenden Zellen zu erreichen, müssen die Zellen mit bestimmten Mitogenen stimuliert werden. Das hier verwendete Chromosomenmedium B enthält bereits das stimulierende Mitogen Phytohämagglutinin (Pflanzenlecitin).

2.5.2 Kultur mononuklearer Zellen (MNC)

Eine Kultivierung von MNC länger als 2-3 Tage ist mittels Interleukin-2-Zugabe möglich. In dieser Arbeit allerdings wurden die isolierten Zellen nach 48 h Kultur im Chromosomenmedium B (mit Phytohämagglutinin, Biochrom KG, Berlin) als Methanol/Eisessig (2.5.3) und Formaldehyd-Präparat (2.5.4) fixiert. Das entnommene Vollblut wurde unter sterilen Bedingungen noch am selben Tag verwendet.

2.5.3 Hypotone und nicht-hypotone Suspension

Zum Nachweis der Spezifität der Oligo-Sonde für das Centromer 9 wurde ein Metaphasenpräparat (hypotone Suspension) von Lymphozyten (MNC) hergestellt. Um die Ausbeute an mitotischen Zellen zu erhöhen, wurde *Colcemid* verwendet, welches Zellen in der Metaphase des Zellzyklus in der Regel reversibel blockiert. Parallel dazu wurde auch eine nichthypotone Zellsuspension angefertigt, die einen geringen Anteil an Metaphasen beinhaltet und hauptsächlich für die Hybridisierungen in Interphasezellkernen Verwendung findet. Die Aufbewahrung der Methanol/Eisessig-Zellsuspension erfolgte bei -20 °C über mehrere Wochen.

Reagenzien

Chromosomenmedium B (Biochrom KG, Berlin)

Colcemid (10 µ/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Kaliumchlorid (75 mM; Merck, Darmstadt)

Methanol (Merck, Darmstadt)

Eisessig (Fluka Biochemica GmbH, Buchs CH)

Protokoll

- 50 ml Chromosomenmedium B auf 37 °C erwärmen und auf 2 T25 verteilen
- 8 ml Vollblut auf vorbereitete T25 tropfenweise verteilen und bei 37 °C für 72 h im Brutschrank inkubieren
- In eine der beiden T25 nach 70 h Zugabe von 200 µl *Colcemid*

- 2 h bei 37 °C im Brutschrank weiterinkubieren → Metaphasepräparat
- Nach 72 h beide Zellsuspensionen jeweils in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen (vorher vorsichtig schwenken für eine homogene Suspension)
- 10 min 200 g bei RT zentrifugieren, Überstand bis auf 4 bis 5 ml vorsichtig abnehmen und gut aufschütteln
- 25 ml 37 °C-warme 75 mM KCl-Lösung unter schwenken vorsichtig auf das gut gelöste Pellet geben und 25 min bei 37 °C inkubieren
- 10 min 200 g bei RT zentrifugieren, Überstand bis auf 4 bis 5 ml vorsichtig abnehmen und gut aufschütteln
- Vorsichtig tropfenweise ca. 30 ml eiskaltes Methanol/Eisessig (3:1) unter schwenken zugeben und 1 h bei RT inkubieren
- 10 min 200 g bei RT zentrifugieren, Überstand bis auf 4 bis 5 ml vorsichtig abnehmen und gut aufschütteln
- Tropfenweise ca. 30 ml frisches eiskaltes Methanol/Eisessig (3:1) unter schwenken zugeben und 1 h bei RT inkubieren
- 10 min 200 g bei RT zentrifugieren, Überstand bis auf 4 bis 5 ml vorsichtig abnehmen und gut aufschütteln
- Waschschrirte wiederholen bis Pellet fast weiß ist
- Je nach Zelldichte in einem Endvolumen von 2 bis 3 ml frischem eiskaltem Methanol/Eisessig (3:1) aufnehmen

2.5.4 Formaldehydfixierung

Die Fixierung mittels Formaldehyd dient der sogenannten dreidimensionalen Konservierung von Zellen inklusive der Zellkerne. Diese Technik soll zu einer besseren Erhaltung der natürlichen Kernarchitektur führen und es dadurch erlauben, genauere Aussagen

über die Anordnung von Chromosomenterritorien sowie über die Organisation subchromosomaler Domänen zu machen.

Reagenzien

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Polylysinhydrobromid (1 mg/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Paraformaldehyd (Fluka Biochemica GmbH, Buchs CH)

PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (steril)

Natriumazid (Riedel-deHaën, Seelze)

Protokoll

- Objektträger mit 70 % Ethanol reinigen, 1 ml Polylysin-Lösung mittig draufpipettieren und 1 h inkubieren
- Vorsichtig mit Aqua dest. spülen und lufttrocknen lassen
- Zellen in Chromosomenmedium B aufnehmen in einer Konzentration von ca. 3×10^6 Zellen/ml
- 0,3 ml dieser Zellsuspension auf den Polylysin-beschichteten Bereich der Objektträger pipettieren
- 10 bis 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubieren
- Absetzen der Zellen im Lichtmikroskop kontrollieren
- Absaugen des Mediums und überführen der Objektträger in 0.3xPBS für 1 min
- 4 % PFA/0.3xPBS für 10 min inkubieren und waschen 3 x 5 min in PBS
- Lagerung für max. einen Monat in PBS/0,04 % Natriumazid bei 4 °C

2.6 Proteinnachweis

Der Proteinnachweis in den PFA-fixierten VH7- und LNCAP-Zellen erfolgt mittels Immunocytochemie nach der indirekten zwei-Schritt-Methode. Bei dieser Methode bindet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Danach wird ein zweiter fluorochromierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Da die verwendeten primären Antikörper aus der Maus stammen, ist auch der sekundäre Antikörper entsprechend gegen Mausimmunglobuline gerichtet.

Ki-67 Der monoklonale Antikörper Ki-67 wurde 1983 von Gerdes et al. entdeckt, nachdem murine Myelomazellen mit *Spleen*-Mauszellen fusionierten, welche mit Kernen der L 428³ Zelllinie immunisierte wurden. Ki-67 Protein (MIB-1) ist ein nukleäres nicht-Histon Protein, das ubiquitär in allen Phasen der Mitose (G₁, S, G₂ und M-Phase) auftritt. In ruhenden Zellen (G₀-Phase) fehlt das Ki-67 Protein. Während der Interphase kann das Ki-67 als spezifisches Färbemuster nur im Nukleus nachgewiesen werden. Bei der Mitose dagegen wird der überwiegende Teil des Proteins auf der Oberfläche der Chromosomen angelagert. Der Abbau des Proteins erfolgt schnell, wenn die Zelle in den nicht proliferierenden Zustand übergeht. Während Reparaturprozessen scheint keine Ki-67 Expression stattzufinden. Besonders häufig gelingt der Nachweis deshalb in stark proliferierenden Geweben, wie z.B. Embryonalgewebe und in schnell wachsenden Tumoren. Das pKi-67 besitzt zwei Isoformen mit einem Molekulargewicht von 395 und 345 kDa. Der hier verwendete MIB-1-Antikörper zeigt im Western-Blott die selben Banden wie das pKi-67 und reagiert über das gleiche Epitop mit dem Ziel-pKi-67 wie ein pKi-67 Antikörper. [49] [45] [71] [24]

c-Myc Der Anti-*myc* Antikörper erlaubt die Detektion rekombinanter Proteine, die die *c-Myc* Epitope besitzen. Der Anti-*myc* Antikörper erkennt folgende Aminosäuresequenz:

-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-

[25].

³*human Hodgkin lymphoma*; etabliert aus einer pleuralen Effusion einer 37 Jahre alten Frau mit Hodgkin Lymphom (*stage IVB, nodular sclerosis, refractory, terminal*) 1978

Der verwendete Antikörper ist ein *mouse monoclonal IgG₁-kappa antibody* Klon 9E10 (*Invitrogen*) und liegt in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml in PBS, 1 % BSA mit 0,001 % Natriumazid als Konservierungsmittel vor. Die Kurzzeitlagerung erfolgt bei 4 °C, die Langzeitlagerung bei -20 bis -80 °C. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde von *Invitrogen* mittels Immunoblotting und ELISA getestet. Es wird ein spezifisches Färbemuster im Kern erwartet.

AMACR Um eine zusätzliche Kontrolle des Protokolls als auch für den Vergleich des Färbemusters zwischen dem nukleären c-Myc und einem zytosolischen Protein zur Verfügung zu haben, wurde das peroxisomale und mitochondriale Protein alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR, P540S) immunologisch markiert. Zur Detektion des AMACR-Proteins in den biologischen Proben wurde der monoklonale Maus anti-AMACR Antikörper Klon ZA003 vom Isotyp IgG₁-kappa verwendet. Das 200 µl Aliquot hat eine Konzentration des Antikörpers von 0,5 mg/ml PBS (pH 7.4) mit 0,1 % Natriumazid. Die Reaktivität dieses Antikörpers wurde an humanen HepG2 Zelllysaten mittels Western Blot und in Formalin-fixiertem paraffin-eingebetteten humanem Prostatakrebsgewebe und im Hase getestet. Für den Einsatz in der Immunohistochemie wurden in Abhängigkeit von der Affinität des sekundären Antikörpers, der Antigenkonzentration, Sensitivität der Detektionsmethode, Temperatur, Länge der Inkubation etc. eine Konzentration von 3-5 µg/ml empfohlen. Die Lagerungsbedingungen entsprechen denen des *c-myc*-Antikörpers.

Reagenzien

Maus anti-*myc* Klon 9E10 (1mg/ml; *Invitrogen*, Karlsruhe) (1:500)

Maus anti-AMACR Klon ZA003 (0,5mg/ml; *Invitrogen*, Karlsruhe)

Maus anti-human Ki-67 Antigen Klone MIB-1 (80mg/ml; *DakoCytomation*, Hamburg) (1:100 (Gewebe), 1:150 (Zellen))

PBS (1x aus 10x Konzentrat; *Fluka Biochemica*, Buchs CH)

Triton-X100 BSA (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim)

sekundärer anti-Mouse IgG Antikörper, Alexa488 (*Invitrogen*, Karlsruhe) (1:150)

Protokoll

- zum Entfernen des Eindeckmediums bzw. nach Fixierung der Zellen 2x5 min mit PBS waschen
- 0,2 % Triton-X100/PBS für 3 min
- Blocking Lösung (PBS/ 2 % BSA) für 20 min inkubieren bei RT zur Reduzierung unspezifischer Bindung des Antikörpers
- Blocking Lösung entfernen, Antikörper entsprechend der Verdünnung in PBS/ 2 % BSA -Lösung geben und für 1 h inkubieren bei RT oder 30 min bei 37 °C (feuchte Kammer)
- waschen 2x5 min mit PBS
- fluoreschromierten sekundären Antikörpers in entsprechend der Verdünnung in PBS/ 2 % BSA-Lösung geben und für 1 h inkubieren bei RT oder 30 min bei 37 °C (feuchte Kammer, dunkel)
- waschen 2x5 min mit PBS, Kontrolle im CLSM, Kerngegenfärbung

2.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) ist eine über 20 Jahre alte Technik zur molekularbiologischen Markierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen mittels fluoreszierender Sonden im natürlichen Kontext. Im Jahre 1969 zeigten Pardue and Gall erstmals eine *in situ* Hybridisierung von radioaktiv-markierter Sonden-DNA mit Satelliten DNA in murinen Metaphasechromosomen [12]. Im Laufe der Zeit haben verschiedene Modifikationen dieser Methode zu einer Verbesserung der Markierung von DNA als auch RNA geführt.

Das grundlegende Prinzip der DNA-Markierung ist aber gleich geblieben. Die doppelsträngige Ziel-DNA wird normalerweise mittels Hitze denaturiert, so dass die Ziel-DNA einzelsträngig vorliegt. Die Sonden-DNA wird, wenn sie als doppelsträngige Sonde

vorliegt, ebenfalls durch Hitze denaturiert. Einzelsträngige Ziel- und fluorochromierte Sonden-DNA werden anschließend zusammengebracht, wobei dann eine Renaturierung stattfindet, bei der sich Hybride aus Ziel- und Sonden-DNA bilden.

2.7.1 Vorbehandlung der Zellen

Methanol/Eisessig-fixierte Zellen als auch PFA-fixierte Zellen wurden mit dem selben Protokoll behandelt. Unterschiede in der Behandlung ergeben sich allerdings in der Dauer der Pepsinbehandlung. Pepsin entfernt überschüssiges Zytoplasma und verringert dadurch den Hintergrund für ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Behandlungsdauer muss abhängig vom Zytoplasmagehalt an den jeweiligen Zelltyp als auch an die Fixierungsmethode angepasst werden. Ca. 15 μ l von der Methanol/Eisessig-Suspension wird auf einen mit 4 °C Aqua dest. angefeuchteten Objektträger aufgetropft und trocknen gelassen. Die PFA-fixierten Zellen werden in 1xPBS 5 min gewaschen und ohne auszutrocknen weiterverwendet.

Reagenzien

Ethanol (Merck, Darmstadt)

SSC (10x Konzentrat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

PBS (10x Konzentrat; Fluka Biochemica, Buchs CH)

RNase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Pepsin Chrystallin (4,230 U/mg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Pepsin-Stock (100 mg/ml in 0.01 N HCl, pH 2.3) Formamid (AppliChem, Darmstadt)

HCl (Merck, Darmstadt)

Protokoll

- Objektträger 5 min in 2xSSC waschen
- 1 h 200 μ l RNase (1:100 aus RNase-Stock in 2xSSC)
- 2 x 5 min in 2xSSC waschen

- 5 min in 1xPBS waschen
- 1 bis 2 min Pepsin-Lösung (70 ml Aqua dest./700 μ l 1M HCl/21 μ l Pepsin-Stock) bei 37 °C
- 1 x 5 min 1xPBS bei RT
- Objektträger je 3 min durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) ziehen und lufttrocknen lassen
- Zytoplasmaverdau im Lichtmikroskop kontrollieren
- (evtl. Aufbewahrung der Objektträger in 70 % Ethanol im Kühlschrank)
- Objektträger 5 min bei 75 °C in 70 % Formamid/2xSSC denaturieren
- Objektträger je 3 min durch eine aufsteigende eiskalte Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) ziehen und lufttrocknen lassen

2.7.2 Vorbehandlung von Gewebe

Zur Hybridisierung Formalin-fixiertem Paraffingewebe (oft Archivierungsgewebe) wurden in dieser Arbeit Schnitte mit einer Dicke von 5 μ m verwendet. Der Vorteil dickerer Schnitte ist, dass die Zellkerne eher unbeschädigt sind als bei dünnen Schnitten. Die verwendeten Prostatakrebsgewebeschnitte hatten den Vorteil, dass sie gesundes und pathologisches Gewebe enthielten und dadurch die Bedingungen der Hybridisierung gesunder und pathologischer Areale gleich waren. Da die Denaturierung des Gewebes mittels Mikrowelle bei Temperaturen um den Siedepunkt durchgeführt wurden, war es besonders wichtig, dass die Schnitte sehr fest auf den Objektträger fixiert wurden. Dies wurde durch das vorherige Auftragen von *APES*⁴ auf den Objektträger realisiert. Weiterhin ist die Deparaffinisierung mittels Xylol ein kritischer Schritt, da Reste an Paraffin den sowieso schon starken Hintergrund erhöhen.

⁴3-aminopropyltriethoxysilane

Reagenzien

Xylol (Merck, Darmstadt)

Isopropanol (AppliChem, Darmstadt)

PBS (10x Konzentrat; Fluka Biochemica, Buchs CH)

Citratpuffer pH 6.0 (Grüssing, Filsum)

Pronase E *from Streptomyces griseus* (Fluka Biochemica, Buchs CH)

Formamid (AppliChem, Darmstadt)

SSC (10x Konzentrat; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Protokoll

- 2 x 15 min in 100 % Xylol waschen zur Entfernung des Paraffins
- Schnitte je 5 min durch eine absteigende Isopropanolreihe (100 %, 96 %, 70 %) ziehen
- Spülen in 1xPBS
- Schnitte 5 bis 15 min im Citratpuffer (pH 6.0) vorsichtig kochen (Mikrowelle); Schnitte können abschwimmen
- Schnitte sofort in 1xPBS ca. 2 min auskühlen lassen
- 3 min 0,05 % Pronase E/1xPBS bei 37 °C (Wasserbad) inkubieren
- Gut spülen mit 1xPBS
- Spülen in 50 % Formamid/2xSSC
- 15 min in 70 % Formamid/2xSSC bei 75 °C denaturieren
- Schnitte je 5 min durch eine aufsteigende eiskalte Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) ziehen und lufttrocknen lassen

2.7.3 Vorbehandlung der Sonden

Denaturierung der kommerziellen Sonden Die Denaturierung der kommerziellen Sonden richtet sich nach dem Hersteller *Qbiogene*. Eine Übersicht gibt die Tabelle 2.2.

Sonde	Ansatz [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]
Chromosome 8q24 (c-myc)/ Alphasatellite 8 Cocktail Probe, Dual-Colour direct labelled	5-10	75	10
Total Chromosome DNA Probe, Direct-labelled Red	5-10	75	10

Tabelle 2.2: Denaturierung kommerzieller Sonden

Vorbereitung der Oligo-Sonde Da diese Sonde einsträngig vorliegt, ist keine Denaturierung erforderlich. Die lyophilisierte Sonde wurde in nuklease-freiem, sterilem Wasser mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l gelöst, auf Eis zu gleichen Teilen gemischt, aliquotiert und bei -20° C gelagert. Nach Austesten der Konzentration wurden 300 ng Sonde für die Hybridisierung eingesetzt. Das entspricht einer 1:20 Verdünnung mit dem Hybridmix (50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 2xSSC). Für einen Bereich von 24x24 mm wurden 10 μ l eingesetzt.

2.7.4 Hybridisierung und Nachbehandlung

Die Hybridisierung der kommerziellen Sonden und der Oligo-Sonde erfolgt über ein bis zwei Nächte bei 37° C in der feuchten Hybridisierungskammer. Die Nachbehandlung (Waschen) ist abhängig von der Sonde (*WCP*, *Dual colour probe*), der Zellen bzw. Gewebe sowie von der Fixierungsmethode und ist somit variabel.

Reagenzien

20XSSC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
PBS (10x Konzentrat; Fluka Biochemica, Buchs CH)
TO-PRO-3 iodide (1mM in DMSO, Molecular Probe)
Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, USA)

- **Waschen der kommerziellen Sonden** in 2xSSC spülen; 5 min 65 °C 1xSSC waschen
- **Waschen der Oligo-Sonde** in 2xSSC spülen; 5 min 42 °C 2xSSC waschen; 5 min 1xPBS

Nach dem Waschen sollte die Hybridisierung am Leica TCS kontrolliert werden. Bei erfolgreicher Hybridisierung 30 s mit *TO-PRO-3 iodide* 1:1000 in 1xPBS (1 μ M) inkubieren, 5 min mit 1xPBS waschen (Gegenfärbung), mit *Vectashield* überschichten und einbetten (evtl. Dauerpräparat).

2.8 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Färbung von Gewebeschnitte mittels Hämatoxylin-Lösung ist eine der gebräuchlichsten histologischen Färbung. Sie beruht darauf, dass Hämatoxylin durch Oxidation in den eigentlichen Farbstoff Hämatein überführt wird. Dieser Farbstoff bildet dann mit Aluminium-Ionen eine positiv geladene Komplexverbindung, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA reagiert. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der alle azidophilen/eosinophilen/basischen Zellplasmaproteine rot färbt. Die Kerne erscheinen somit blau, das Zytoplasma rot.

Reagenzien

Hämatoxylin-Lösung, Gill Nr. 3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Pasching)
Eosin-Stammlösung: 1g Eosin in 100 ml A.dest. (Lagerung 4°C)

Protokoll

- Entparaffinisierung der Schnitte mittels 100 % Xylol (2x15 min) mit anschließender Isopropanol-Reihe je 5 min 100 %, 96 %, 70 % und mit A. dest. spülen
- Hämatoxylin-Lösung 3 min auf Schnitt geben und mit Leitungswasser kurz spülen
- differenzieren in 1 % HCl in 70 % Ethanol, kurz eintauchen
- unter fließendem Leitungswasser 5 min spülen, anschließend mit A. dest. kurz spülen
- Eosin-Arbeitslösung: 1:10 mit A.dest aus Stammlösung (frisch)
- falls Färbung nicht kräftig genug: auf 100 ml Eosin-Arbeitslösung 0,5 ml Eisessig dazu geben und mit A.dest. spülen
- mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (30 %, 70 %, 96 %) Schnitte entwässern
- zur Klärung des Schnittes waschen in Xylol 100 % und Dauerpräparat herstellen

2.9 Detektion

2.9.1 Confocal Laser Scanning Microscop (CLSM)

Die dreidimensionale Aufnahme der biologischen Objekte und der Beads erfolgte mittels konfokalem Laser-Rastermikroskop TCS NT SP1 von Leica (Mannheim). Dieses konfokale Mikroskop ist mit einem Argon/Krypton-Laser ausgestattet, der 488-, 568- und 647 nm Anregungswellenlängen besitzt. Die drei Laserlinien werden durch einen akustisch-optisch steuerbaren Filter geteilt. Es wurde ausschließlich das 63x/NA 1.4 Öl-Immersion-Objektiv verwendet (*Immersol-518F*, Zeiss). Die Bildstapel wurden in einer axialen Schrittweite von 203 nm. Die lateralen x/y-Pixelgröße richten sich nach dem verwendeten Zoom und betragen bei einem digitalen Zoom von 4 78 nm.

2.9.2 Spatially Modulated Illumination (SMI) Microscop

Der zu untersuchende Objektträger wird für die Messung in einer Aluminiumhalterung befestigt, welches auf einem piezoelektronisch-verstellbaren Tisch befestigt wird. Dieser

Tisch befindet sich wiederum auf einer temperaturstabilen Objektisch-Verschiebeeinheit. Der piezotisch-verstellbare Tisch hat die Aufgabe, das Objekt zwischen den einzelnen Aufnahmen mit hoher Präzision um jeweils einer definierten Strecke exakt zu verschieben. Dieses *optical sectioning* ermöglicht die Erstellung eines dreidimensionalen Bildstapels, in dem in axialer Richtung aufeinanderfolgend und mit definiertem Abstand zweidimensionale Bilder des mit Fluorophoren markierten Objekts aufgenommen werden. Alle Pixel in den jeweiligen Bildebenen werden gleichzeitig gemessen.

Für die Aufnahmen am SMI wurde das Programm *PySMI* (von David Baddeley) verwendet. Es wurden die Laserlinien 488 nm und 568 nm in die gegenüberliegenden 100x/NA 1.4 Öl-Objektive eingekoppelt. Die Schrittweite der axialen Bildaufnahme betrug 40 nm. Die Integrationszeiten wurden den Objekten angepaßt und lagen im Bereich von 100 ms bis 300 ms. Zur Verringerung der Datengröße wurde mit *binning* gemessen (Pixel $x/y = 107$ nm). Zur Kalibrierung der Modulationstiefe des Wellenfeldes wurden zu Beginn jeder Messung 100 nm Beads der jeweiligen Laserlinie aufgenommen.

2.10 Bildauswertung

Die Algorithmen zur Auswertung der konfokalen Bilddaten hinsichtlich der Zellkernvolumina und Ausdehnungen entsprechend der drei Achsen wurden von Dr. Gregor Kreth entwickelt und ausgeführt. Die verwendeten Skripte zur Auswertung der lateralen Ausdehnung und Anisotropie basierend auf konfokalen Daten sowie die Bestimmung der Modulationstiefe MT und der axialen Ausdehnung von Beads und subchromosomalen Domänen basierend auf SMI-Bilddaten wurden von David Baddaley entwickelt und in MatLabTM 7.01 implementiert. Die radialen Positionen und die Distanzen der Domänen wurden von Stefan Stein ausgewertet [76].

2.10.1 Volumen und Ausdehnung von Zellkernen

Der Messung des Volumens, der axialen (z -Achse) und der lateralen (bei Fibroblasten x =kurze Achse, y =lange Achse) Ausdehnung der Zellkerne liegt eine 3D-Segmentierung nach iterativer Bestimmung des Schwellwertes der Zellkern-Gegenfärbung zugrunde. Vor

der Segmentierung wurde zur Reduzierung des Rauschens und zur Verringerung ausgefranzter Ränder ein 1×3 und ein 3×1 Binomialfilter in lateraler Richtung auf jeden konfokalen Schnitt des Bildstapels angewendet. Die Segmentierung erfolgte dann unter Ausnutzung der 26er-Nachbarschaft, wobei alle Voxel des Bildstapels mit Intensitäten größer als ein globaler Schwellwert auf ihre Verbindung zu anderen Voxel überprüft und zur 3D-Rekonstruktion des Zellkerns zusammengesetzt wurden. Voxel mit Intensitäten kleiner als dem Schwellwert werden auf Null gesetzt und dem Hintergrund zugeordnet.

Die Ermittlung des entsprechenden Schwellwertes erfolgte für jeden Bildstapel automatisch durch einen iterativen Prozess [16]. Dabei wird als erster Schätzwert des Schwellwertes, der Mittelwert des Intensitätshistogramms des 3D-Bildstapels oder mindestens eins angenommen. Anschließend wird der Mittelwert zwischen null und dem ersten Schätzwert (mindestens 1) als dem Hintergrund zugehörig betrachtet. Der Mittelwert zwischen diesem ersten Schätzwert und 255 wird dem Objekt zugeordnet. Der zweite Schätzwert wird dann durch ein bestimmtes Verhältnis zwischen Hintergrund und dem Mittelwert des Objektbildes berechnet. Die Konvergenz dieses Verfahren ist erreicht, wenn der darauffolgende Schätzwert sich innerhalb eines bestimmten Intervalls nicht von dem vorherigen unterscheidet. Die Segmentierung des Zellkerns erfolgt dann mit diesem Schwellwert.

In dieser Arbeit wurden die Zellen als Suspensionspräparat auf die Objektträger getropft bzw. sind adhärent gewachsen, woraus sich eine nahezu parallele Orientierung der kürzesten Symmetrieachse der Zellen mit der optischen Achse (z -Richtung) ergibt. Damit konnte die axiale Ausdehnung (z -Achse) der Zellkerne durch Bestimmung des maximalen Abstandes, den zwei Ebenen in dieser Richtung aufweisen, berechnet werden. Das Kernvolumen ergibt sich aus der Anzahl der segmentierten Voxel multipliziert mit dem Volumen eines Voxels. Da die xy -Orientierung (lateral) der Zellen auf dem Objektträger beliebig sein kann, wurde zur Bestimmung der kleinsten und größten Ausdehnung entlang der Symmetrieachse des Zellkerns die Hauptträgheitsachsen in 2D ermittelt. Dazu wurde die folgende Matrix der axialen Projektion des segmentierten Kerns bestimmt:

$$I = \sum_i \begin{pmatrix} y_i^2 & -x_i y_i & 0 \\ -y_i x_i & x_i^2 & 0 \\ 0 & 0 & x_i^2 + y_i^2 \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

Die Einträge aller segmentierten Voxel werden summiert. Die Koordinaten werden relativ zum Schwerpunkt bestimmt. Nach Diagonalisierung der Matrix entsprechen die ersten beiden Diagonaleinträge den Hauptträgheitsmomenten I_a und I_b des segmentierten Objekts in 2D. Bis auf einen Normierungsfaktor ergeben sich damit die Halbachsen a, b des Trägheitsellipsoids zu:

$$a = \frac{\textit{konst.}}{\sqrt{I_a}}, \quad b = \frac{\textit{konst.}}{\sqrt{I_b}}, \quad \textit{ratio} = \frac{a}{b} \quad (2.2)$$

Mit dem Verhältnis der beiden Halbachsen und der aus der Projektion bestimmten Fläche A des segmentierten Objektes ergibt sich mit der Gleichung für die Fläche eines Ellipsoids die Halbachse b zu:

$$b = \sqrt{\frac{A}{\pi * \textit{ratio}}} \quad (2.3)$$

Die andere Halbachse ergibt sich dann aus *ratio* Gleichung 2.2.

2.10.2 Laterale Ausdehnung und Anisotropie subchromosomaler Domänen

Zur Bestimmung der Volumina großer Objekte, wie beispielsweise Zellkerne, ist das Setzen von globalen Schwellwerten eine sehr gute Methode zur Diskriminierung des Objektes, vor allem wenn es, wie bei 2.10.1 automatisiert erfolgt. Schwellwertsetzungen führen immer zu einer reduzierten Genauigkeit der Größenmessung. Für Objekte, deren

Größe im nm-Bereich liegen, werden die Daten durch Schwellwertsetzung unbrauchbar. Hinzu kommt, dass das Setzen von Schwellwerten starker Subjektivität unterworfen ist. Bei diesen kleinen Objektgrößen ist es außerdem nötig, die PSF bei der Auswertung zu berücksichtigen, die bei dem hier verwendeten CLSM lateral mit 250 nm und axial mit 600 nm angenommen wurden.

Das hier verwendete *multi point model* wurde von David Baddeley entwickelt und wird bei [4] und [3] im Detail beschrieben. Dieses nicht-Schwellwertbasierte Model zur Größenabschätzung sieht das Objekt als Summe einer finiten Anzahl diskreter, gleich heller Punkte. Jeder der Punkte wird als Kopie der gerätespezifischen PSF (Abbildung 2.2) abgebildet:

$$I(\mathbf{r}) = \sum_i A \cdot I_{PSF}(\mathbf{r} - \mathbf{s}_i) \quad (2.4)$$

Die Intensität des Voxels am Ort r wird durch dem Ausdruck 2.4 beschrieben, wobei A die Intensität der einzelnen Punkte, \mathbf{s}_i die Position der jeweiligen Punkte und I_{PSF} die Punktbildfunktion darstellen. Wenn man eine Gauß-förmige PSF annimmt, erhält man aus 2.4 folgenden Ausdruck:

$$I(x, y, z) = A \sum_i e^{-\frac{x_i^2}{2\sigma_{xy}^2} - \frac{y_i^2}{2\sigma_{xy}^2} - \frac{z_i^2}{2\sigma_z^2}} + c \quad (2.5)$$

wobei σ_{xy} und σ_z die laterale und axiale Breite repräsentieren. Für das verwendete CLSM wurde eine laterale Auflösung von 250 nm und eine axiale von 600 nm angenommen bei 488 nm Anregungswellenlänge. Für andere Wellenlängen erfolgt eine Skalierung. Die Orte (x_i, y_i, z_i) werden ermittelt, indem man die Gleichung 2.5 an die Bilddaten angepaßt. Die freien Parameter des Fitmodels sind in dem Faktor A , dem konstanten *offset* c und den Positionen der individuellen Punkte (x_i, y_i, z_i) enthalten. Aus den durch den Fit

berechneten Positionen der Punkte im Objekt wird dann der geometrische Schwerpunkt des Objekts ermittelt und die mittlere Distanz der Punkte zu diesem Objektschwerpunkt durch

$$\bar{r} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_i| \quad (2.6)$$

kalkuliert, wo r_i die Distanz zwischen den einzelnen Objekten und dem Objektschwerpunkt ist. Da die mittlere Distanz nicht mit gängigen Größen vergleichbar ist, werden diese berechneten mittlere Distanzen der Punkte zum Objektschwerpunkt mit der Standardabweichung einer Gauß-förmigen Verteilung in Zusammenhang gebracht. Für den eindimensionalen Fall wird dieses wie folgt berechnet:

$$\bar{r}_{Gauss} = \frac{\int_0^{\infty} x \cdot e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} dx}{\int_0^{\infty} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \cdot dx} = \frac{2\sigma}{\sqrt{2\pi}} \quad (2.7)$$

Da $\bar{r}_{Gauss}(\sigma)$ in Bezug zu $\sigma(\bar{r}_{Gauss})$ steht, kann aus der ermittelten mittleren Distanz der Punkte aus der Gleichung 2.6 die Standardabweichung der angenommenen Gauß-Verteilung berechnet werden, indem \bar{r} in die Gleichung 2.7 eingesetzt und nach σ aufgelöst wird. In zwei bzw. drei Dimensionen gibt es ein ähnliches Verhältnis. Allerdings verändert sich der resultierende Faktor geringfügig. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, werden zweidimensional berechnet. Jedoch wurde ein irrtümliches Verhältnis von $\sigma = \bar{r}$ benutzt. Dies kam durch ein Versehen im benutzte Programmcode zu stande. Das korrekte Verhältnis wäre $\sigma \approx 1.128\bar{r}$ gewesen, was aber nur eine kleine Skalierung der Ergebnisse zu Folge haben würde und nur beim Vergleich mit externen Messungen, wie z.b. die Größe von Beads, Bedeutung hat. Aus der, unter Verwendung von \bar{r} , ermittelten Standardabweichung der angenommenen Gauss-Verteilung erfolgt dann die Berechnung des FWHM wie folgt:

$$FWHM = 2 \cdot \sqrt{-2 \ln\left(\frac{1}{2}\right)} \cdot \sigma = 2.355 \cdot \sigma \quad (2.8)$$

Die Anzahl der verwendeten Punkte für das Modell richtet sich nach der Größe des Objektes. Prinzipiell erhöht sich mit der Anzahl der Punkte auch die Dauer der Berechnung und der Einfluss von Rauscheffekten tritt mehr in den Vordergrund. Für kleine Objekte, wie z.B. Beads und einige Gene, sind fünf Punkte ausreichend. Zehn Punkte sind für größere Objekte, wie z.B. subchromosomale Domänen, besser geeignet und wurden in dieser Arbeit eingesetzt. Da für die Berechnung der FWHM für biologische Objekte die Annahmen des Modells eingeflossen sind, wird im Folgenden die Bezeichnung *TP-FWHM* anstelle der theoretischen FWHM für ein Gauß-förmiges Objekt verwendet. *TP-FWHM* stellt somit einen Parameter für die laterale Ausdehnung des Objektes dar, was mittels des *ten point models* ermittelt wird.

Zusätzlich wurde als Parameter der Form die Anisotropie des Objektes bestimmt. Dazu wurde die Positionsverteilung der Haupt- und die Nebenachse des Objekts bestimmt und in diese zwei Achsen projiziert. Die Anisotropie ist dann das Verhältnis aus der Standardabweichung der Position entlang der beiden Achsen (xy).

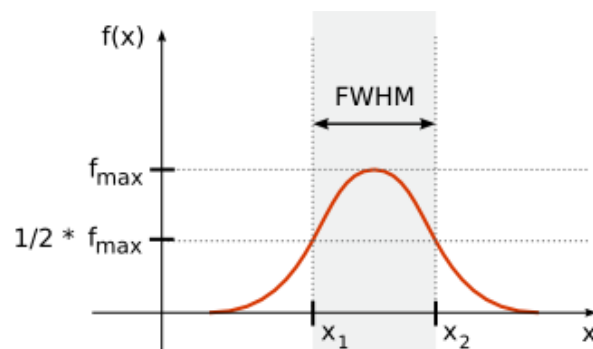


Abbildung 2.1: *full width at half maximum*

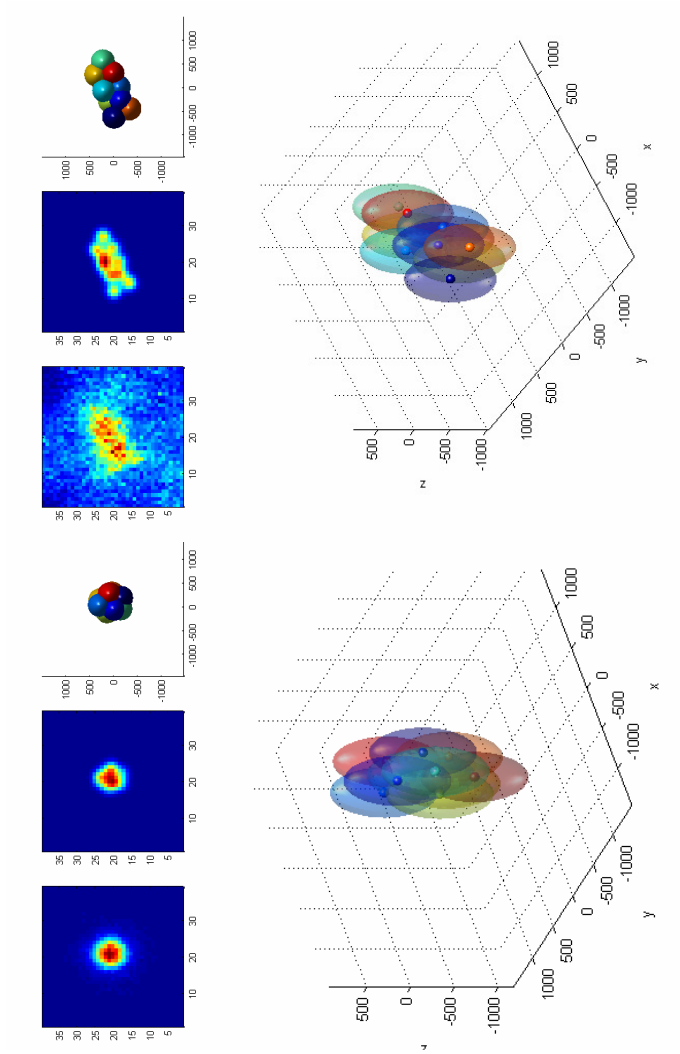


Abbildung 2.2: *ten point model* am Beispiel eines 560 nm Beads (links) und des Centromer 9 (rechts)

2.10.3 Relative radiale Position subchromosomaler Domänen

Zur Messung der Topologie von mittels FISH markierter subchromosomaler Domänen innerhalb des Interphase-Zellkerns wurde der Parameter der relativen radialen Position (RRP) verwendet. Üblicherweise erfolgt die Ermittlung der radialen Position schwerpunkt-basiert, vom Kernschwerpunktinneren zum Rand, was bei optimal sphärischen Kernen, wie Lymphozyten, sehr gut anwendbar ist. Nachteil dieser Methode ist, dass, wenn die Objekte nicht sphärisch sind, die radialen Streckenverhältnisse trotzdem auf einer Einheitskugel abgebildet und berechnet werden. Dadurch ergeben sich unter Umständen falsch-positive Unterschiede. Außerdem kommt es bei sehr flachen Zellkernen, was bei Fibroblasten der Fall ist, zu einer Verzerrung der Position entlang der großen Halbachse, was folglich den Abstand zum Schwerpunkt vergrößert. In dieser Arbeit wird deshalb eine von Dr. S. Stein neu eingeführte randbasierte, radiale Positionsbestimmung verwendet, da hauptsächlich Fibroblasten-Zellkerne auszuwerten waren und diese ellipsoid geformt sind. Ein Vorteil bei dieser Methode ist, dass sie auch auf runde Objekte anwendbar ist, dh. universell einsetzbar ist. Bei der randbasierten Positionierung wird der Zellkernrand als Bezugspunkt gewählt.

In der Abbildung 2.3 ist das grundlegende Prinzip dargestellt. Die radial (orthogonal) von einem Punkt P_i auf der Oberfläche ausgehenden Strecken werden in Segmente Δn_m mit $m=1, \dots, j$ unterteilt. In dieser Arbeit ist $m=5$, also jeweils 20 %. Die Länge der Segmente ist in alle Richtungen gleich $\Delta n_2 = \Delta n_1$. Damit haben Segmente mit dem gleichen m den gleichen Abstand zum Rand (**a**). Verbindet man die vom Rand äquidistanten Punkte, dann ergeben sich Isolinien bzw. Isoflächen, die alle Punkte mit gleichem Abstand zum Rand beinhalten (**b**). $dist_{max}$ ist die maximale Minimaldistanz und entspricht der Normierung auf 100 %. Daraus ergibt sich dann eine radiale Position von 0 % für die innere und 100 % für die randständige Position. [76]

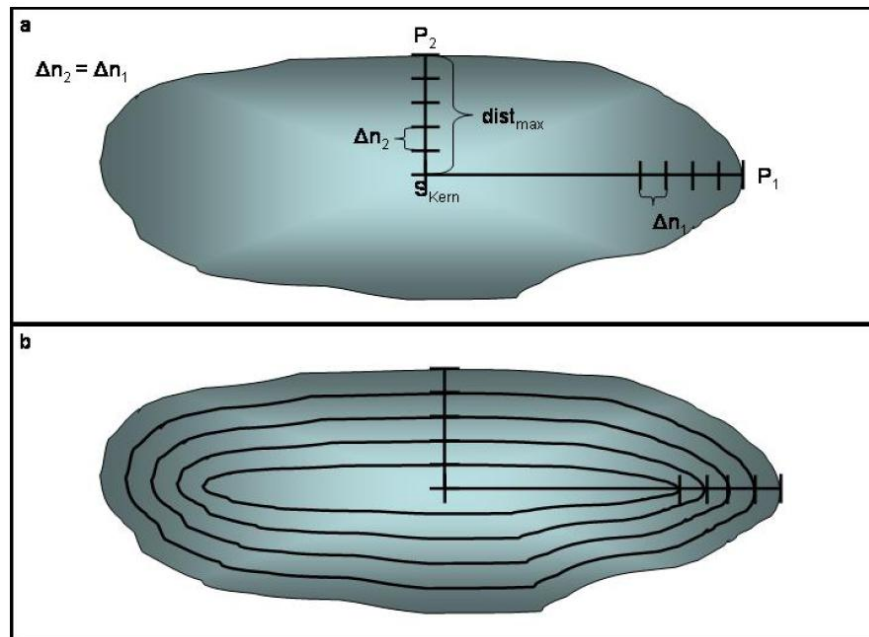


Abbildung 2.3: Randbasierte relative radiale Position
[76]

2.10.4 Distanz zwischen subchromosomalen Domänen

Die Berechnung der absoluten euklidischen Distanz zwischen zwei subchromosomalen Regionen erfolgt anhand der Intensitätsschwerpunkte der beiden segmentierten Chromatinregionen, hier als P und O bezeichnet.

$$dist_{\text{euklid}}(P | O) = \sqrt{(P_1 - O_1)^2 + (P_2 - O_2)^2 + (P_3 - O_3)^2} \quad (2.9)$$

Wird zusätzlich der Schwerpunktwinkel zwischen den beiden Regionen ermittelt, so sind außerdem die absoluten euklidischen Distanzen der beiden Intensitätsschwerpunkte zum Schwerpunkt des Zellkernes zu berechnen. Aus den drei Distanzen läßt sich nun mittels Kosinussatz der Schwerpunktwinkel berechnen.

Bei der Verwendung von absoluten Distanzen ist zu beachten, dass eine Veränderung der Zellkernform eine Veränderung der Lage der Objekte und somit eine Veränderung der absoluten Distanzen hervorrufen kann. Aus diesem Grund sind Änderungen der absoluten Distanzen immer in Zusammenhang mit einer Veränderung der Zellkernform zu betrachten. Werden die Distanzen in Zellkernen mit gleicher Form untersucht, so kann aus einer Veränderung der absoluten Distanz ein direkter Zusammenhang mit der biologischen Funktion hergestellt werden.

2.10.5 Modulationstiefe und axiale Ausdehnung

Bei der SMI-Mikroskopie wird ein, durch Interferenz einer stehenden Welle angeregtes, Fluoreszenzsignal ausgewertet, welches im Belichtungsfeld (Objektraum) von zwei, durch gegenüberliegende Objekte, eingekoppelte (aufeinander zulaufende) Laserstrahlen entsteht. Durch diese Mikroskopietechnik können Objektgrößen bis annähernd $1/20$ der Anregungswellenlänge bestimmt werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die Objekte ausreichend klein und sphärisch sind sowie eine homogene Fluorophorverteilung aufweisen. Wird das zu untersuchende Objekt im Anregungsfeld zwischen den Objektiven entlang der optischen Achse in bestimmten Abschnitten (hier 40 nm) durchfahren, wird Fluoreszenz mit sinkender und steigender Intensität detektiert. Diese axiale Intensitätsschwankungen infolge des interferierenden Anregungslichtes im Objektraum resultiert in einer sogenannten axialen Intensitätsverteilung (AID, *axial intensity distribution*). Aus der Verteilung der detektierten Fluoreszenz ist es möglich, Informationen, zum Beispiel über die Größe von Objekten, zu extrahieren. Die AID eines Objekts im SMI-Mikroskop wird durch

$$AID(z) = \text{sinc}^2\left(\frac{z - z_0}{B}\right) \cdot \left[A_1 \cdot \cos^2\left(\frac{z - z_1}{C}\right) + A_2 \right] + I_H \quad (2.10)$$

beschrieben [33]. Dabei geben A_1 die Amplitude der Modulation und A_2 den Maximalwert der inneren, eingehüllten Amplitude an. B und z_0 geben die Breite und die Position der äußeren Amplitude an, während z_1 mit der Phase (Position des Wellenzuges) und C mit dem Wellenfrontabstand verbunden sind. I_H beschreibt die Intensität des Hintergrundes. Aus dem Intensitätsverhältnis der inneren und der äußeren Amplitude der

AID kann dann die Modulationstiefe MT wie folgt bestimmt werden:

$$MT := 1 - \frac{I_{min}}{I_{max}} = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} \quad (2.11)$$

wobei I_{min} das Maximum der inneren und I_{max} das Maximum der äußeren einhüllenden Kurve darstellt. In der Abbildung 2.4 ist die Modulationstiefe gegen die Größe kugelförmiger, homogen gefärbter Objekte mit bekanntem Durchmesser aufgetragen, die ihr Anregungsspektrum bei 488 nm haben. Aus dieser (Kalibrations-)Kurve kann, bei bekannter Modulationstiefe, die axiale Ausdehnung der Farbstoffverteilung für homogen gefärbte, sphärische Objekte unbekannter Ausdehnung berechnet werden.

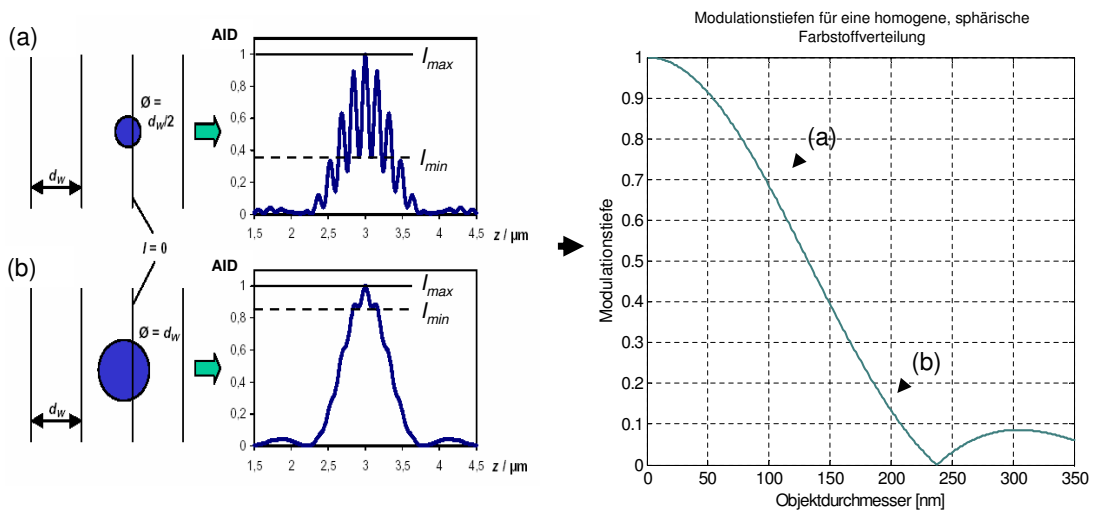


Abbildung 2.4: Zusammenhang zwischen Modulationstiefe und einer kugelförmigen, homogenen Farbstoffverteilung ($\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$) nach [39]

Der Zusammenhang zwischen axialer Größe und der Modulationstiefe wird ebenfalls in der Abbildung 2.4 sichtbar. Links von der Modulationskurve ist beispielhaft ein kleines (a) und ein großes (b) Objekt gezeigt, wobei der Objektdurchmesser in (a) die Hälfte ($\varnothing = d_w/2$) und in (b) gleich ($\varnothing = d_w$) die Breite des Wellenfeldes ist. In Anbetracht von

I_{max} und I_{min} bedeutet dies für (a), dass dieses Objekt eine Modulationstiefe von ≈ 0.7 hat, was der Größe eines 100 nm Bead entspricht. Größere Objekte, wie beispielsweise (b), zeigen eine geringe Modulationstiefe, was sich in einer größeren Größe widerspiegelt. Ab einer Modulationstiefe von 0.1 können keine vertrauenswürdigen Größenmessungen durchgeführt werden, da Objekte dann mehreren Stellen der Modulationskurve zugeordnet werden können.

2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Verteilung von zwei Datensätzen wurde der sogenannte **Kolmogorov-Smirnov-Test** (Kolgoroff-Smirnoff-Test, KS-Test) verwendet. Dieser Test prüft die Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Das kann ein Vergleich der Verteilungen zweier Stichproben sein, aber auch der Test darauf, ob eine Stichprobe einer zuvor angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt. Ein großer Vorteil dieses Tests besteht darin, dass die zugrundeliegende Zufallsvariable keiner Normalverteilung folgen muß. Um zwei empirische CDFs (*cumulative distribution function*) $S_M(x)$ und $S_N(x)$ mit den Stichprobengrößen M und N miteinander zu vergleichen, benutzt der Kolmogorov-Smirnov Test die Distanz D_{MN} :

$$D_{MN} = \max_x \left| \frac{S_M(x)}{M} - \frac{S_N(x)}{N} \right| \quad (2.12)$$

Die statistische Auswertung der Datensätze erfolgte mittels MatLab7.0.1.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

Der Einfluss der Fixierung und der Hybridisierung auf die Morphologie von Interphase-Zellkernen wurde an Lymphozyten, normalen humanen Vorhautfibroblasten VH7 sowie an der fibroblastoiden Prostatakrebszelllinie LNCAP untersucht. Dazu wurde das Volumen, die axiale Ausdehnung sowie die Anisotropie (Parameter für die laterale (x/y) Ausdehnung) der Kerne statistisch ausgewertet.

3.1.1 Lymphozyten

Die Tabelle 3.1 gibt eine Zusammenfassung der ermittelten Werte der Parameter zur Charakterisierung der Lymphozytenkerne nach der Fixierung sowie nach der FISH-Behandlung wieder. In der Abbildung 3.1 sind Beispiele der Kerne vor und nach FISH der beiden Fixierungen gezeigt. In der Abbildung 3.2 sind die kumulativen Häufigkeiten der Volumina der Zellkerne aufgetragen. Die hypotonen (+KCl) MAA-fixierten Zellkerne vor FISH haben ein mittleres Volumen von $624 \pm 228 \mu\text{m}^3$, signifikant um den Faktor 1.22 kleiner als die nicht KCl-behandelten Kerne der MAA-Präparation ($p=0.0111$). Das mittlere Volumen der MAA-fixierten Zellkerne ohne KCl und ohne Hybridisierung beträgt $764 \pm 286 \mu\text{m}^3$. Das Volumen der beiden Varianten der MAA-Fixierung verringert sich jeweils signifikant durch die Hybridisierungsprozedur, mit KCl um den Faktor 1.22 auf $511 \pm 94 \mu\text{m}^3$ ($p=0.0014$) und ohne KCl um den Faktor 1.12 auf $681 \pm 156 \mu\text{m}^3$ ($p=0.0095$) im Vergleich zu vor der Hybridisierung. Das Volumen der Kerne der nicht-hypotonen MAA-Fixierung nach FISH ist, wie bei den Kernen der MAA+KCl und der MAA-KCl vor FISH, um den Faktor 1.25 größer als bei der hypotonen MAA-Fixierung.

3 Ergebnisse

FISH v/n	MAA +KCl	MAA	PFA	MAA+KCl/MAA	SD (Faktor) MAA+KCl/PFA	MAA/PFA
Volumen [μm^3]						
vor	624 \pm 228	764 \pm 286	444 \pm 143	$p=0.0111$ 0.82	$p=3.3787e-004$ 1.4	$p=1.8951e-007$ 1.72
nach	511 \pm 94	681 \pm 156	190 \pm 21	$p=1.8891e-007$ 0.75	$p=6.1544e-023$ 2.69	$p=3.229e-025$ 3.58
Faktor (v/n)	1.22	1.12	2.34			
SD	$p=0.0014$	$p=0.0095$	$p=1.7189e-017$			
Axiale Ausdehnung (z) [μm]						
vor	4,11 \pm 0,6	4,1 \pm 0,83	9,11 \pm 1,29	$p=0.084$ 1	$p=5.1564e-014$ 0.45	$p=3.7438e-014$ 0.45
nach	4,63 \pm 0,37	4,74 \pm 0,69	5,61 \pm 0,53	$p=0.1489$ 0.98	$p=8.9830e-015$ 0.82	$p=4.9799e-012$ 0.84
Faktor (v/n)	0.89	0.87	1.62			
SD	$p=1.0605e-007$	$p=0.0227$	$p=3.9483e-017$			
Anisotropie (xy)						
vor	1.07 \pm 0.08	1.05 \pm 0	1.05 \pm 0.07	$p=0.1868$ 1.02	$p=0.0184$ 1.02	$p=0.0554$ 1
nach	1.06 \pm 0.1	1.07 \pm 0.1	1.06 \pm 0.07	$p=8.1156e-004$ 0.99	$p=0.2301$ 1	$p=0.3001$ 1
Faktor (v/n)	1.01	0.98	0.99			
SD	$p=0.0543$	$p=0.1464$	$p=0.0279$			
Laterale Ausdehnung (x) [μm]						
vor	17,28 \pm 3,32	19,12 \pm 3,01	9,68 \pm 1,18	$p=0.1868$ 0.9	$p=2.3603e-011$ 1.78	$p=2.6175e-013$ 1.97
nach	15,14 \pm 1,75	19,58 \pm 2,56	8,5 \pm 0,7	$p=1.1438e-015$ 0.77	$p=4.7935e-022$ 1.78	$p=3.2290e-025$ 2.31
Faktor (v/n)	1.14	0.98	1.14			
SD	$p=1.6894e-005$	$p=0.7353$	$p=4.3185e-008$			
Laterale Ausdehnung (y) [μm]						
vor	16,06 \pm 2,81	18,3 \pm 2,88	9,23 \pm 0,92	$p=0.0229$ 0.88	$p=3.7379e-012$ 1.74	$p=3.7438e-014$ 1.99
nach	14,37 \pm 1,52	18,41 \pm 2,56	7,98 \pm 0,47	$p=4.2482e-013$ 0.78	$p=6.1544e-023$ 1.8	$p=3.2290e-025$ 2.3
Faktor (v/n)	1.12	0.99	1.16			
SD	$p=2.9865e-005$	$p=0.6096$	$p=1.2755e-009$			

Tabelle 3.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von Lymphozyten

(Anzahl der Kerne siehe Abbildungen 3.2 bis 3.4)

Bei Formaldehyd-fixierten Zellkernen verringert sich das Volumen im Vergleich von vor FISH ($444 \pm 143 \mu\text{m}^3$) zu nach FISH ($190 \pm 21 \mu\text{m}^3$) signifikant um den Faktor von 2.34 ($p=1.7189e-017$) deutlich stärker als bei den beiden MAA-fixierten Zellsuspensionen. Die mittleren Volumina der Lymphozytenzellkerne beider MAA-Fixierungen vor FISH sind größer als die der PFA-Fixierung vor FISH (siehe Tabelle 3.1). Das Gleiche gilt für die Kerne nach der Hybridisierung, wobei auch deutlich wird, dass die Zellkerne der Lymphozyten, die mit Formaldehyd fixiert wurden, stärker an Volumen durch die Hybridisierungsschritte verlieren als die Methanol/Eisessig-fixierten Zellen.

Die Häufigkeiten der axialen Ausdehnung der Zellkerne von Lymphozyten sind in der Abbildung 3.3 zu sehen. Die mittlere axiale Zellkernausdehnung der MAA+KCl-fixierten Kerne vor der Hybridisierung beträgt $4,11 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Diese Ausdehnung entspricht der mittleren axialen Ausdehnung der nicht hypotonen Kerne vor der Hybridisierung von $4,1 \pm 0,83 \mu\text{m}$. Der KS-Test zeigt, dass keine signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Fixierungen vor FISH bestehen ($p=0.084$). Die PFA-fixierten Kerne vor FISH sind axial mit $9,11 \pm 1,29 \mu\text{m}$ doppelt so ausgedehnt wie die Kerne der MAA+KCl- ($p=5.1564e-014$) und der MAA- ($p=3.7438e-014$) Fixierungen. Bei den MAA+KCl-fixierten Zellen als auch bei den MAA-fixierten Kernen erhöht sich das Volumen nach der Hybridisierung signifikant im Vergleich zu vorher (MAA+KCl $4,63 \pm 0,37 \mu\text{m}$, $p=1.0605e-007$; MAA $4,74 \pm 0,69 \mu\text{m}$, $p=0.0227$). Nur bei der PFA-Fixierung kommt es zu einer Verringerung der axialen Ausdehnung um den Faktor 1.62 auf $5,61 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ($p=3.9483e-017$). Die Anisotropie der Lymphozytenzellkerne vor und nach FISH sind in der Abbildung 3.4 dargestellt. Unabhängig von der Fixierung sind die Kerne mit einer mittleren Anisotropie von 1.07 ± 0.08 für die MAA+KCl-fixierten Zellen, 1.07 ± 0.08 für die MAA-fixierten Zellen und 1.05 ± 0.07 für die PFA-fixierten Zellen rund. Die Hybridisierung verändert das Verhältnis zwischen den beiden lateralen Achsen bei den MAA-fixierten Kernen nicht. Beim Vergleich der Anisotropie zwischen den einzelnen Fixierungen wird ein signifikanter Unterschied zwischen der MAA+KCl- und der PFA-Fixierung nur vor der Hybridisierung deutlich ($p=0.0184$). Die Kerne der PFA-Fixierung sind sphärischer als die der MAA+KCl-Fixierung.

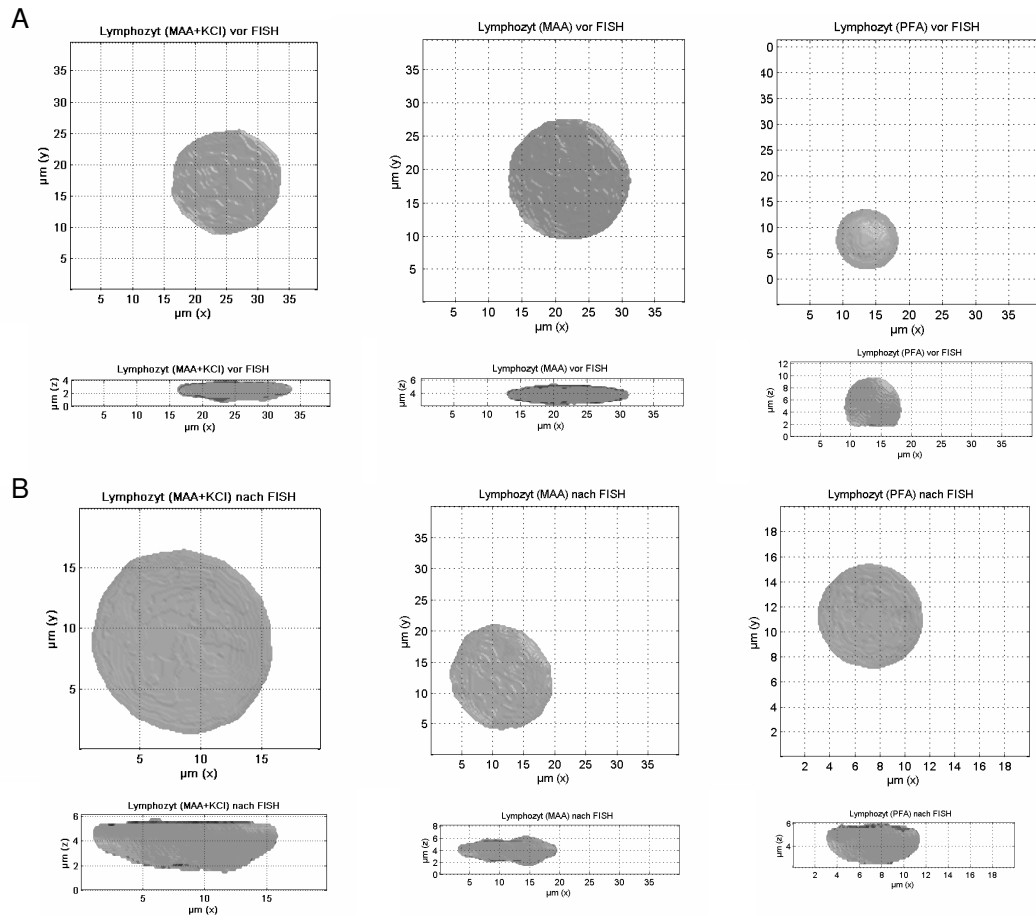


Abbildung 3.1: Visualisierung repräsentativer Zellkerne von Lymphozyten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung

A Vergleich der MAA- mit der PFA-Fixierung vor der Hybridisierung; **B** Vergleich der MAA- mit der PFA-Fixierung nach der Hybridisierung.

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

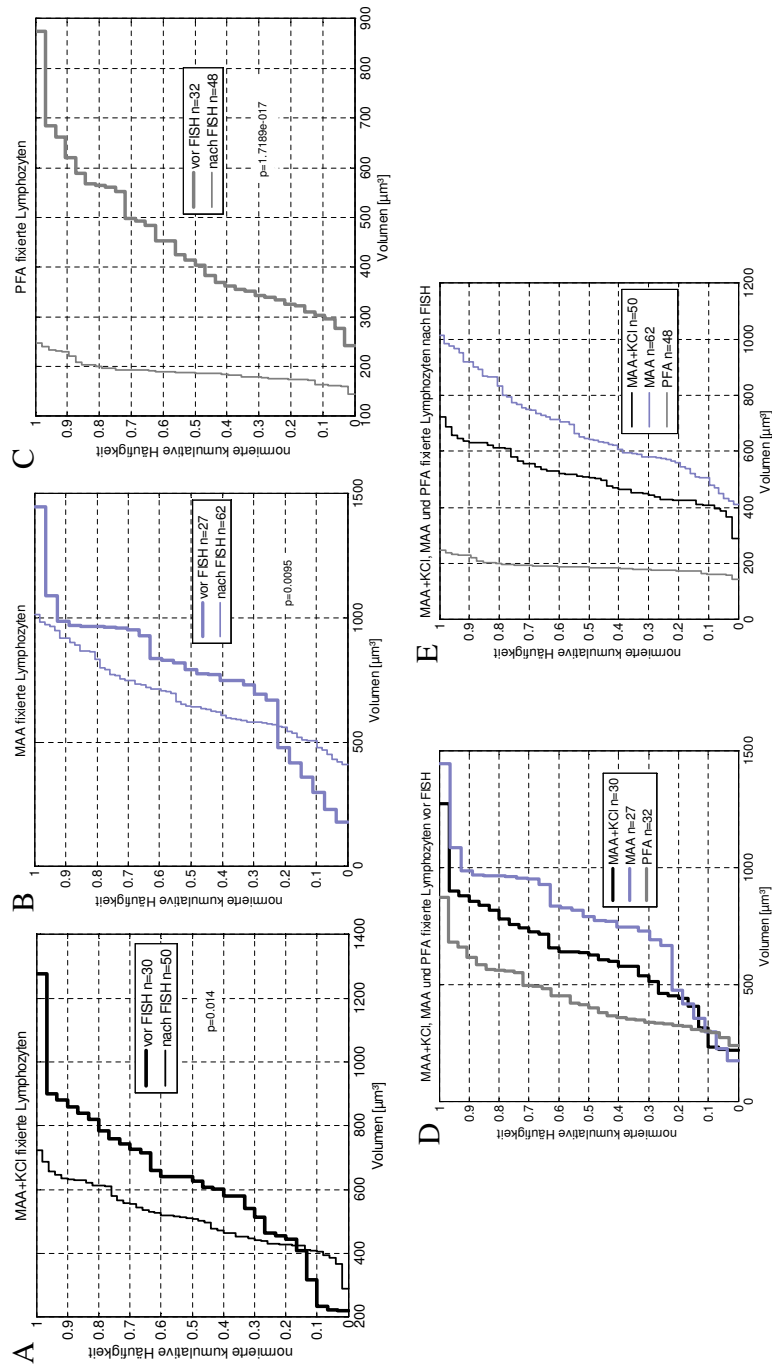


Abbildung 3.2: Volumen der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

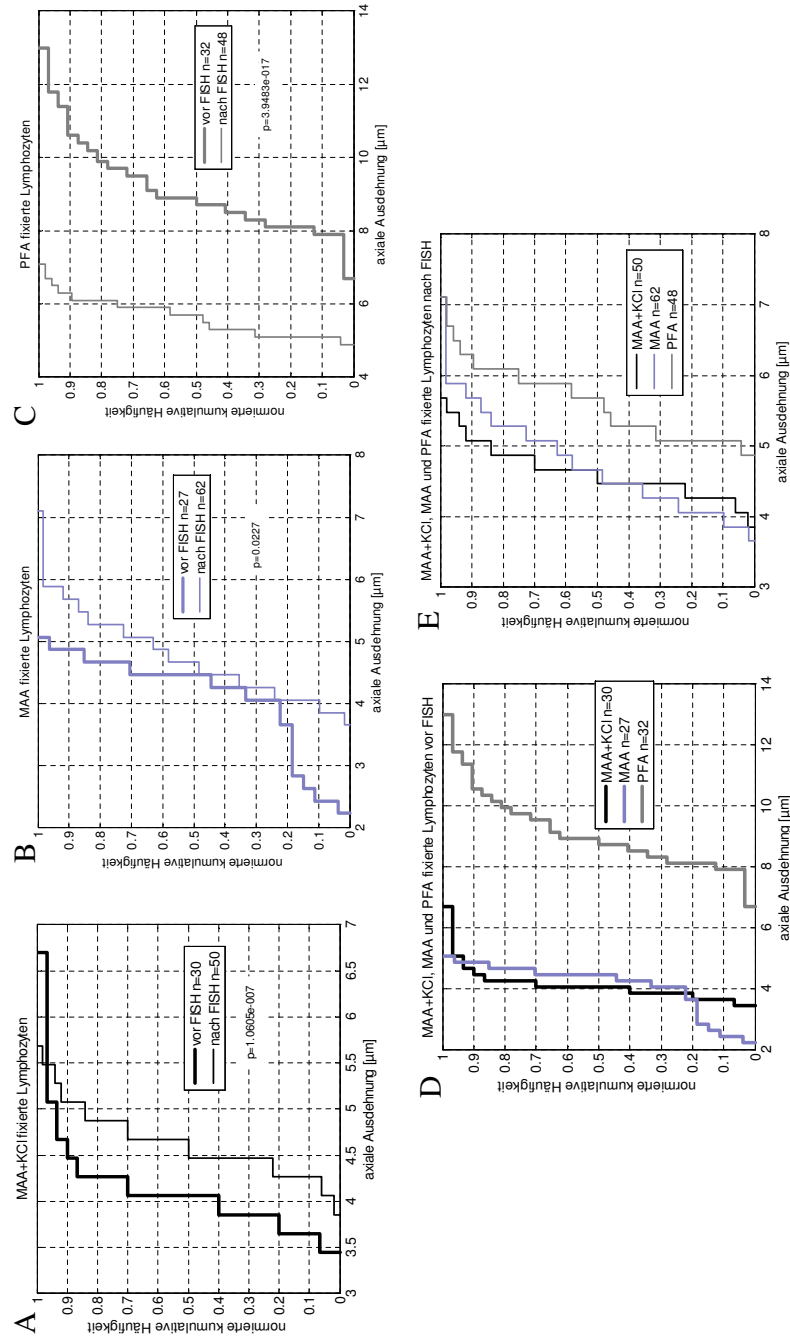


Abbildung 3-3: Axiale Ausdehnung der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

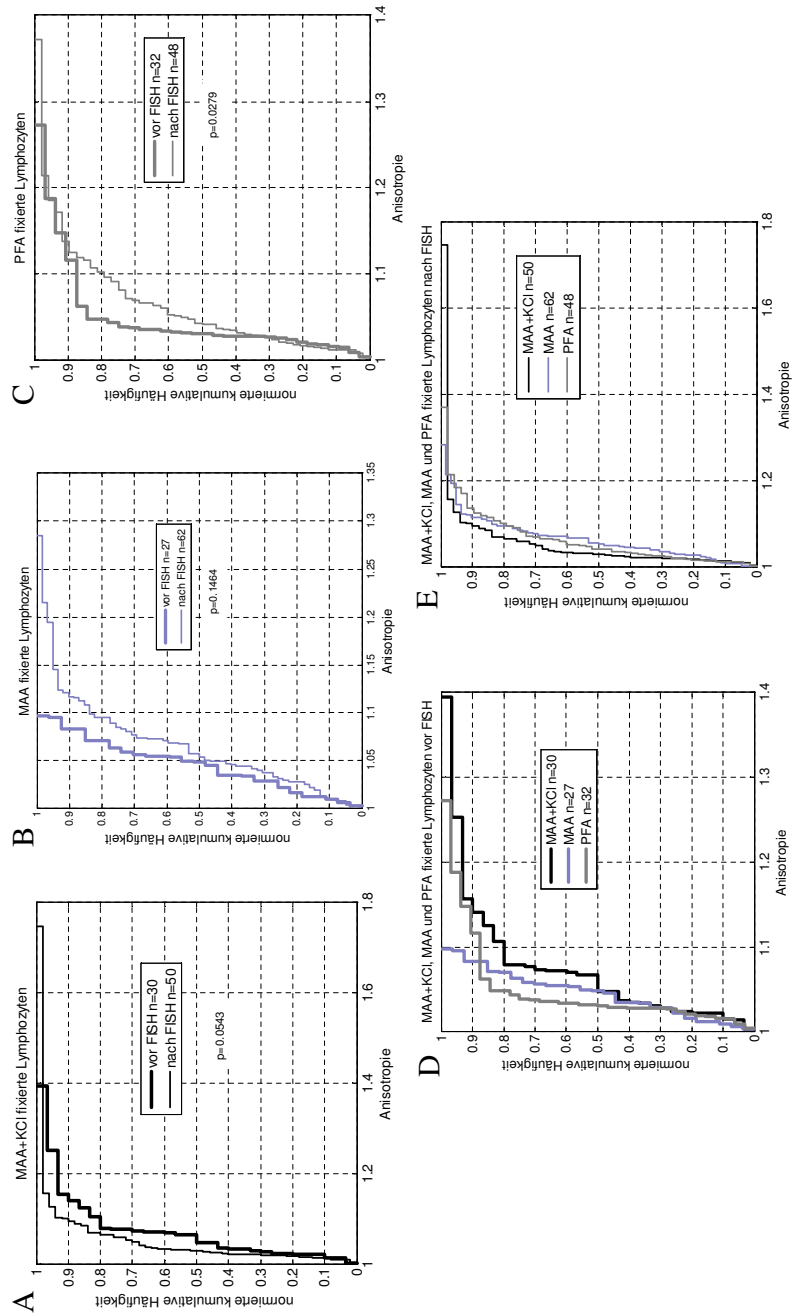


Abbildung 3.4: Anisotropie der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

3.1.2 VH7

Tabelle 3.2 zeigt die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen inklusive der Berechnung der Signifikanz der Parameter zur Bestimmung der Form der Kerne der VH7 Fibroblasten.

Abbildung 3.5 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion von VH7 Zellkernen in Abhängigkeit von der Fixierung und Hybridisierung. In der Abbildung 3.6 sind die Häufigkeiten der Volumina dargestellt.

Das mittlere Kernvolumen von Formaldehyd-fixierten Fibroblasten ohne FISH von $769 \pm 234 \mu\text{m}^3$ ist signifikant kleiner ($p=0.012$) mit einem Faktor von 1.2 als bei der Methanol/Eisessig-Fixierung, bei der ein mittleres Volumen von $918 \pm 280 \mu\text{m}^3$ bestimmt wurde. In Bezug auf die Beeinflussung der Hybridisierungsprozedur auf das Volumen der Kerne konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Das mittlere Volumen der mit FISH behandelten Kerne der MAA-Suspension beträgt $708 \pm 304 \mu\text{m}^3$.

Die MAA-fixierten Kerne sind signifikant 1.3 mal kleiner nach der Hybridisierung (vor/nach FISH $p=0.001$) im Vergleich zu vorher. Diese Beeinflussung durch die Hybridisierung trat in PFA-fixierten Kernen stärker auf. Diese hatten nach FISH ein mittleres Volumen von $442 \pm 99 \mu\text{m}^3$, welches 1.7 mal kleiner war als in den Kernen ohne FISH ($p=5.4295e-013$). Vergleicht man beide Fixierungen nach FISH, dann wird deutlich, dass die Formaldehyd-fixierten Kerne stärkeren Veränderungen unterliegen. PFA- und MAA-fixierte Zellkerne nach der FISH-Behandlung unterscheiden sich signifikant ($p=2.0898e-009$) um den Faktor 1.6.

Die kumulativen Häufigkeiten der axialen Ausdehnung der Interphasekerne in Abhängigkeit von der Fixierung und der Hybridisierung sind in der Abbildung 3.7 dargestellt. Die mittlere axiale Ausdehnung der MAA-fixierten Kerne der VH7 Fibroblasten beträgt $5,3 \pm 0,5 \mu\text{m}$. Es wurde eine signifikante Reduktion der axialen Ausdehnung durch die Hybridisierung mit einem mittleren Betrag von $4,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ gefunden. Die VH7 Zellkerne, fixiert mit Methanol/Eisessig, sind signifikant 1.2 mal flacher als die Kerne vor FISH

($p=9.5345e-008$). Dies ist vergleichbar mit den Messungen der Kernvolumina zuvor.

Die mittlere axiale Ausdehnung von PFA-fixierten Kernen ohne FISH-Behandlung beträgt $4,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Dagegen sind die behandelten PFA-fixierten Zellkerne mit einer mittleren Ausdehnung von $2,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$ signifikant (1.6 mal) flacher ($p=9.6352e-019$). Wenn man die Kerne hinsichtlich des Einflusses der Fixierung betrachtet und die Hybridisierung außen vorlässt, so sind die MAA-fixierten Kerne um den Faktor 1.2 dicker als die PFA fixierten ($p=1.6017e-009$). Vergleicht man die Kerne der beiden Fixierungen miteinander nach der FISH-Behandlung, dann kann man feststellen, dass die Kerne der PFA-Fixierung 1.6 mal dünner sind als die der MAA-Fixierung ($p=4.5012e-016$).

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der Kernform stellt die Anisotropie, das Verhältnis von langer zu kurzer lateraler Achse, dar. Für die VH7 Fibroblasten sind die kumulativen Häufigkeiten in der Abbildung 3.8 gezeigt.

Die mittlere Anisotropie der Methanol/Eisessig-fixierten Zellkerne ohne Hybridisierung beträgt 1.49 ± 0.16 und ist damit signifikant unterschiedlich ($p=0.0101$) zu den Kernen der selben Fixierung nach FISH mit einem Mittelwert von 1.61 ± 0.25 . Damit sind die Fibroblastenkerne ohne Behandlung weniger ellipsoid als die mit Behandlung. Kerne, welche mittels Formaldehyd fixiert wurden, zeigen die selbe Tendenz. PFA-fixierte Kerne ohne FISH mit einer mittleren Anisotropie von 1.47 ± 0.22 sind ebenfalls lateral ellipsoid ausgedehnt. Der KS-Test zeigt signifikante Unterschiede ($p=0.0306$) zwischen den PFA-fixierten Kernen vor mit denen nach FISH mit einem mittleren Anisotropiewert von 1.69 ± 0.4 . Bei dem Vergleich der beiden Fixierungen ohne FISH zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0.1125$). Auch beim Vergleich der beiden Fixierungen nach der Hybridisierung konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0.3833$). Damit hat die Hybridisierungsprozedur Einfluss auf die laterale Form von VH7 Fibroblasten, aber nicht die Art der verwendeten Fixierungsmethode.

3 Ergebnisse

FISH vor/nach	MAA	PFA	Faktor (MAA/PFA)	SD
Volumen [μm^3]				
vor	918 \pm 280	769 \pm 235	1.19	$p=0.0120$
nach	708 \pm 304	442 \pm 99	1.6	$p=2.0898e-009$
Faktor (vor/nach)	1.3	1.74		
SD	$p=0.001$	$p=5.4295e-013$		
Axiale Ausdehnung (z) [μm]				
vor	5,3 \pm 0,5	4,4 \pm 0,4	1.2	$p=1.6017e-009$
nach	4,4 \pm 0,7	2,7 \pm 0,5	1.63	$p=4.5012e-016$
Faktor (vor/nach)	1.20	1.63		
SD	$p=9.5345e-008$	$p=9.6352e-019$		
Anisotropie (xy)				
vor	1.49 \pm 0.16	1.47 \pm 0.22	1.01	$p=0.1125$
nach	1.61 \pm 0.25	1.69 \pm 0.4	1.05	$p=0.3833$
Faktor (vor/nach)	1.08	1.15		
SD	$p=0.0101$	$p=0.0306$		
Laterale Ausdehnung (x) [μm]				
vor	24,3 \pm 4	21,6 \pm 3	1.13	$p=5.5238e-004$
nach	22,9 \pm 4	22,8 \pm 2,8	1	$p=0.7231$
Faktor (vor/nach)	1.06	1.05		
SD	$p=0.0853$	$p=0.0351$		
Laterale Ausdehnung (y) [μm]				
vor	16,4 \pm 2,8	14,9 \pm 2,3	1.1	$p=9.0892e-004$
nach	14,3 \pm 1,9	13,9 \pm 2,4	1.03	$p=0.4628$
Faktor (vor/nach)	1.15	1.07		
SD	$p=3.8395e-004$	$p=0.0986$		

Tabelle 3.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von VH7 Fibroblasten

(Anzahl der Kerne siehe Abbildungen 3.6 bis 3.8)

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

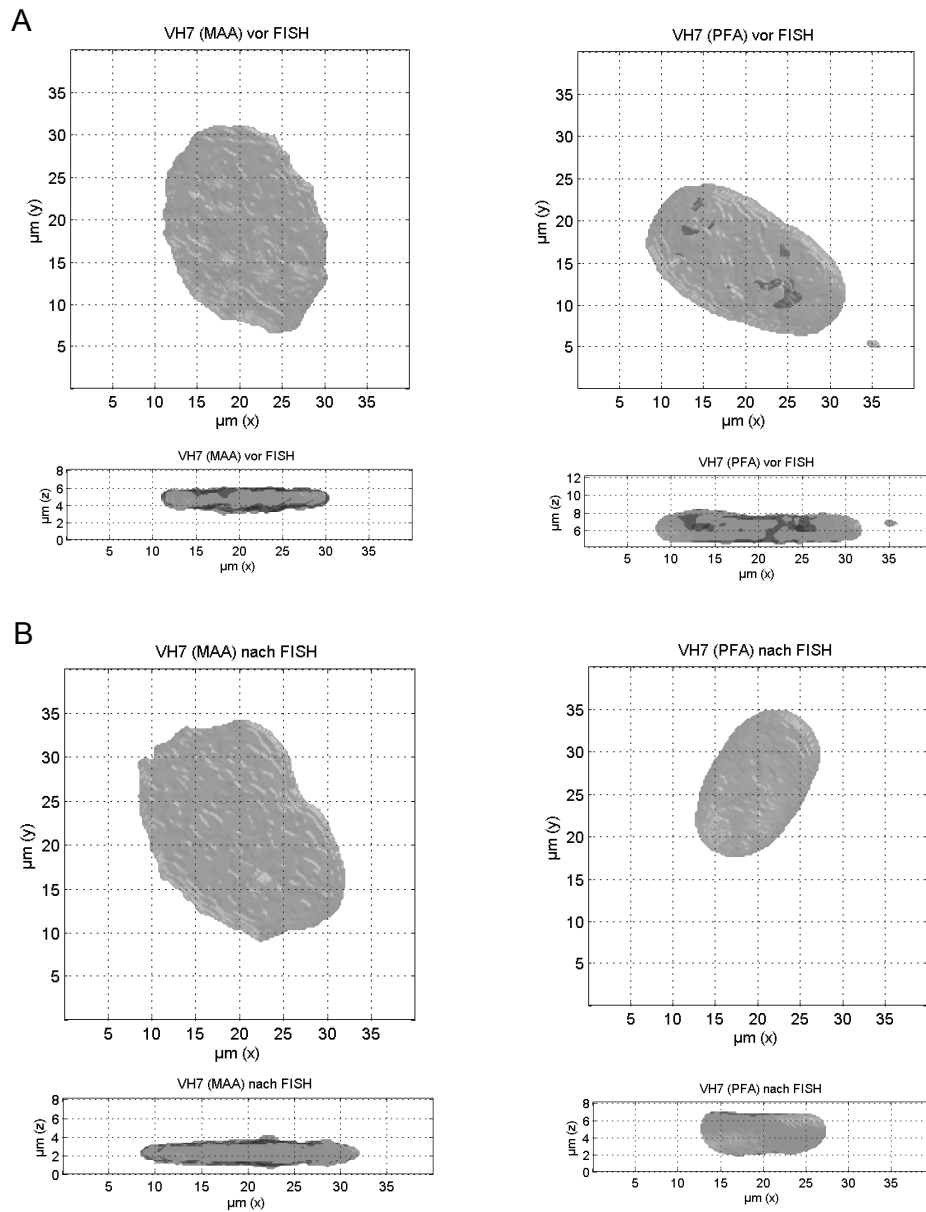


Abbildung 3.5: Visualisierung repräsentativer Zellkerne von VH7 Fibroblasten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung

A Vergleich der MAA- mit der PFA-Fixierung vor der Hybridisierung; **B** Vergleich der MAA- mit der PFA-Fixierung nach der Hybridisierung

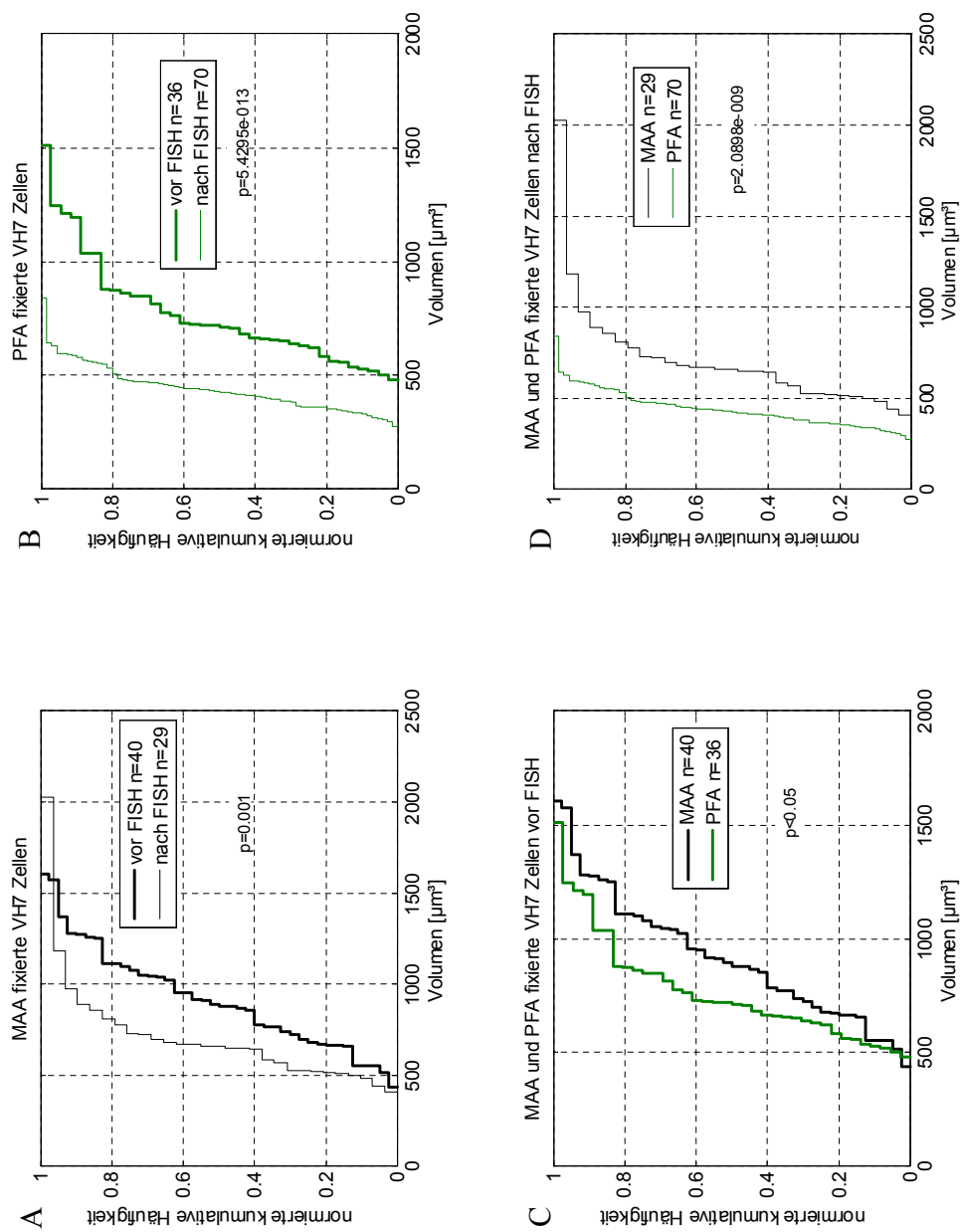


Abbildung 3.6: Volumen der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

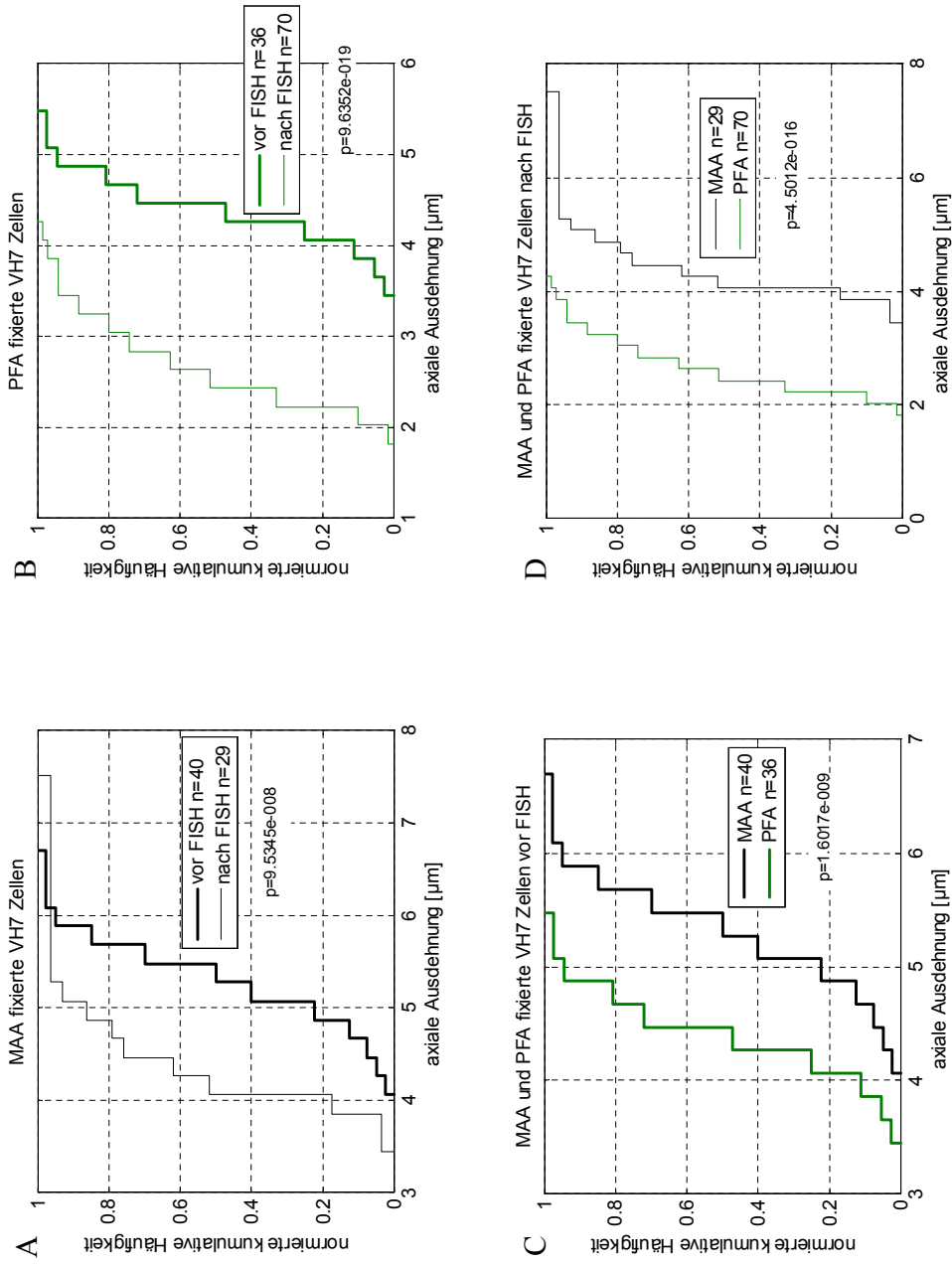


Abbildung 3.7: Axiale Ausdehnung der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

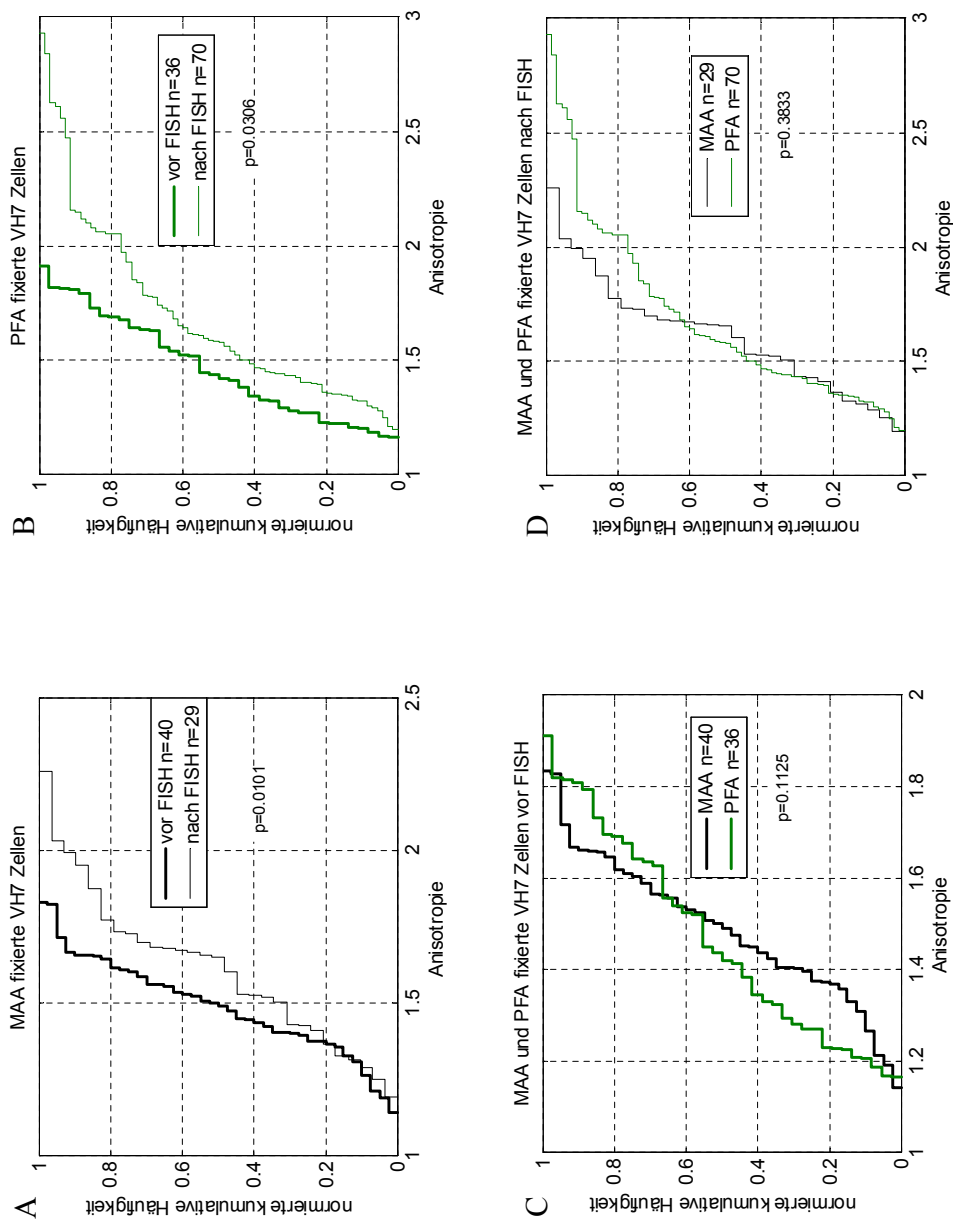


Abbildung 3.8: Anisotropie der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

3.1.3 LNCAP

Die fibroblastoiden LNCAP Zellen wurden als Methanol/Eisessig-Suspension mit und ohne KCl-Lösung (75mM) als auch als PFA-fixiertes Präparat verwendet. Eine Gegenüberstellung der Mittelwerte sowie der Standardabweichungen sind in der Tabelle 3.3 zu sehen.

Die in der Abbildung 3.9 dargestellten Zellkerne der verschiedenen Fixierungen vor und nach der Hybridierung machen die im Folgenden beschriebenen Änderungen der Volumina, der axialen Ausdehnung sowie der Anisotropie deutlich. Das Volumen, die axiale Ausdehnung sowie die Anisotropie der Zellkerne der fibroblastoiden Zelllinie LNCAP sind in den Abbildungen 3.10 bis 3.12 als kumulative Häufigkeiten dargestellt.

Das Volumen der Zellkerne, welche mit MAA fixiert und mit KCl hypotonisiert wurden, ist mit $1188 \pm 381 \mu\text{m}^3$ signifikant 1.27 mal größer als die MAA-fixierten Kerne ohne KCl mit einem mittleren Volumen von $933 \pm 338 \mu\text{m}^3$ ($p=0.0138$). Durch die Behandlung der Kerne bei der Hybridisierung werden die Kerne beider Suspensionen signifikant kleiner im Volumen (siehe Abbildung 3.10). Die Verringerung des Volumens durch die Hybridisierung ist allerdings bei den KCl-behandelten Kernen größer (Faktor 1.38) im Vergleich zu den nicht KCl-behandelten Kernen (Faktor 1.17). Die PFA-fixierten Kerne sind mit $1734 \pm 306 \mu\text{m}^3$ signifikant deutlich größer als die nicht-hypotonen MAA-fixierten ($p=1.3934e-010$) und die hypotonen MAA-fixierten Zellkerne ($p=5.1828e-006$). Das Volumen der PFA-fixierten Kerne verringert sich durch die Hybridisierungsprozedur ebenfalls um den Faktor 1.49 auf $1161 \pm 247 \mu\text{m}^3$. Im Vergleich zu den MAA-fixierten nach FISH betehen signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 3.3). Das mittlere Volumen der Kerne der PFA-Fixierung nach FISH entspricht dem mittleren Volumen der MAA+KCl-fixierten Kerne vor FISH.

Die axiale Ausdehnung der Zellkerne der MAA + KCl-Zellsuspension vor der Hybridisierung ($3,4 \pm 0,58 \mu\text{m}$) ist signifikant geringer ($p=1.7847e-008$) im Vergleich zu den nicht-hypotonen Kernen der LNCAP Zellen ($4,58 \pm 0,63 \mu\text{m}$). Der Vergleich zwischen den MAA + KCl fixierten Kernen vor FISH mit nach FISH zeigt signifikant keine

Unterschiede ($p=0.9995$). Bei den MAA nicht-hypotonen Zellen nach FISH liegt eine signifikante Verringerung der axialen Ausdehnung von $4,58 \pm 0,63 \mu\text{m}$ auf $3,36 \pm 0,43 \mu\text{m}$ ($p=1.2983e-010$) vor. Die mittlere axiale Ausdehnung von MAA + KCl vor FISH und nach FISH entsprechen der Ausdehnung von MAA ohne KCl nach FISH.

Die PFA-fixierten LNCAP Zellkerne sind signifikant axial ausgedehnter als bei den MAA-fixierten Kernen beider Varianten. Im Vergleich zu den nicht hypotonen um den Faktor 2.88 und im Vergleich zu den hypotonen MAA-fixierten Kernen um den Faktor 3.88. Passend zu der gravierenden Reduktion des Volumens durch die Hybridisierung ist auch die axiale Ausdehnung signifikant stark reduziert um den Faktor 1.69 ($p=1.3466e-011$). Die Unterschiede zwischen den PFA-fixierten Kernen nach FISH zu den MAA-fixierten ebenfalls nach FISH sind gleichermaßen signifikant (siehe Tabelle 3.3). Die Verringerung der axialen Ausdehnung der PFA-Kerne nach FISH ist zwar stark, aber nicht so groß, dass sie der axialen Ausdehnung der MAA+KCl-fixierten Kerne von $3,32 \pm 0,37 \mu\text{m}$ bzw. der MAA-KCl-fixierten Kerne von $3,36 \pm 0,43 \mu\text{m}$ entspricht.

Basierend auf der Bestimmung der Anisotropie der Zellkerne konnte bei der MAA+KCl-Fixierung eine sphärische Ausdehnung der Kerne vor (1.09 ± 0.05) als auch nach (1.08 ± 0.07) FISH festgestellt werden. Im Vergleich dazu sind die nicht-hypotonen Kernen vor FISH eher elipsoid mit einer Anisotropie von 1.32 ± 0.23 . Bei den MAA-fixierten Kernen nimmt die Anisotropie nach FISH signifikant auf 1.49 ± 0.21 zu ($p=2.4911e-004$). Die PFA-fixierten Zellkerne sind mit einer mittleren Anisotropie von 1.64 ± 0.28 signifikant um den Faktor 1.55 mehr ellipsoid als die Kerne der MAA+KCl-Fixierung ($p=2.9941e-013$) und um den Faktor 1.28 mehr ellipsoid als die MAA-KCl-Fixierung ($p=8.6174e-005$). Die mittlere Anisotropie der PFA-LNCAP Kerne nach FISH ist nicht signifikant verändert ($p=0.9914$). Die mittleren Werte der Berechnung der Anisotropie zugrundeliegenden lateralen x- und y-Ausdehnung sind ebenfalls in der Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

FISH v/n	MAA +KCl	MAA	PFA	MAA+KCl/ MAA	SD (Faktor) MAA+KCl/ PFA	MAA/PFA
Volumen [μm^3]						
vor	1188 ± 381	933 ± 338	1734 ± 306	$p=0.0138$ 1.27	$p=5.1828e-006$ 0.68	$p=1.3934e-010$ 0.54
nach	860 ± 178	795 ± 151	1161 ± 247	$p=0.0951$ 1.08	$p=2.1010e-007$ 0.74	$p=1.1879e-010$ 0.68
Faktor (v/n)	1.38	1.17	1.49			
SD	$p=2.2502e-005$	$p=0.0419$	$p=1.6959e-008$			
Axiale Ausdehnung (z) [μm]						
vor	3,4 ± 0,58	4,58 ± 0,63	13,2 ± 1,59	$p=1.7847e-008$ 0.74	$p=2.9941e-013$ 0.25	$p=4.6233e-013$ 0.35
nach	3,32 ± 0,37	3,36 ± 0,43	7,8 ± 1,35	$p=0.8409$ 0.98	$p=7.9959e-018$ 0.43	$p=7.9959e-018(!)$ 0.43
Faktor (v/n)	1.02	1.36	1.69			
SD	$p=0.9995$	$p=1.2983e-010$	$p=1.3466e-011$			
Anisotropie (xy)						
vor	1.09 ± 0.05	1.32 ± 0.23	1.64 ± 0.28	$p=1.0203e-007$ 0.82	$p=2.9941e-013$ 0.66	$p=8.6174e-005$ 0.80
nach	1.08 ± 0.07	1.49 ± 0.21	1.59 ± 0.23	$p=2.0685e-017$ 0.72	$p=3.9069e-017$ 0.68	$p=0.2548$ 0.94
Faktor (v/n)	1	0.88	1.03			
SD	$p=0.0092$	$p=2.4911e-004$	$p=0.9914$			
Laterale Ausdehnung (x) [μm]						
vor	26,88 ± 5,12	23,52 ± 4,67	21,14 ± 2,82	$p=0.0056$ 1.14	$p=2.3489e-006$ 1.27	$p=0.0074$ 1.11
nach	24,48 ± 2,52	26,93 ± 3,60	21,37 ± 2,61	$p=4.2318e-004$ 0.9	$p=2.0557e-006$ 1.14	$p=4.0999e-009$ 1.26
Faktor (v/n)	1.10	0.87	0.99			
SD	$p=0.0135$	$p=1.7731e-004$	$p=0.7251$			
Laterale Ausdehnung (y) [μm]						
vor	24,60 ± 4,46	17,92 ± 2,93	13,04 ± 1,55	$p=9.6743e-008$ 1.37	$p=6.1511e-008$ 1.89	$p=2.0749e-012$ 1.37
nach	22,56 ± 2,47	18,19 ± 2,17	13,47 ± 1,19	$p=5.3094e-013$ 1.24	$p=7.9959e-018$ 1.67	$p=1.7103e-013$ 1.35
Faktor (v/n)	1.09	0.99	0.97			
SD	$p=0.0014$	$p=0.2488$	$p=0.2996$			

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von LNCAP Fibroblasten

(Anzahl der Kerne siehe Abbildungen 3.10 bis 3.12)

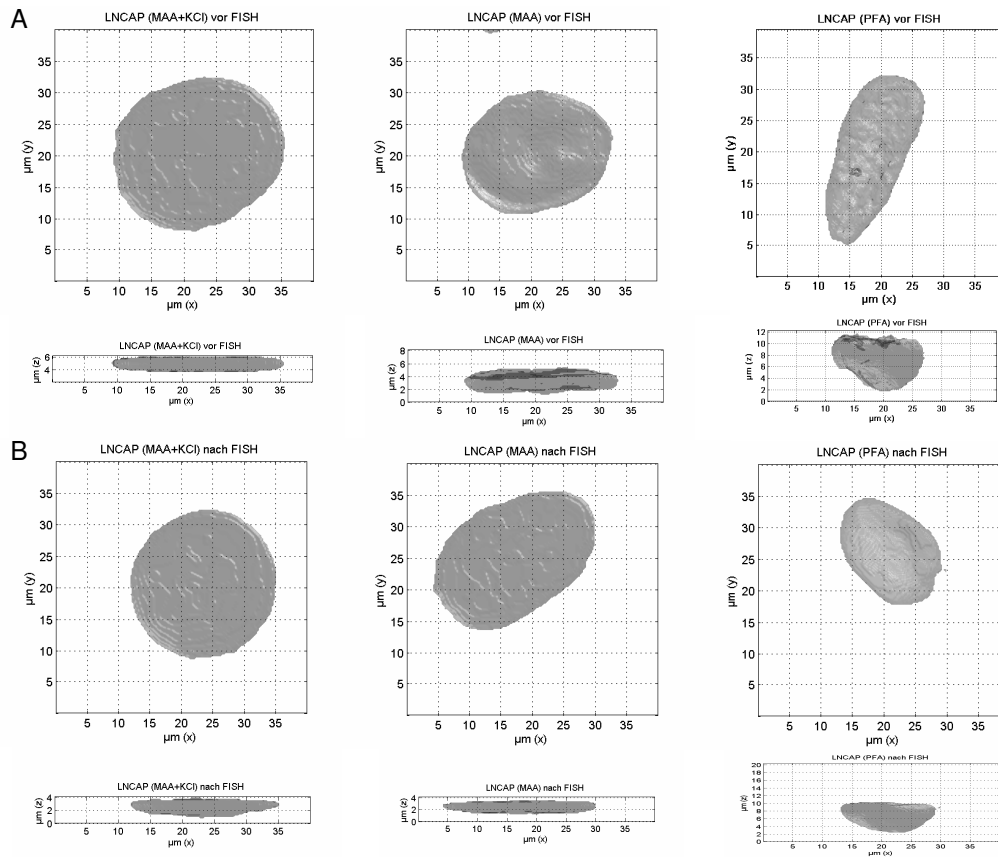


Abbildung 3.9: Visualisierung repräsentativer Zellkerne von LNCAP Fibroblasten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung

A Vergleich der MAA- (mit und ohne KCl) mit der PFA-Fixierung vor der Hybridisierung; **B** Vergleich der MAA- (mit und ohne KCl) mit der PFA-Fixierung nach der Hybridisierung.

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

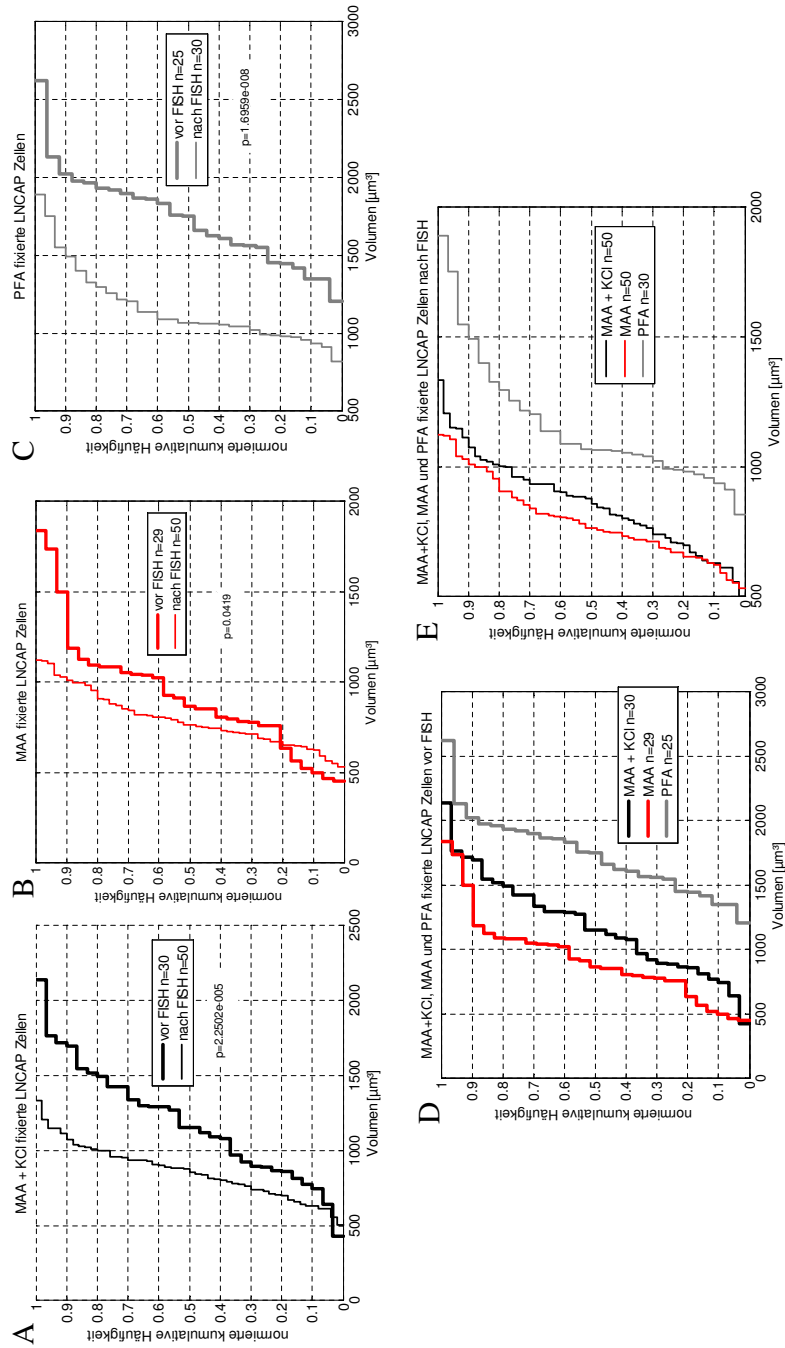


Abbildung 3.10: Volumen der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

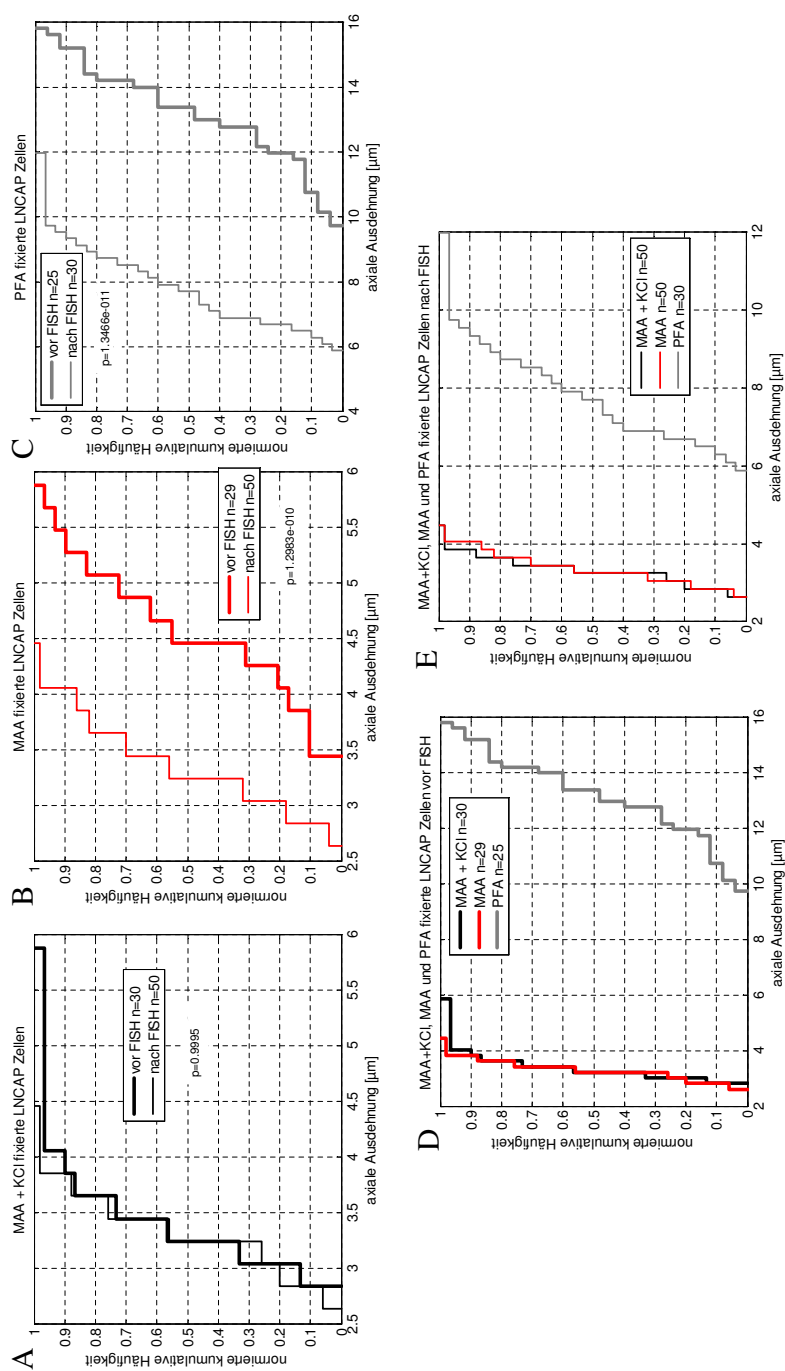


Abbildung 3.11: Axiale Ausdehnung der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

3.1 Morphologie der Zellkerne in Abhängigkeit von der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur

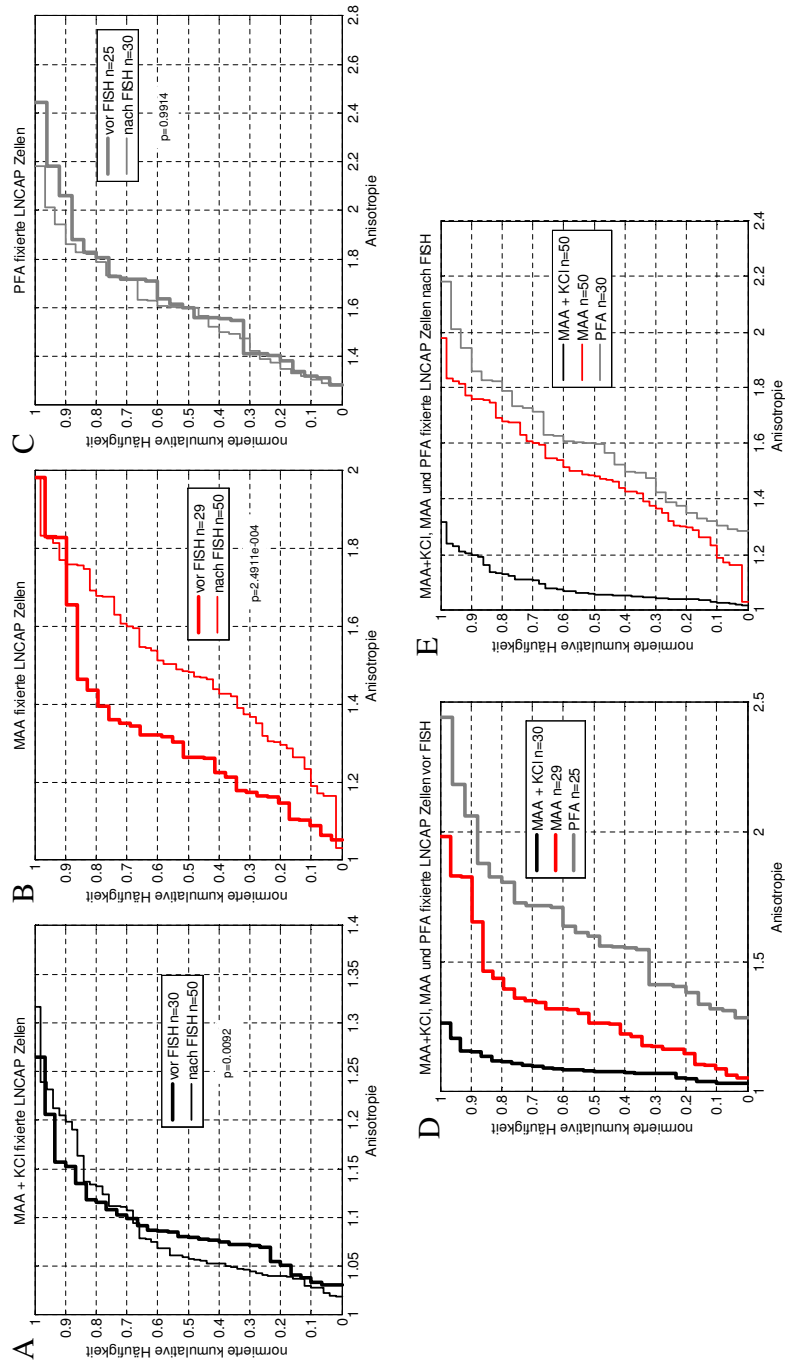


Abbildung 3.12: Anisotropie der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung

3.2 Bestimmung der Zellzyklusphase

Das Ki-67 Protein ist ein spezifischer Marker für proliferierende Zellen. Die Verteilung des Proteins im Zellkern ist zellzyklusabhängig (Zellzyklusmarker).

3.2.1 VH7

Das Ki-67 Protein wurde in PFA-fixierten VH7 Fibroblasten nach Konfluenz mittels spezifischem primären Antikörper markiert und nach Bindung des Alexa 488 gekoppelten sekundären Antikörpers sowie der DNA-Gegenfärbung mit *TO-PRO 3 iodide* am CLSM aufgenommen.

Primäre Fibroblasten besitzen die Eigenschaft, bei Platzmangel bzw. Konfluenz in der G₀-Phase zu arretieren. Diesen Arrest in der G₀-Phase wurde mittels Ki-67 Immunoproteinmarkierung überprüft. Nach Auswertung mehrerer Übersichtsaufnahmen konnte eine G₀-Synchronisation durch konfluentes Wachstum zu 83 % erreicht werden. Die übrigen Prozent stellen G₁- (9,5 %) und S-Phasen (7,5 %) dar. In der Abbildung 3.13 ist eine Übersichtsaufnahme eines konfluenten Bereichs (**A**) (2D Projektion) mit Zellkernen in G₀- (ohne Ki-67) und G₁-Phase (mit Ki-67) und einige Beispiele verschiedener Zellzyklusphasen gezeigt. Das Bild **B** in dieser Abbildung zeigt eine Prometaphaserosette mit markiertem Ki-67 Protein, welches sich um die Chromosomen lagert. Eine Serie der in **B** dargestellten Metaphaserosette in Abständen von zwei Schnitten entlang der z-Achse ist in **C** dargestellt. In **D** ist eine sehr frühe G₁-Phase (links) sowie eine mittlere G₁-Phase (rechts) und in **E** ein Beispiel für die S-Phase zu sehen.

3.2.2 LNCAP

Im Gegensatz zu den durch konfluentes Wachstum in G₀-Phase synchronisierbaren VH7 Zellen wachsen die LNCAP auch bei Platzmangel übereinander weiter. Deshalb wurden diese Zellen in den weiteren Untersuchungen als gemischtes Zellzyklusphasen-Präparat verwendet. Mittels pKi-67-Markierung wurden trotzdem die Anteile der Zellzyklusphasen bestimmt. 30 % der LNCAP Zellen befinden sich in der G₀-Phase, 25 % in der G₁-Phase und 42 % in der S/G₂-Phase sowie 3 % in der M-Phase.

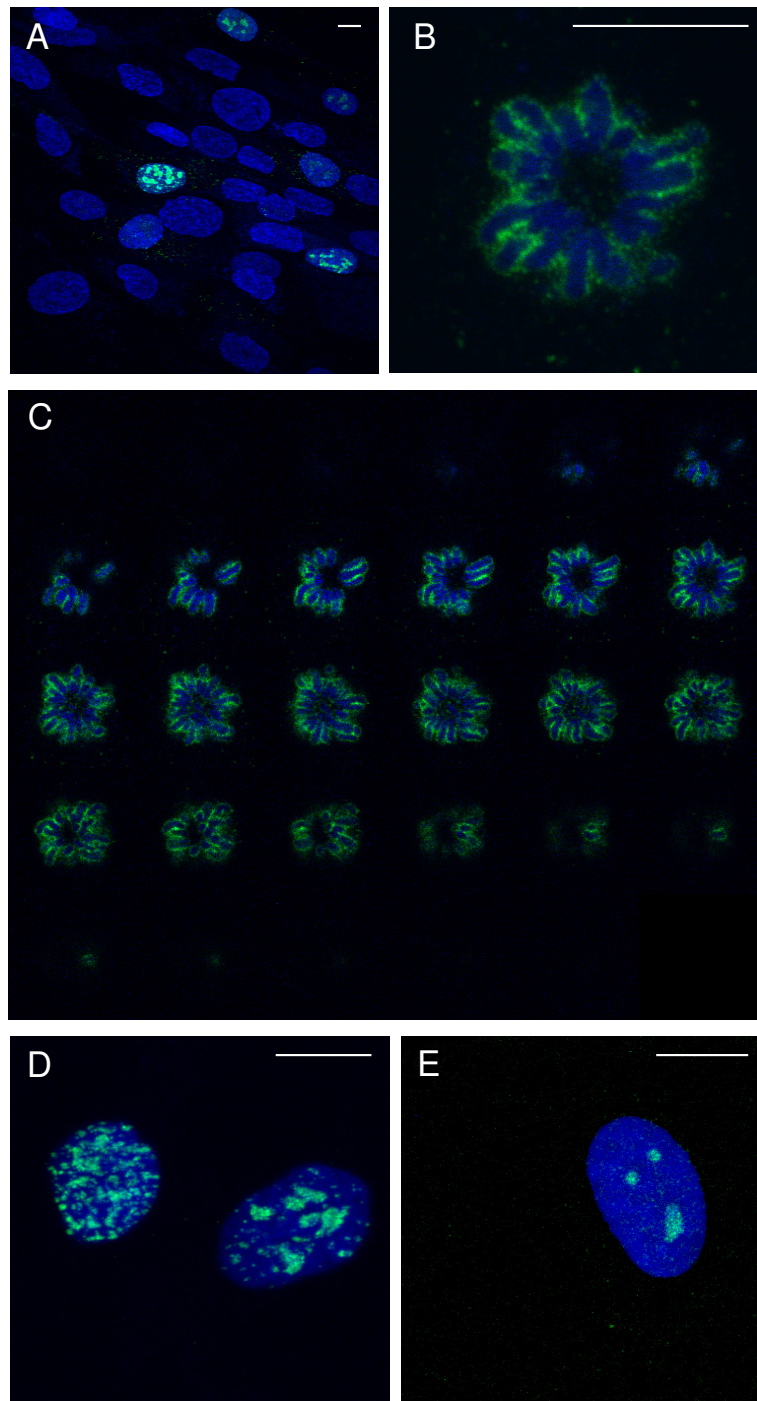


Abbildung 3.13: Detektion des Ki-67 Proteins mittels CLSM in VH7

Balken = 10 μ m

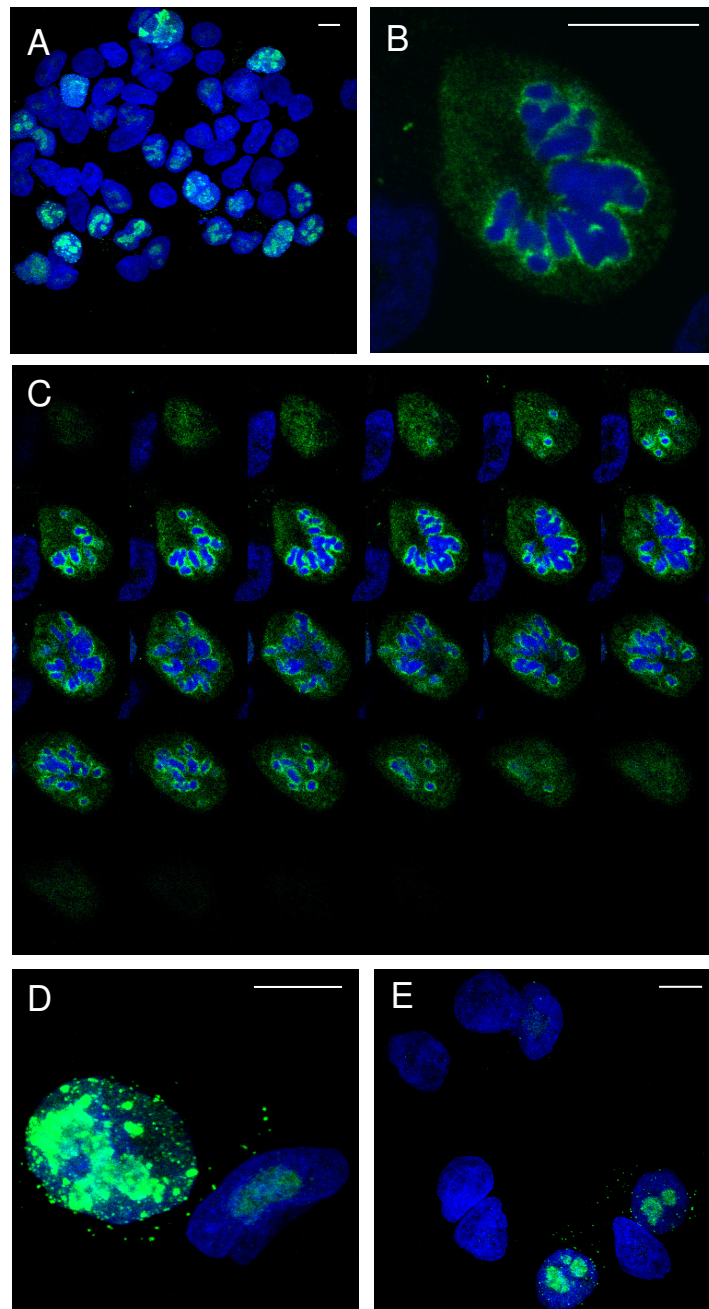


Abbildung 3.14: Detektion des Ki-67 Proteins mittels CLSM in LNCAP

Balken = 10 μ m

3.3 Bestimmung der c-Myc-Expression in VH7 und LNCAP

VH7 In der Abbildung 3.15 ist das c-Myc-Protein nach Antikörperbindung in Zellkernen konfluenter als auch nicht konfluenter Bereiche PFA-fixierter VH7 Zellen dargestellt. Eine erfolgreiche Markierung zeichnet sich durch ein spezifisches, klusterartiges Färbemuster im Kern aus, was im Fall der VH7 Zellen nur in 9,5 % der Kerne sichtbar war.

In der ersten Spalte **A1** bis **D1** der Abbildung 3.15 ist der 488 nm-Kanal zur Detektion des mit Alexa488 markierten c-Myc in Falschfarbe als 2D-Projektion dargestellt. Die Kerngegenfärbung mit TO-PRO-3 iodide (647 nm-Kanal) ist in der zweiten Spalte **A2** bis **D2** ebenfalls als 2D-Projektion gezeigt. Die letzte Spalte **A3** bis **D3** zeigt die beiden vorherigen als Überlagerungsbild. C-Myc-positive Zellkerne sind im Bild **A1**, **C1** und **D1** in konfluenter und in nicht-konfluenter Bereichen zu erkennen, wobei der Anteil an positiven Kernen konfluenter Areale geringer ist als in den nicht-konfluenter. Außerdem wird, unter Betrachtung des Bildes **C2**, deutlich, dass das Kernvolumen in c-Myc-positiver Kerne größer erscheint, als dass derer ohne c-Myc, wie im Bild **B2** (gleicher Zoom), was dafür spricht, dass diese Zelle in der G_2 -Phase vorliegen könnte. Diese Vermutung wird allerdings nur bei gleichzeitiger Verwendung des Ki-67-Markers nachweisbar.

LNCAP Im Gegensatz zu den konfluent gewachsenen VH7 Fibroblasten mit einem klusterartigen Färbemuster von c-Myc im Zellkern, konnte bei den LNCAP Fibroblasten auch nach Erhöhung der Konzentration des primären (bis zu 1:100) und sekundären Antikörpers (1:50) sowie nach Verlängerung der Inkubationszeiten (primären Antikörper 16h, 24h, 48h; sekundären Antikörper 1h, 2h) in unterschiedlichen Kombinationen dieses Muster nicht reproduziert werden. Stattdessen war eine schwache homogene Kernfärbung in nahezu allen Kernen sowie vereinzelt Akkumulationen im Cytoplasma (ohne DNA-Gegenfärbung) detektierbar.

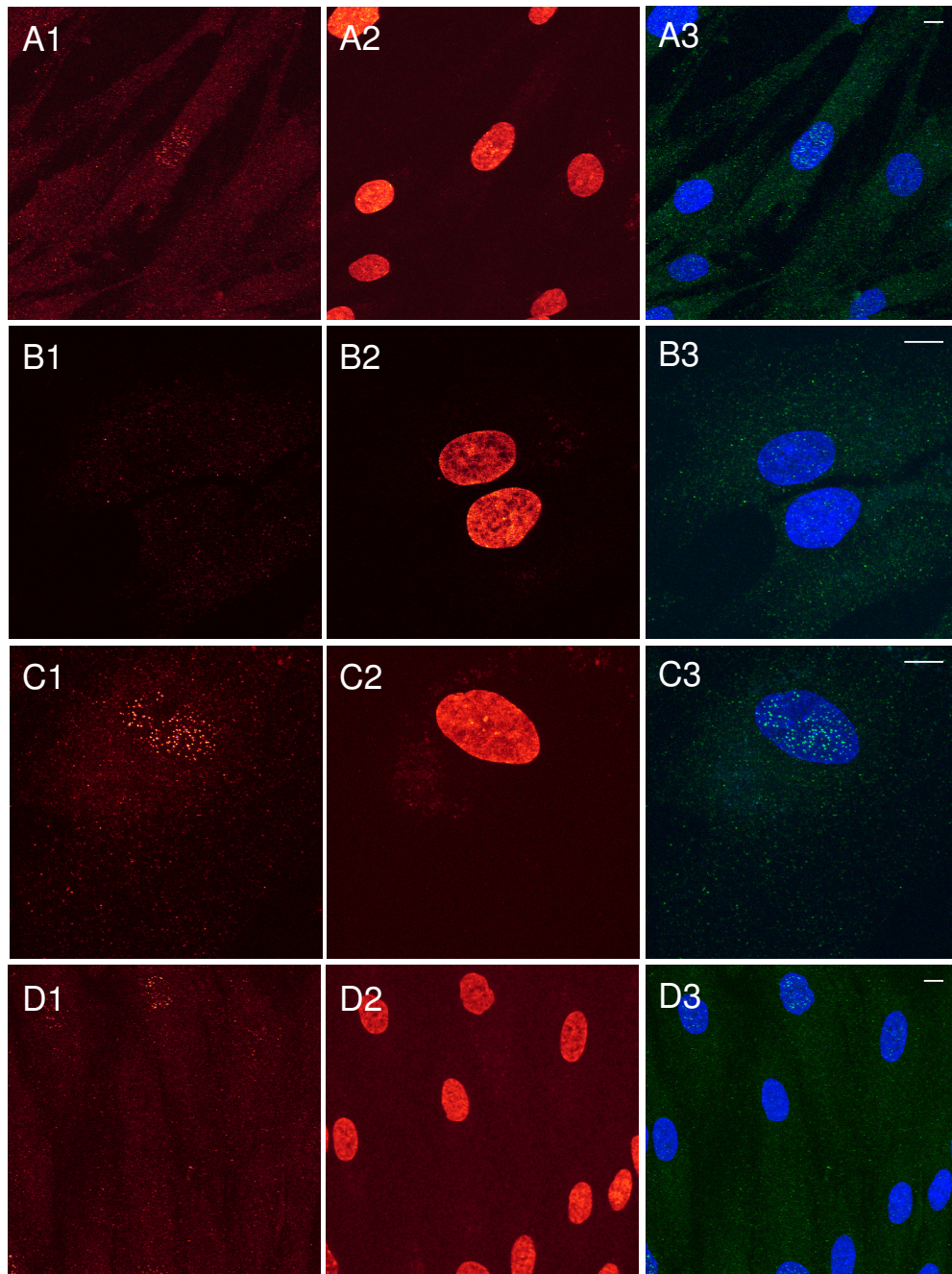


Abbildung 3.15: c-Myc-Expression in VH7

Balken = 10 μ m

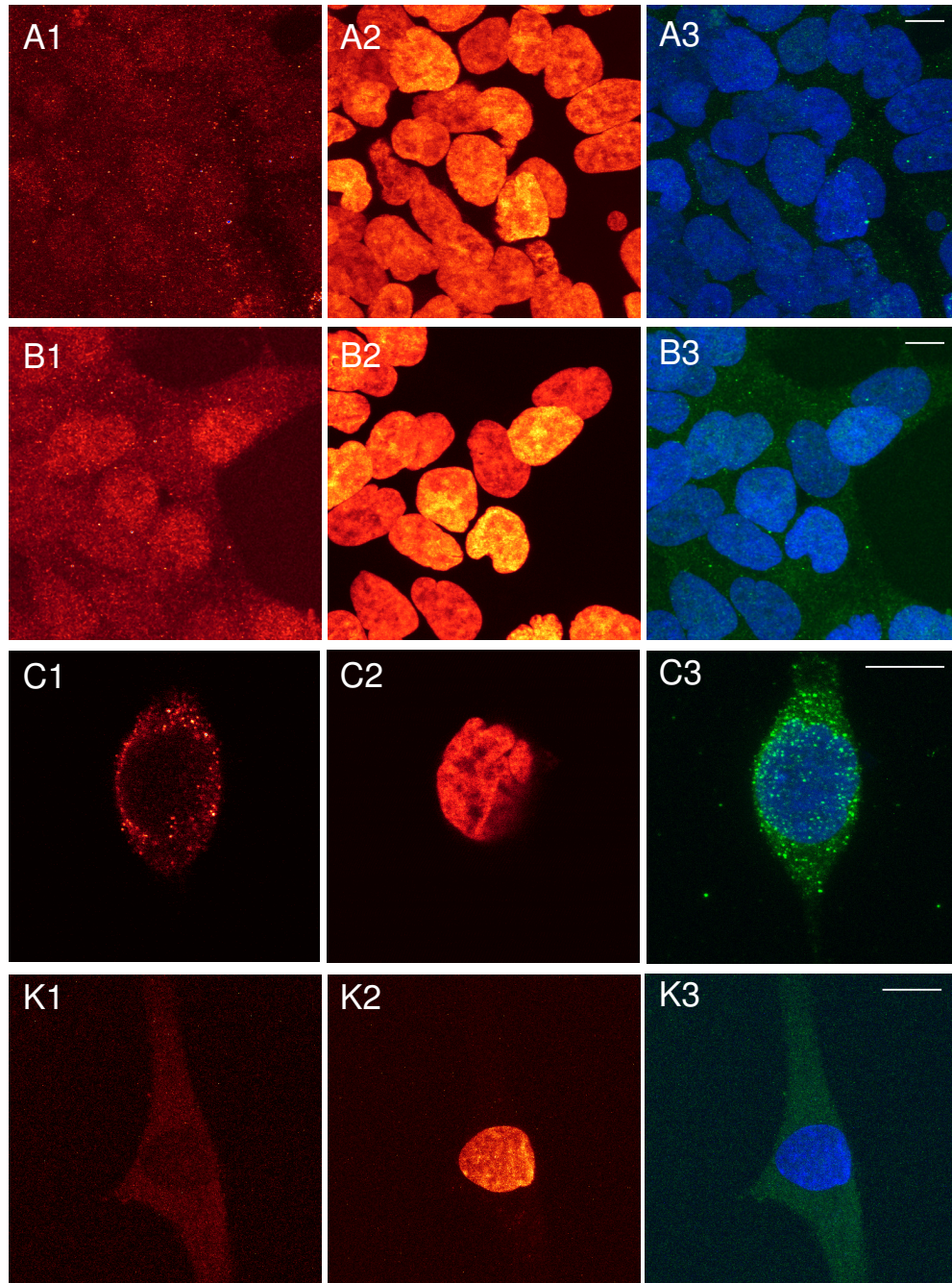


Abbildung 3.16: c-Myc-Expression in LNCAP

Balken = 10 μ m

3.4 Bestimmung der AMACR-Proteinexpression in VH7 und LNCAP

VH7 Das mittels Antikörper markierte pAMACR ist in VH7 Zellen im Zytoplasma aller Zellen detektierbar. Es gibt keine Unterschiede in der Häufigkeit der Proteinexpression, wenn man konfluente Bereiche (Bilder **A** und **B**) mit denen von nicht-konfluenten (Bilder **C** und **D**) vergleicht (siehe Abbildung 3.17). Bei der Betrachtung der Kontrollen **K1** und **K2** rechts der Abbildung 3.17 (ohne primären Antikörper) wird deutlich, dass es nur in den Versuchen mit primären Antikörpern zur Bildung der auffälligen Kluster im Zytoplasma kommt.

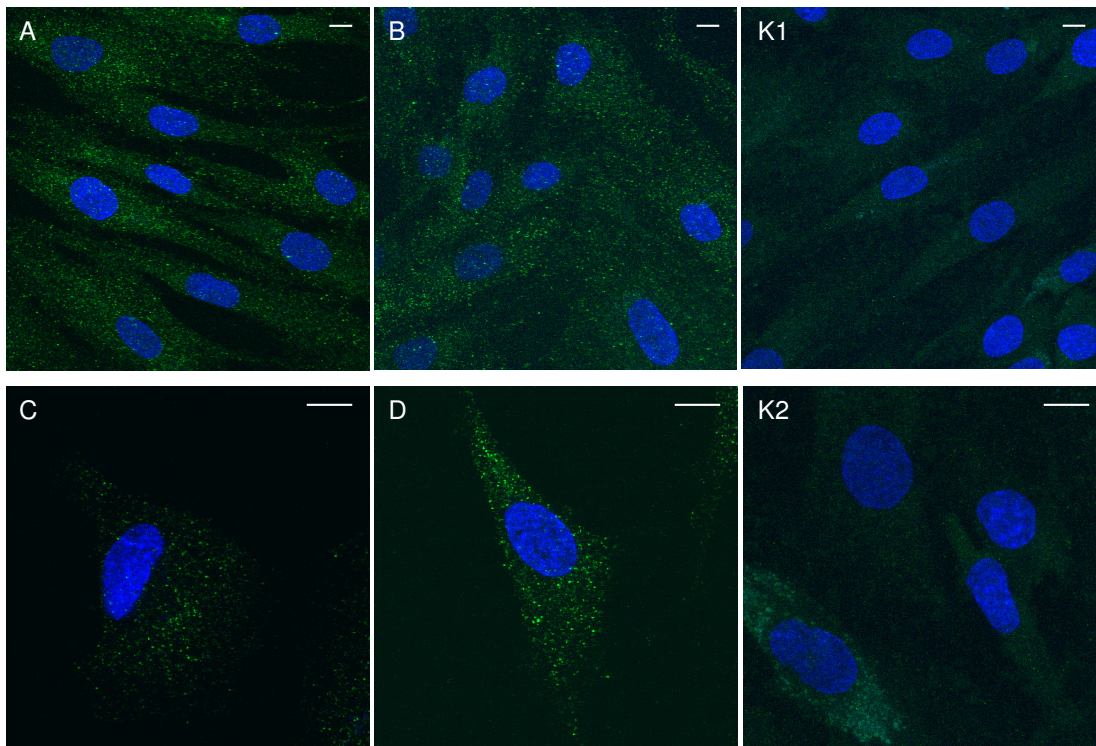


Abbildung 3.17: pAMACR-Expression in VH7

Balken = 10 μ m

LNCAP Das peroxisomale und mitochondriale AMACR-Protein scheint nicht homogen und nicht in allen LNCAP Zellen exprimiert zu werden (Abbildung 3.18). Aus der Abbildung 3.18 wird deutlich, dass in einigen Zellen keine Expression erfolgt. Im Bild **A** ist beispielsweise eine Metaphase mittig zu erkennen ohne markiertes Protein in der Umgebung, wie auch zahlreiche Interphasekerne ohne Expression. Im größten Teil der Zellen aber erfolgt eine Expression des AMACR-Proteins wie erwartet lokalisiert im Cytoplasma.

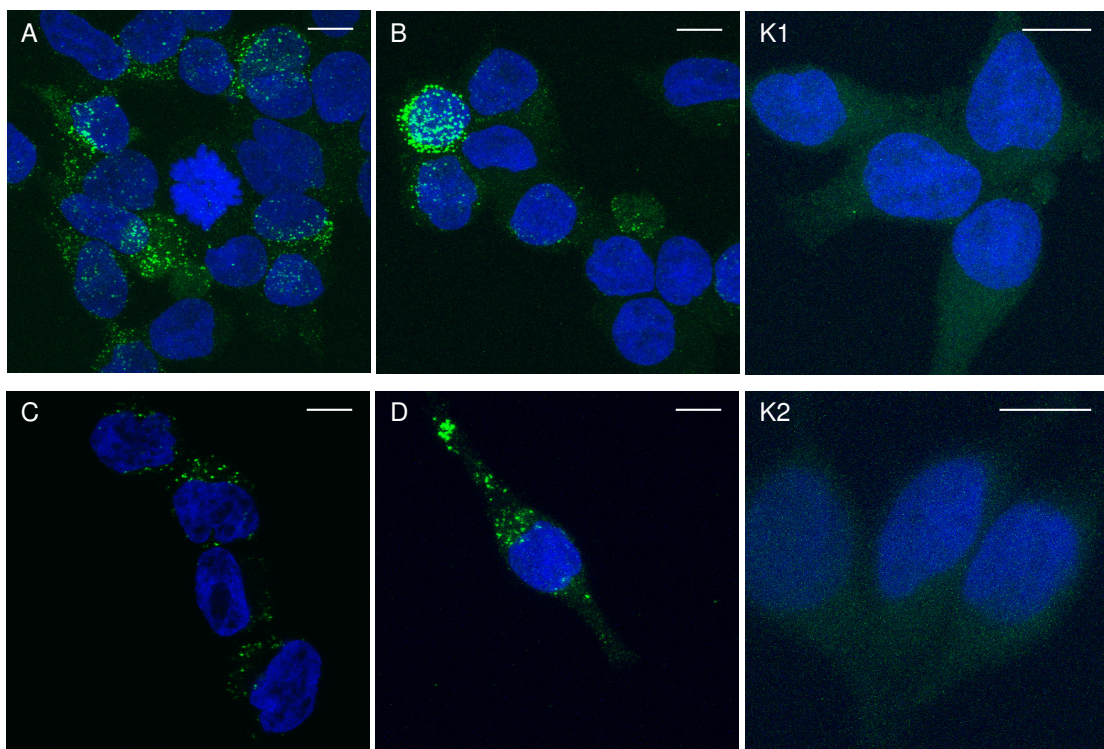


Abbildung 3.18: pAMACR-Expression in LNCAP

Balken = 10 μ m

Eine Kontrolle der Spezifität des primären AMACR-Antikörpers ist in den Bildern **K1** und **K2** der Abbildung 3.18 zu sehen. Das auffällige Färbemuster im Cytoplasma fehlt. Um die Eigenfluoreszenz des Cytoplasma und die darin fehlende Markierung des

Proteins anschaulich zu machen, wurde die Helligkeit der 2D-Bildprojektion erhöht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Expression kann aber nur nach simultaner Markierung des pKi-67 und des pAMACR ermittelt werden. Bei der Immunfärbung des pAMACR der VH7 Zellen wurde doppelt so viel primäre Antikörper (2 $\mu\text{g}/250\text{ ml}$) eingesetzt und doppelt so lange inkubiert (60 min) im Vergleich zu der Färbung in den LNCAP Zellen. Die Bindungsfähigkeit des sekundären Antikörpers in VH7 Zellen ist geringer als in LNCAP Zellen.

3.5 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Beads

Zur Validierung des verwendeten *multi point model* und zur Kalkulation der lateralen Ausdehnung und Anisotropie fluoreszierender Objekte, welche als CLSM-Bilddateien vorliegen, wurden Beads verschiedener Größen mit bekanntem Durchmesser verwendet. In der Tabelle 3.4 sind die Werte des theoretischen *FWHM* und des experimentell ermittelten *TP-FWHM* sowie die Anisotropie der gemessenen Beads jeweils mit den entsprechenden Differenzen zwischen theoretischem und experimentellem Wert (Δ) dargestellt.

Durchmesser [nm]	<i>FWHM</i> [nm] theo.	<i>TP-FWHM</i> [nm] exp.	Δ <i>FWHM</i> _{theo} / <i>TP-FWHM</i> _{exp}	Anisotropie exp.	Δ Anisotropie theo.=1/exp.
Absorption $\lambda = 488\text{nm}$					
100 (n=107)	71	142 \pm 35	-71	1.8 \pm 0.69	0.8
200 (n=81)	141	125 \pm 27	16	2.28 \pm 0.75	1.28
290 (n=53)	205	159 \pm 13	46	1.69 \pm 0.19	0.69
390 (n=97)	276	207 \pm 11	69	1.3 \pm 0.1	0.3
560 (n=93)	396	306 \pm 10	90	1.18 \pm 0.09	0.18
Absorption $\lambda = 568\text{nm}$					
560 (n=92)	396	277 \pm 14	119	1.24 \pm 0.09	0.24

Tabelle 3.4: Laterale Ausdehnung (*FWHM*, *TP-FWHM*) und Anisotropie unterschiedlich großer Beads

Die 560 nm Beads waren TetraSpeck-Beads, welche bei 488 nm und 568 nm gleichzeitig anregbar und detektierbar sind. Dadurch war es möglich, im grünen und gelben Kanal das gleiche Objekt zu vermessen. Die theoretische Anisotropie sphärischer dreidimensionaler Objekte, wie die verwendeten Beads, beträgt idealerweise 1. Die Bestimmung der theoretischen lateralen halbmaximalen Ausdehnung der Beads erfolgte nach der Gleichung:

$$FWHM_{theo.} = \frac{\varnothing_{Beads}}{\sqrt{2}}$$

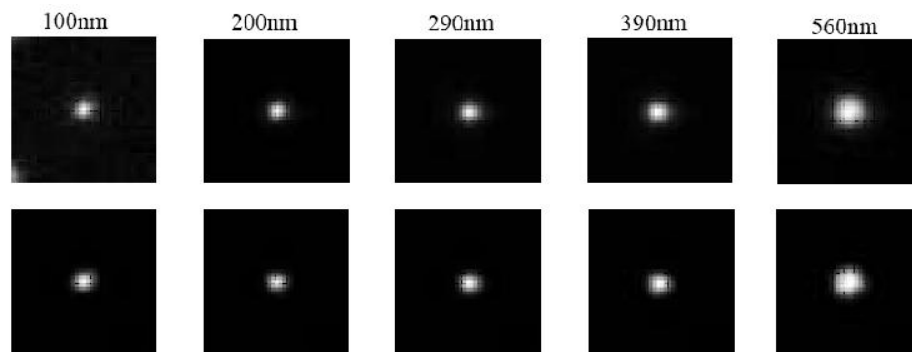


Abbildung 3.19: Beads mit steigendem Durchmesser
 obere: konfokales Pixelbild der Beads, untere: mittels *10-point model* gefittetes Bild

Die Tabelle 3.4 zeigt die relativ hohe Standardabweichung bzw. die Abbildung 3.20 die breite Verteilung der ermittelten Werte für 100 nm (142 ± 35 nm) und 200 nm (125 ± 27 nm) Beads. Mit steigender Größe der Objekte nimmt die Standardabweichung ab, die Kurve der kumulierten Häufigkeitsverteilung wird steiler. Für 290-, 390- und 560 nm nimmt zwar die Differenz zwischen theoretischer und experimenteller lateraler Ausdehnung zu, die Vertrauenswürdigkeit der Werte steigt aber. Die Messung der lateralen Ausdehnung der 560 nm TetraSpeckBeads am selben Präparat mit den zwei verschiedenen Wellenlängen zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kanälen ($p=4.1149e-036$). Im 488 nm-Kanal (306 ± 10 nm) werden die selben Beads als größer erkannt als im 568 nm-Kanal (277 ± 14 nm).

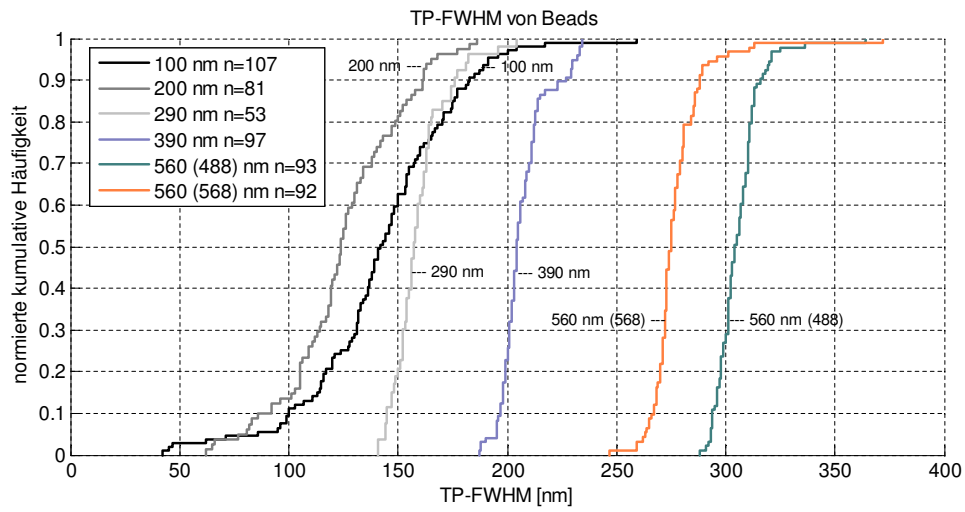


Abbildung 3.20: TP-FWHM von Beads unterschiedlichen Durchmessers

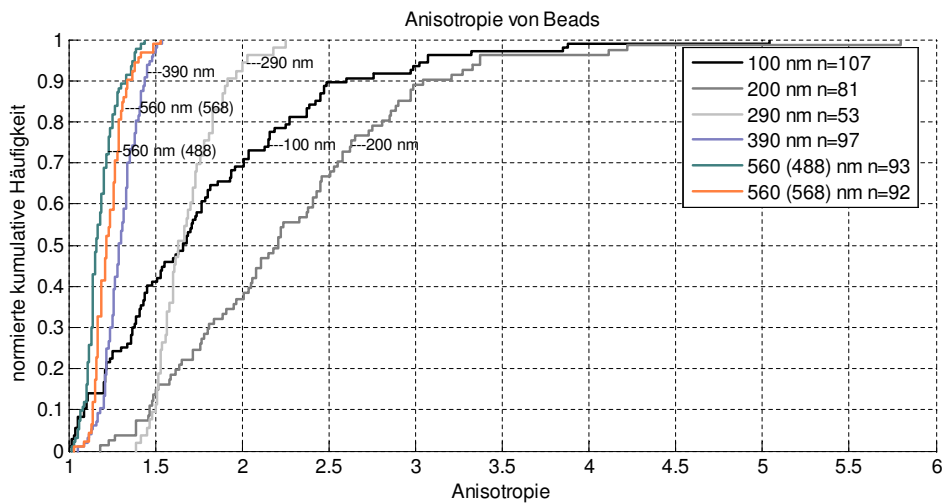


Abbildung 3.21: Anisotropie von Beads unterschiedlichen Durchmessers

Die Bestimmung der Anisotropie der unterschiedlich großen Beads zeigt ähnliche Tendenz. Mit steigender Größe der Beads sinkt die Standardabweichung der gemessenen Anisotropie, mit Ausnahme der 100 und 200 nm Beads. Für 100 nm Beads wurde eine mittlere Anisotropie von 1.8 ± 0.69 und für 200 nm Beads von 2.28 ± 0.75 gemessen. Im Vergleich zu den größeren Beads sind die Abweichungen der Anisotropie der 100 nm und 200 nm Beads vom Mittelwert deutlich stärker. Die 290 nm Beads weisen hinsichtlich der Anisotropie zwar eine relativ geringe Standardabweichung auf, der Mittelwert weicht aber mit 1.69 um 0.69 vom theoretischen Wert von 1 ab. Beadgrößen von 390 nm (1.3 ± 0.1) und 560 nm (488 nm: 1.18 ± 0.09 ; 568 nm: 1.24 ± 0.09) zeigen eine sehr gute Annäherung an den theoretischen Wert von 1 für sphärische Objekte durch ihre geringe Standardabweichung. Die Messung der Anisotropie der 560 nm TetraSpeckBeads am selben Präparat (identische Beads) und den zwei verschiedenen Wellenlängen zeigt signifikante Unterschiede zwischen den Kanälen ($p=1.8637e-004$). Im 488 nm-Kanal werden die selben Beads eher als sphärische erkannt als im 568 nm-Kanal.

3.6 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/c-myc

Im Folgenden werden die Signale der mittels FISH markierten Centromer 8 Region sowie der 8q24-Region von Metaphasen- mit denen von Interphasechromosomen verglichen. Dazu wurde die laterale Ausdehnung ($TP-FWHM$) als auch die laterale Form (Anisotropie) basierend auf konfokalen Datensätze bestimmt. Da das Metaphasenpräparat mittels Methanol/Eisessig fixiert wurde, wurde neben Formaldehyd-fixierten Zellen in Interphase auch eine Interphasen-Methanol/Eisessig-Suspension verwendet. Diese dient als Kontrolle für den Einfluss der MAA-Fixierung auf die ermittelten Werte in PFA-Interphasenchromosomen.

3.6.1 VH7

Das Besondere an dieser Metaphasensuspension ist, dass hier kein KCl eingesetzt wurde und die Metaphasen daher nicht hypoton sind. Außerdem konnten Metaphasen detektiert werden, bei denen die Chromatiden zusammen als auch getrennt (aber noch benachbart)

3 Ergebnisse

waren. Es fließen aber nur die Centromere in die Auswertung ein, die automatisiert als getrennt erkannt wurden. Die Tabelle 3.5 faßt die mittleren Werte der lateralen Ausdehnung sowie die der Anisotropie vom Centromer 8 und der 8q24 Domäne zusammen.

Zellstadium	laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>)		Anisotropie	
	Centromer 8	8q24/ <i>c-myc</i>	Centromer 8	8q24/ <i>c-myc</i>
Metaphase (MAA)	300 ± 32 nm (n=53)	407 ± 81 nm (n=126)	1.36 ± 0.34 (n=53)	1.47 ± 0.37 (n=126)
Interphase (MAA)	354 ± 59 nm (n=117)	367 ± 82 nm (n=90)	1.45 ± 0.42 (n=117)	1.7 ± 0.6 (n=90)
Interphase (PFA)	326 ± 46 nm (n=129)	348 ± 75 nm (n=79)	1.47 ± 0.35 (n=129)	1.55 ± 0.47 (n=79)

Tabelle 3.5: Mittlere laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in VH7 Fibroblasten

Abbildung 3.22 zeigt die normierte kumulative Häufigkeitsverteilung der Metaphasen- und Interphasensignale vom Centromer 8 in den unterschiedlichen Präparationen von VH7 Zellen und Abbildung 3.23 die der 8q24 Domäne. In den Abbildungen 3.24 und 3.25 sind Beispiele für die jeweiligen Fixierungen zu sehen. Wie schon hervorgehoben, wurde die Metaphasensuspension nicht mit KCl behandelt und die Centromere liegen getrennt vor. Die mittlere laterale Ausdehnung bzw. *TP-FWHM* beträgt für die einzelnen Metaphasesignale 300 ± 32 nm und sind damit signifikant kleiner ($p=1.587e-009$) als die Signale von Centromer 8 markiert in Interphasezellkernen der MAA-Fixierung mit einer mittleren lateralen Ausdehnung von 354 ± 59 nm.

Im Vergleich zu den Formaldehyd-fixierten Kernen in der Interphase mit einer lateralen Ausdehnung von 326 ± 46 nm sind die Signale der Interphasekerne der MAA-Fixierung signifikant größer ($p=0.004$). Die mittlere Ausdehnung in *xy*-Richtung der einzelnen Me-

3.6 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/*c-myc*

taphasesignale (1.36 ± 0.34) unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0.3919$) von der der Interphasesignale (1.45 ± 0.42). Auch der Vergleich der Anisotropie von Interphasesignalen der MAA- mit der PFA-Präparation zeigt keine signifikanten Unterschiede (1.47 ± 0.35 ; $p=0.3636$).

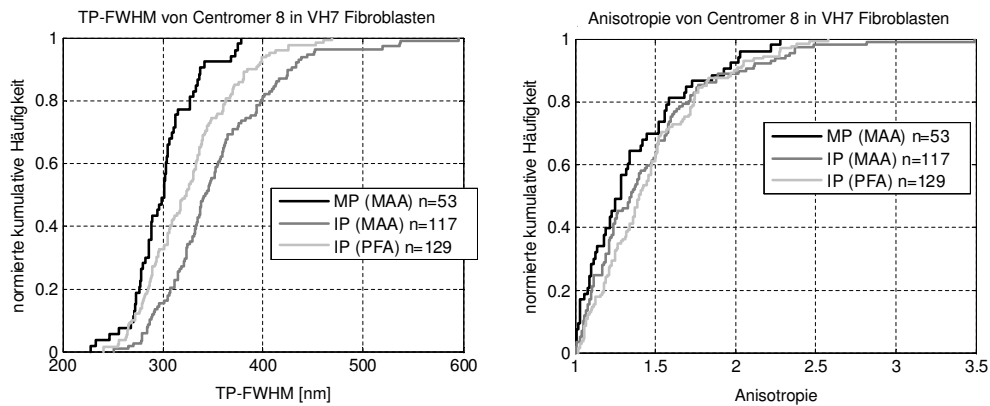


Abbildung 3.22: Laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von Centromer 8 in VH7 Fibroblasten

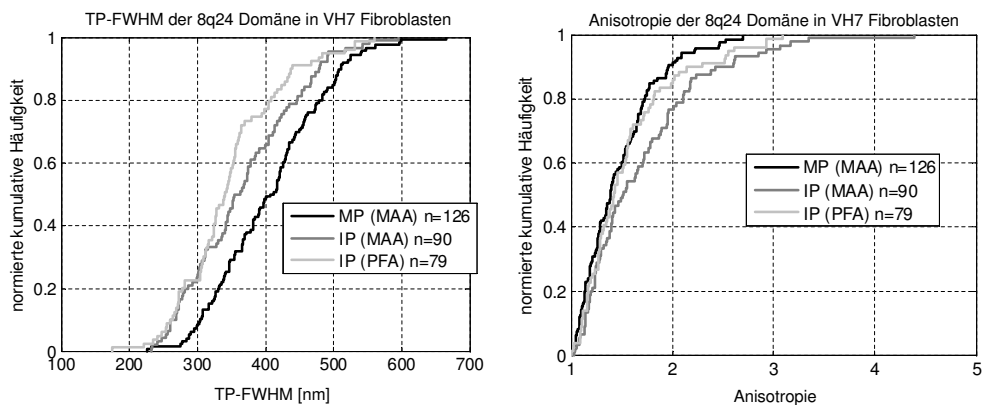


Abbildung 3.23: Laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von 8q24 in VH7 Fibroblasten

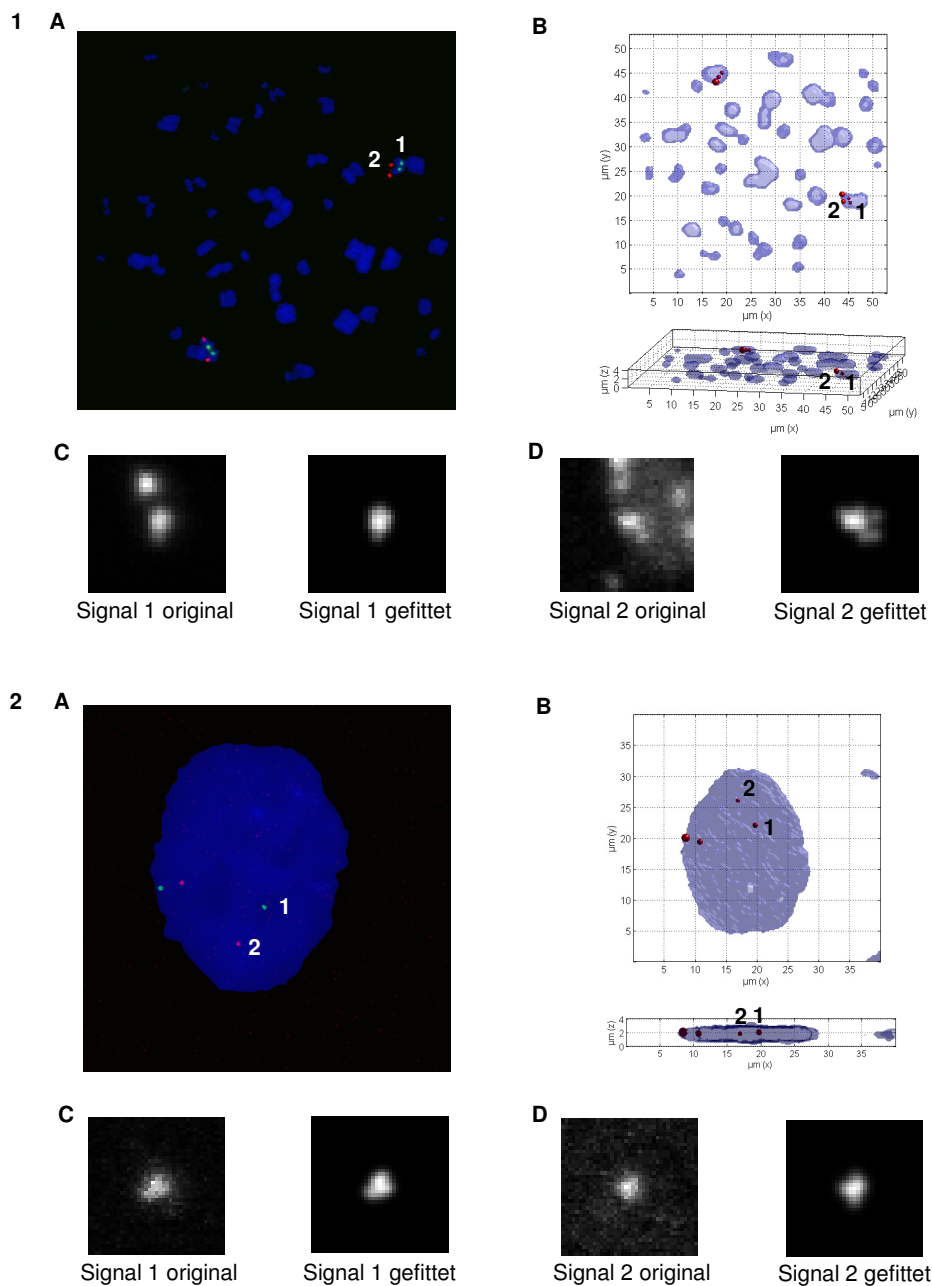


Abbildung 3.24: Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in Metaphase (1) und Interphase (2) der MAA-Fixierung von VH7 Zellen

A CLSM-Aufnahme von VH7 Zellen mit markiertem Centromer 8 (grün,1), 8q24/*c-myc* (rot,2) und DNA-Gegenfärbung (blau); B Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; C,D Originale (links) und gefittete (rechts) Signale.

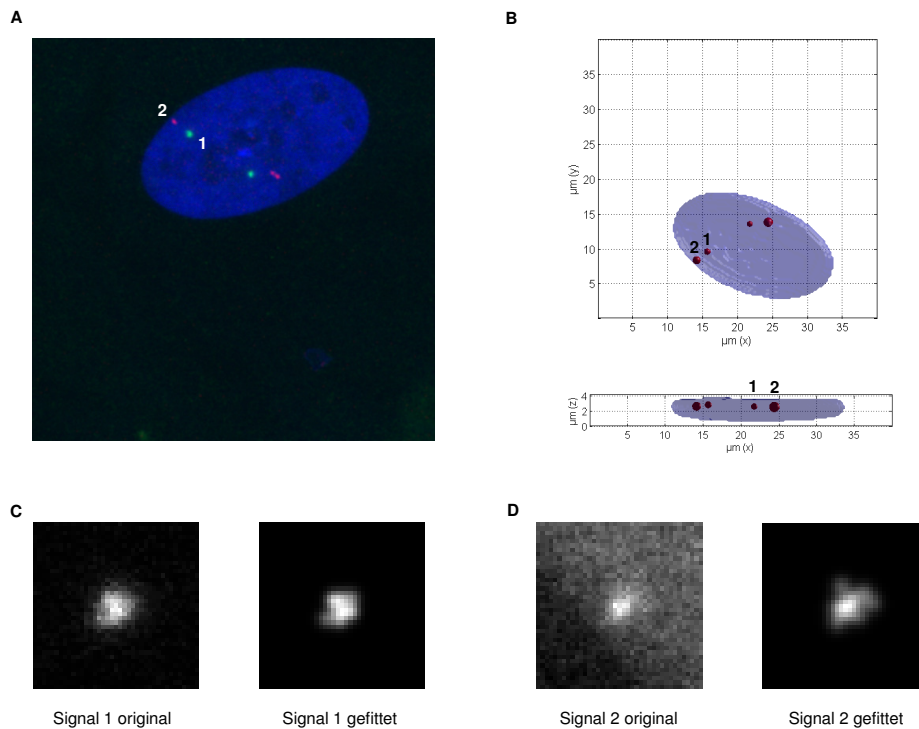


Abbildung 3.25: Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in PFA-fixierten VH7 Zellen

A CLSM-Aufnahme von VH7 Zellen mit markiertem Centromer 8 (grün,1), 8q24/*c-myc* (rot,2) und DNA-Gegenfärbung (blau); **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; **C,D** Originale (links) und gefittete (rechts) Signale.

Die 220kb große 8q24 Domäne, welche die 5kb große *c-myc* Genregion beinhaltet, zeigt eine laterale Ausdehnung in Metaphasechromosomen von 407 ± 81 nm. Dies ist signifikant größer als in MAA-fixierten Interphasechromosomen von 367 ± 82 nm ($p=0.0062$). Im Vergleich zu den Signalen in PFA-fixierten Interphasen mit einer mittleren lateralen Ausdehnung von 348 ± 75 nm sind die Interphasesignale der MAA-Suspension in einem 5% Konfidenzintervall signifikant ($p=0.0411$) kleiner.

Die Anisotropie der markierten Gendomäne zeigt signifikante Unterschiede zwischen Markierungen von Metaphasechromosomen mit einem Mittelwert von 1.47 ± 0.37 verglichen mit Markierungen in Interphasechromosomen ebenfalls einer MAA-Präparation

von gemittelt 1.7 ± 0.6 ($p=0.0208$). Die markierte 8q24 Domäne in Interphasen der beiden Fixierungen (MAA und PFA) zeigt keine Unterschiede ($p=0.1277$). Die mittlere anisotrope Ausdehnung von 8q24 in PFA-fixierten Interphasen beträgt 1.55 ± 0.47 .

3.6.2 LNCAP

Im Gegensatz zu der MAA-Suspension der VH7 Fibroblasten wurden die LNCAP Fibroblasten unter anderem auch mit KCl behandelt. Daher werden im Folgenden vier verschiedene Präparationen verglichen: (1) hypotone MAA-fixierte Metaphasensuspension, (2) hypotone MAA-fixierte Interphasensuspension, (3) nicht-hypotone MAA-fixierte Interphasensuspension, (4) nicht-hypotone adherent und konfluent gewachsene PFA-fixierte Fibroblasten in Interphase. Die Tabelle 3.6 zeigt die mittleren lateralen Ausdehnungen sowie die der Anisotropie der verschiedenen Präparate. In der Abbildung 3.26 sind die gemessenen Werte als kumulative Häufigkeit der Ausdehnung und der Anisotropie des Centromer 8 sowie in Abbildung 3.27 die der Genregion dargestellt. Die Abbildungen 3.28 bis 3.30 zeigen jeweils Beispiele der verschiedenen Fixierungen.

Die Centromere der Metaphasechromosomen der LNCAP Zellen sind in diesem Präparat nicht getrennt und zeigten sich als Einzelspots. Es wurde eine mittlere laterale Ausdehnung von 352 ± 33 nm bestimmt. Das Centromer 8 in Metaphasen ist signifikant lateral größer als in den Interphasekernen, mit einem Mittelwert von 341 ± 46 nm, der gleichen MAA-Suspension ($p=0.0017$). Der Vergleich der lateralen Ausdehnung des Centromer 8 in Interphasekernen der beiden MAA-Suspensionen mit und ohne KCl-Behandlung zeigt keine signifikanten Unterschiede ($p=0.4742$). Die mittlere laterale Ausdehnung des Centromer 8 in Interphasekernen der MAA-KCl-Fixierung beträgt 346 ± 45 nm. Das Centromer 8 in den PFA-fixierten Interphasekernen hat eine Ausdehnung von 326 ± 41 nm und ist damit signifikant kleiner als das Centromer 8 in der MAA+KCl ($p=0.00196$) und der MAA-KCl ($p=6.5563e-004$) Fixierung.

Die mittlere laterale Ausdehnung der 8q24/*c-myc*-Domäne ist in Metaphasechromosomen mit 379 ± 82 nm signifikant kleiner als in Interphasekernen mit 418 ± 79 nm, die mit MAA+KCl fixiert wurden ($p=0.0019$). Die 8q24-Genomäne in MAA-fixierten

3.6 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/*c-myc*

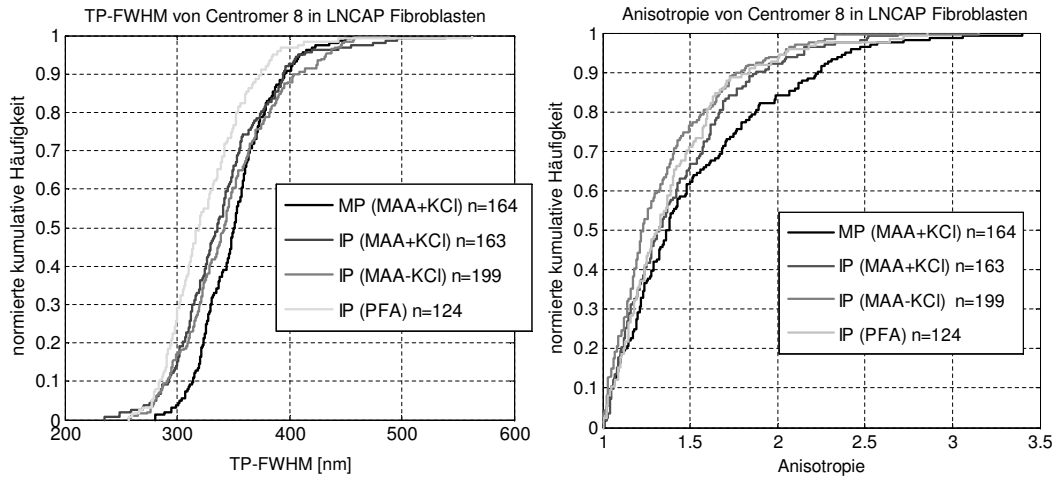


Abbildung 3.26: Laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie des Centromer 8 in LNCAP Fibroblasten

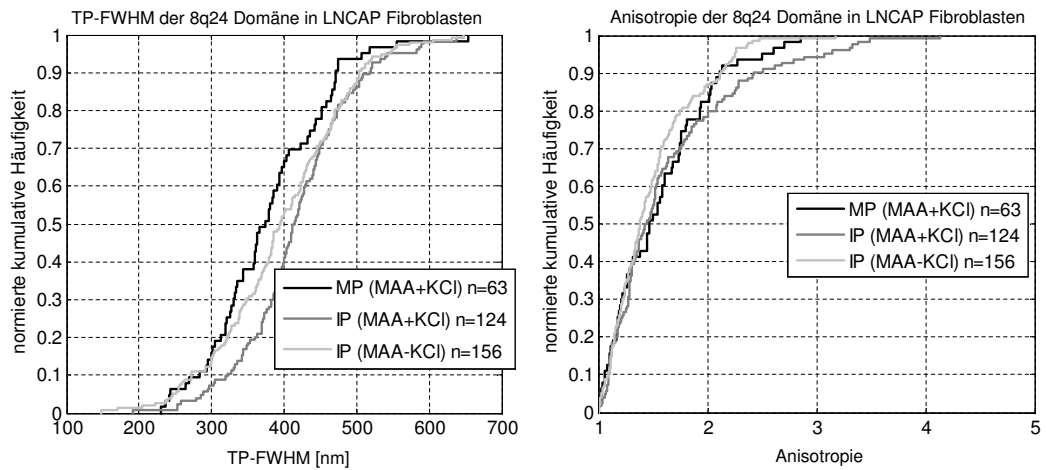


Abbildung 3.27: Laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie der 8q24 Domäne in LNCAP Fibroblasten

3 Ergebnisse

Zellstadium	laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>)		Anisotropie	
	Centromer 8	8q24/ <i>c-myc</i>	Centromer 8	8q24/ <i>c-myc</i>
Metaphase (MAA+KCl)	352 ± 33 nm (n=164)	379 ± 82 nm (n=63)	1.52 ± 0.47 (n=164)	1.56 ± 0.45 (n=63)
Interphase (MAA+KCl)	341 ± 46 nm (n=163)	418 ± 79 nm (n=124)	1.42 ± 0.35 (n=163)	1.64 ± 0.61 (n=124)
Interphase (MAA)	346 ± 45 nm (n=199)	397 ± 90 nm (n=156)	1.34 ± 0.33 (n=199)	1.48 ± 0.39 (n=156)
Interphase (PFA)	326 ± 41 nm (n=124)		1.40 ± 0.35 (n=124)	

Tabelle 3.6: Mittlere laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in LNCAP Zellen

Interphasekernen ohne KCl-Behandlung hat eine mittlere laterale Ausdehnung von 397 ± 90 nm. Mittels KS-Test wurde festgestellt, dass die Unterschiede zwischen der lateralen Ausdehnung der 8q24-Domäne in den beiden MAA-Fixierungen (mit KCl, ohne KCl) im 95 % Konfidenzintervall mit $p=0.0388$ signifikant sind. Die Ausdehnung des *c-myc*-Signals in Metaphasen ist signifikant gleich der Ausdehnung in Interphase der MAA-KCl-Präparation ($p=0.1836$).

Die mittlere Anisotropie des Centromer 8 in Metaphasechromosomen beträgt 1.52 ± 0.47 und ist im Vergleich zu den Centromer 8-Signalen in Interphasekernen der MAA+KCl-Suspension mit 1.42 ± 0.35 nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.2173$). Zwischen der Anisotropie des Centromer 8 in MAA+KCl und denen in MAA-KCl (1.34 ± 0.33) konnten auch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden ($p=0.0676$). Die Anisotropie der Centromerregion in PFA-fixierten Zellen (1.40 ± 0.35) ist signifikant mit der MAA-KCl ($p=0.0677$) und der MAA+KCl ($p=0.7901$) gleich.

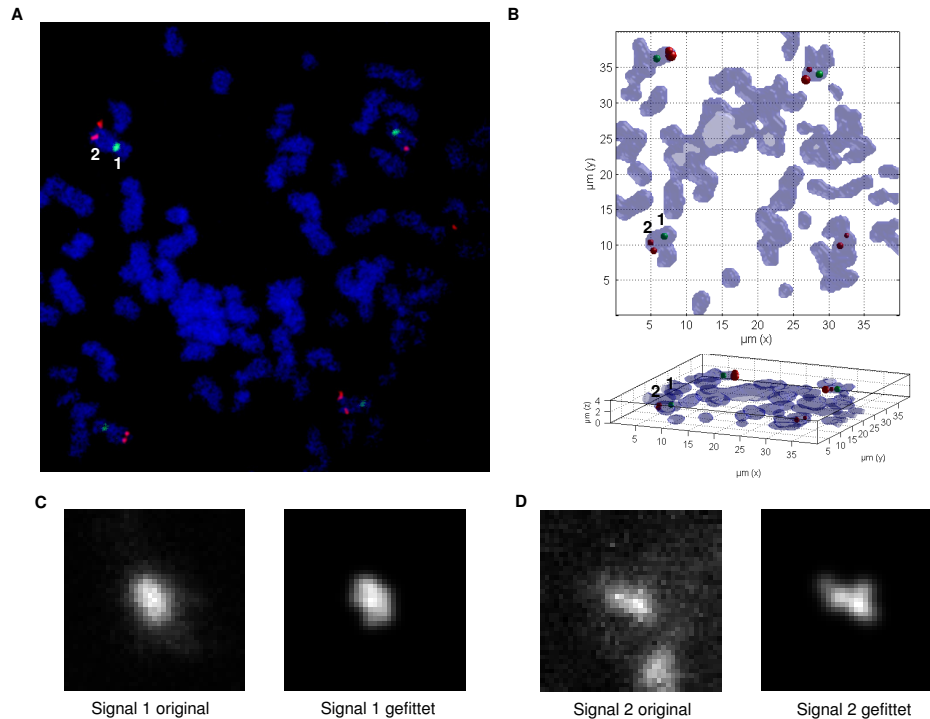


Abbildung 3.28: Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in Metaphasen (MAA + KCl) von LNCAP Zellen

A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 8 (1, grün), 8q24 Gendomäne (2, rot) und DNA-Gegenfärbung (blau) in Metaphase; **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; **C, D** Originale und gefittete Signale von Centromer 8 (1) und 8q24 (2).

Signifikante Unterschiede in der Anisotropie konnten bei den Vergleichen zwischen der Metaphasenpräparation und der PFA-Interphasen-Fixierung ($p=0.0400$) sowie der Metaphasenpräparation und der Interphase-MAA-KCl-Fixierung ($p=0.0063$) festgestellt werden. Insgesamt ist das Centromer 8 in den LNCAP Fibroblasten in allen Phasen ausgedehnt und zeigt in keiner Präparation eine sphärische Form (siehe unter 3.6.1 Tabelle 3.5).

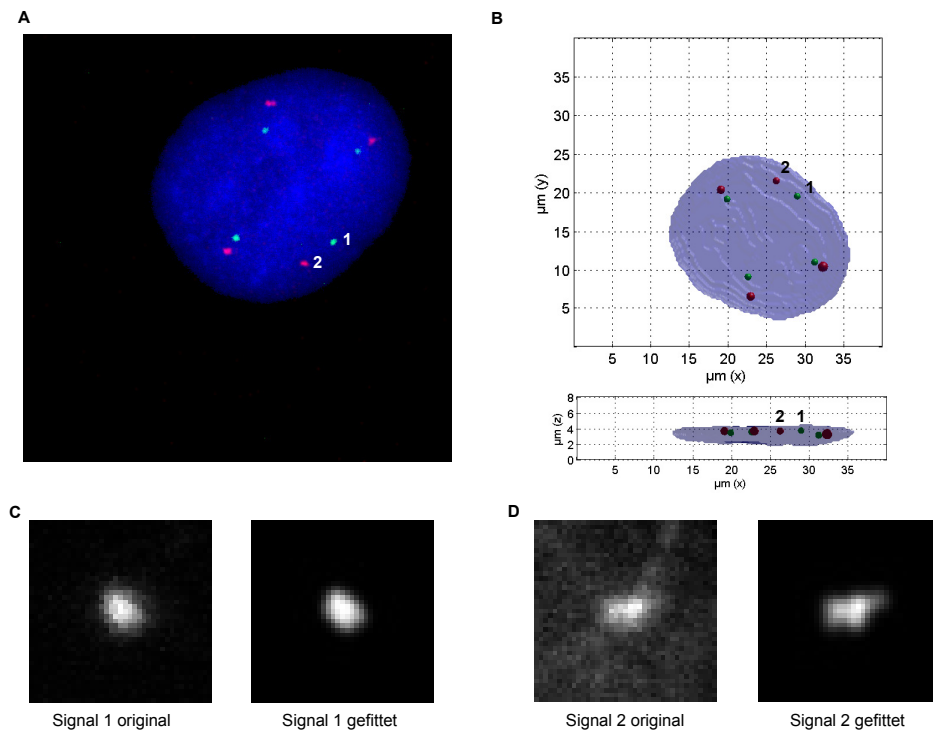


Abbildung 3.29: Centromer 8 und 8q24/c-myc in MAA + KCl fixierten LNCAP Zellen

A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 8 (1, grün), 8q24 Gendomäne (2, rot) und DNA-Gegenfärbung (blau); **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; **C,D** Originale und gefittete Signale von Centromer 8 (1) und 8q24 (2).

Die mittlere Anisotropie der 8q24-Domäne ist in allen Präparationen ausgedehnter als 1 und damit ebenfalls nicht sphärisch. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Ausdehnung für die 8q24-Domäne festgestellt. Die *c-myc*-Domäne ist in den Metaphasechromosomen mit 1.56 ± 0.45 im Mittel weniger ausgedehnt im Vergleich zu der *c-myc*-Domäne in MAA-fixierten KCl-behandelten Signalen mit 1.64 ± 0.61 . Dies ist aber mit $p=0.87722$ nicht statistisch signifikant. Ebenfalls signifikant gleich sind die Signale in den beiden MAA-Suspensionen (IP MAA-KCl: 1.48 ± 0.39 ; $p=0.4108$).

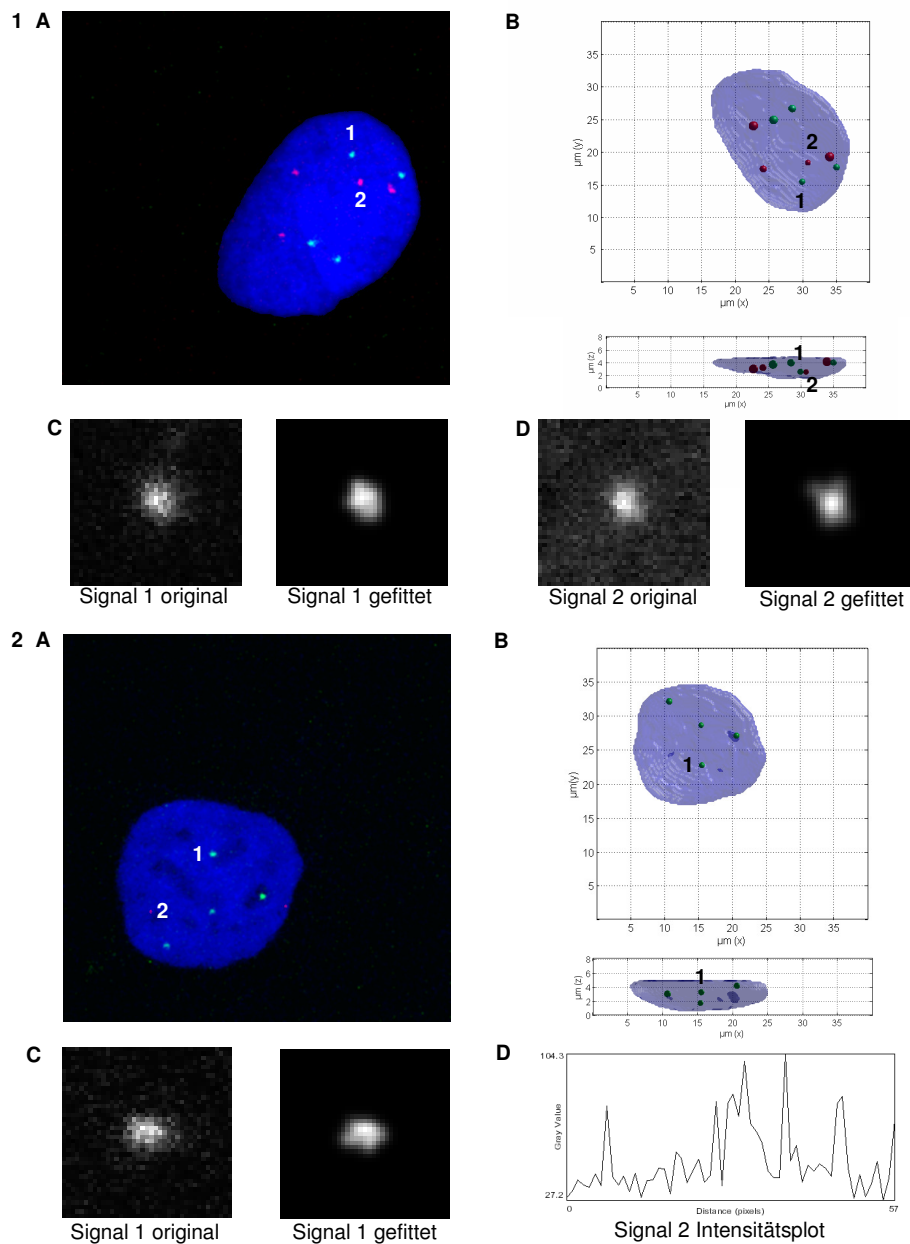


Abbildung 3.30: Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in MAA- (oben, 1) und PFA- (unten, 2) fixierten Interphasekernen von LNCAP Zellen

Oben,1 - A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 8 (1, grün), 8q24 Gendomäne (2, rot) und DNA-Gegenfärbung (blau), **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht, **C,D** Originale und gefittete Signale von Centromer 8 (1) und 8q24 (2); **unten,2 - A** CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 8 (1, grün), 8q24 Gendomäne (2, rot) und DNA-Gegenfärbung (blau), **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht, **C** Originale und gefittete Signale von Centromer 8, **D** Intensitätsplot von 8q24 (2).

3.7 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Prostatakrebsgewebe

Die Aufnahmen der Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitte wurden freundlicherweise von Dr. C. Boxler in Kooperation mit der Universität Karlsruhe gemacht. Die linke Seite der Abbildung 3.31 veranschaulicht einen gesunden Bereich im Prostatakarzinomschnitt. Das Stroma ist leicht transparent und nur mit einer geringen Zahl an Bindegewebs- und Muskelzellen durchsetzt. Die Azini sind durch eine dünne Schicht gleichförmiger kubischer Zellen mit nicht auffälligen Nukleoli begrenzt.

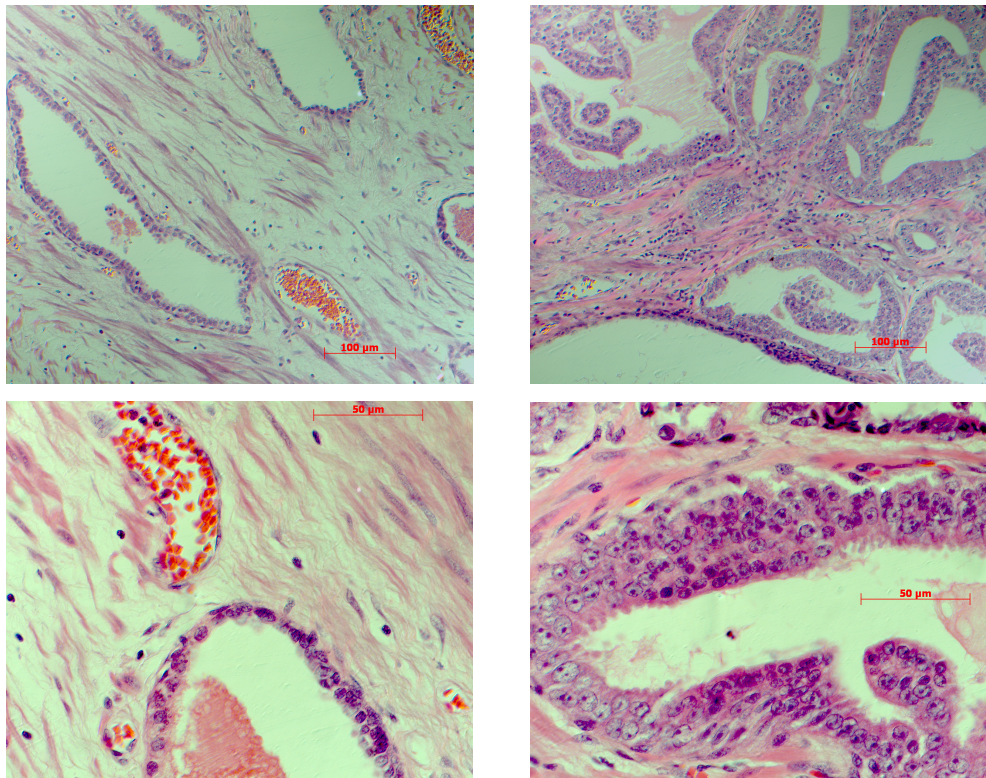


Abbildung 3.31: Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Formalin-fixierten, Paraffin-
eingebetteten Prostatakrebsgewebeschnitt

In der rechten Seite der Abbildung 3.31 sind Ausschnitte aus dem malignen Areal des Schnittes gezeigt. Die Azini sind unregelmäßig im Schnitt verteilt und zeigen neben

einfachen Schichten von relativ gleichförmigen kubischen Zellen auch zahlreiche Zellballen. Jeder der großen runden Zellkerne enthält einen auffallend großen, eosinophilen Nukleolus. Das Stroma zwischen den Azini besteht aus Bindegewebe und wenigen Muskelfasern. Eine Infiltration des eosinopholen Stromas mit soliden Strängen großer Zellen mit hellem, schaumigen Zytoplasma sind nicht zu erkennen. Letzteres läßt auf ein nicht stark differenziertes Karzinom schließen. Kernkörperchen und Mitosefiguren fehlen. Die orangen Objekte stellen Reste von Erythrozyten in den Blutgefäßen dar.

3.8 Bindungsspezifität der Oligo Centromer 9 Sonde in Lymphozyten und PCa-Gewebe

Die einzelsträngige Oligonukleotid-Sonde für das Centromer 9 stellt ein einfaches Beispiel für die Methode der kombinatorischen Oligonukleotid-Fluoreszenz in situ Hybridisierung dar und dient hier der Etablierung der Methodik in Lymphozyten als auch erstmals im Gewebe. Dazu wurde vorerst ausgetestet, ob nukleasefreies Wasser als Lösungsmittel geeignet ist, da aufgrund früherer Experimente angenommen werden konnte, dass lyophilisierte Sonden, resuspendiert in Wasser, zur Klusterbildung neigen. Die Spezifität der Oligonukleotidsonde für das Centromer 9 ist in der Abbildung 3.32 und der Tabelle 3.7 gezeigt.

Zelltyp	Fixierung	Sonde	Signale	n von n Zellen [%]
Lymphozyten	M/AA	CEN9sol	2	87 von 88 [98,9]
Lymphozyten	M/AA	CEN9lyo	2	124 von 129 [96,1]
PCa (gesund)	FFPE	CEN9sol	2	79 von 99 [78,2]
PCa (krank)	FFPE	CEN9sol	2	118 von 127 [92,9]

Tabelle 3.7: Bindungsspezifität der Oligo-Sonde für das Centromer 9

Für die in gelöster Form verwendete Sonde (*OligoCEN9sol*) konnte eine Bindung von 98 % nachgewiesen werden. Bei der Sonde, die nachträglich mit nukleasefreiem Wasser resuspendiert wurde (*OligoCEN9lyo*), erfolgte die Bindung zu 96 %. Die restlichen Prozent stellen Kerne dar, bei denen nur ein Spot erkannt wurde bzw. die Kerne beschädigt waren. Die verwendeten Sondenaliquote *OligoCEN9sol* und *OligoCEN9lyo* zeigen annähernd gleiche Bindungsspezifität mit vernachlässigbarer Klusterbildung. Im weiteren wird trotz der ebenfalls sehr gut geeigneten *OligoCEN9lyo* Sonde die *OligoCEN9sol* Sonde verwendet. Die Spezifität der Sonde wurde mittels *whole chromosome paint* überprüft. Da die Sonde eine Schmelztemperatur von 47,3 °C hat, konnte der *whole chromosome paint* nicht nach den Angaben des Herstellers (65 °C) gewaschen werden.

Weiterhin wurde die Bindung der Sonde im Prostatakrebsgewebe (Abbildung 3.32, Tabelle 3.7) überprüft. In der Abbildung 3.32 ist ein gesunder Bereich des PCa-Gewebeschnittes als Rohdaten (**E**) und nach Schwellwertsetzung (**G**) sowie ein pathologischer Bereich des PCa-Gewebeschnittes als Rohdaten (**F**) und nach Schwellwertsetzung (**H**) dargestellt.

Beim Erstellen der Statistik wurde nicht berücksichtigt, dass unterschiedliche Zelltypen im Gewebeverband vorliegen. Von den ausgezählten 99 Kernen im gesunden Bereich des Gewebes waren 6 (5,9%) ohne Spot und 14 Kerne (13,9%) mit einem Spot. Zusätzlich wurden 33 Kerne erkannt, die nur einen Spot aufwiesen und der Zellkern nicht vollständig war. Im malignem Bereich des Gewebeschnittes wurde ein Kern mit drei (0,8%) Signalen, drei Kerne mit einem Spot (2,3%) und weitere 23 Kerne mit einem Spot sowie beschädigtem Zellkern detektiert. Im gesunden als auch im malignem Gewebe des Prostatakarzinoms liegt das Centromer 9 diploid vor.

3.8 Bindungsspezifität der Oligo Centromer 9 Sonde in Lymphozyten und PCa-Gewebe

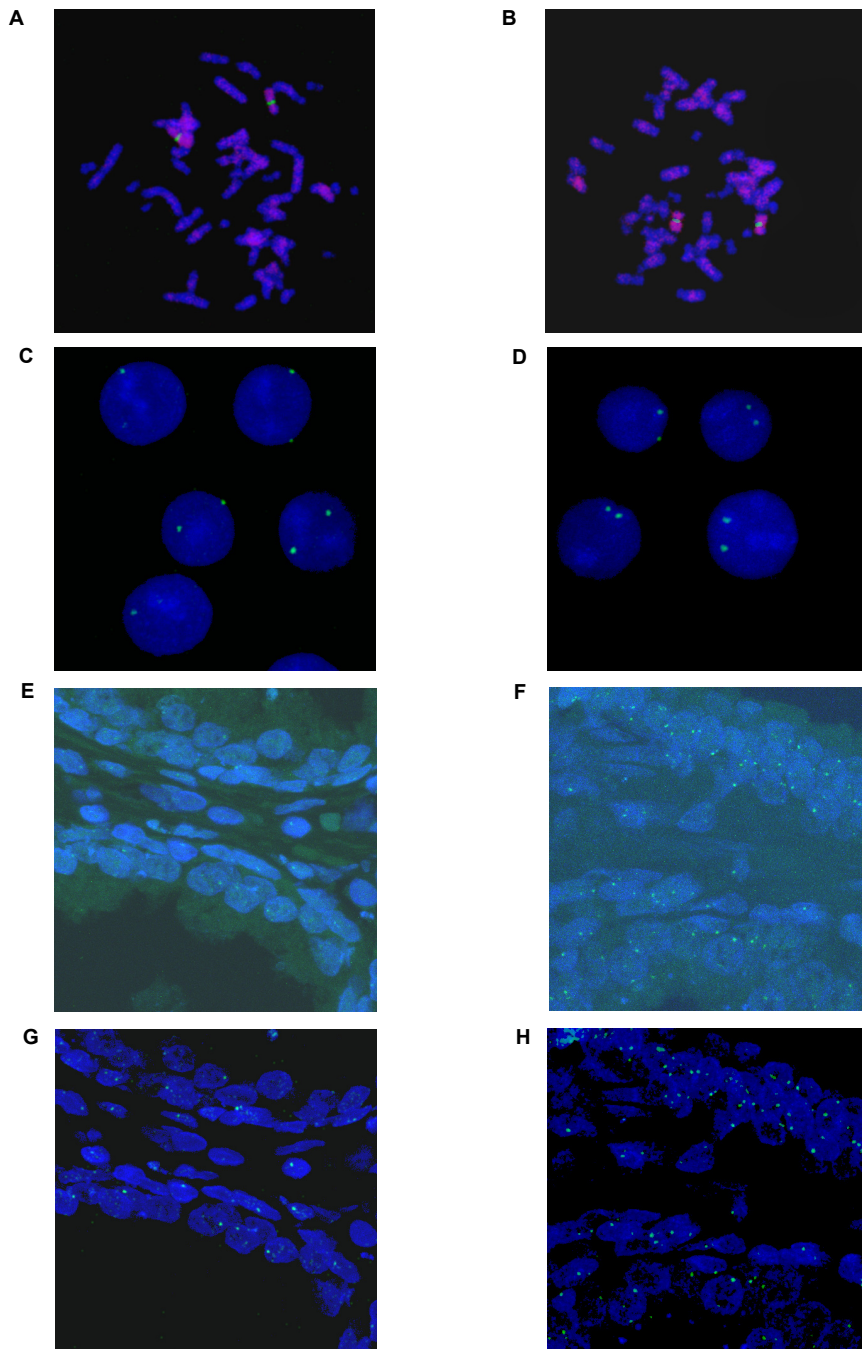


Abbildung 3.32: Bindungsspezifität der Oligo-Sonde für das Centromer 9 in Lymphozyten (A-D) und Gewebe (E-H)

3.9 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten

Die Tabelle 3.8 faßt die mittleren Werte für die laterale Ausdehnung und die Anisotropie zusammen. Die Abbildung 3.33 zeigt die kumulativen Häufigkeiten der lateralen Ausdehnung und der Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten. Das Centromer 9 in Metaphasen von Lymphozyten liegt, im Gegensatz zu den Centromeren in VH7-Metaphasen, verbunden vor. In den Abbildungen 3.34 und 3.35 sind Beispiele für die detektierten Signale in Abhängigkeit der Fixierung und Zellzyklusphase gezeigt.

	laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>)	Anisotropie
Metaphase (MAA+KCl) n=104	556 ± 67 nm	1.95 ± 0.67
Interphase (MAA+KCl) n=92	429 ± 44 nm	1.22 ± 0.18
Interphase (MAA) n=60	416 ± 38 nm	1.21 ± 0.21
Interphase (PFA) n=59	448 ± 54 nm	1.29 ± 0.27

Tabelle 3.8: Mittlere laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten

Das Centromer 9 in MAA und KCl behandelten Metaphasen zeigt eine mittlere laterale Ausdehnung von 556 ± 67 nm, welche signifikant größer ist als die Ausdehnung in MAA und KCl behandelten Interphasen von 429 ± 44 nm ($p=1.4805e-026$). Auch die Anisotropie zeigt, trotz hoher Standardabweichung, signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Präparationen ($p=5.2212e-018$), wobei die Signale der Metaphasenhybridisierung um den Faktor 1.6 ausgedehnter vorliegen als die der Interphasenhybridisierung.

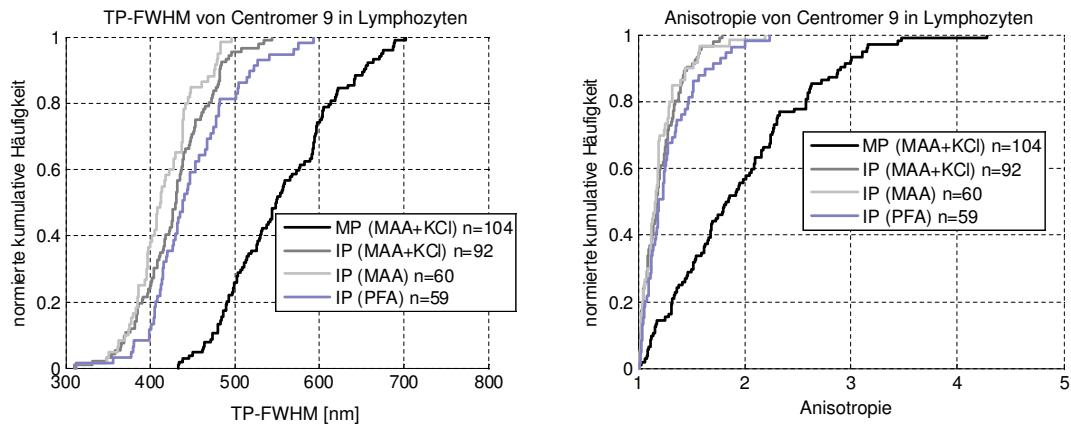


Abbildung 3.33: Laterale Ausdehnung (*TP-FWHM*) und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten

Die KCl-Behandlung vor der Fixierung mit Methanol/Eisessig hat keinen signifikanten Einfluss auf die laterale Ausdehnung von Centromer 9 in MAA-fixierten Präparaten ($TP-FWHM_{(MAA+KCl)} = 416 \pm 38 \text{ nm}$; $p=0.0895$). Centromer 9, markiert in PFA-fixierten Zellkernen, ist signifikant 1.08 mal größer im Vergleich zu der Markierung mit MAA ohne KCl ($p=0.0138$).

Der Vergleich der PFA-Fixierung mit der MAA+KCl-Fixierung hingegen zeigt keinen signifikanten Unterschied in der lateralen Ausdehnung von Centromer 9 in Interphasekernen ($p=0.3312$). Hinsichtlich der Anisotropie von Centromer 9 in den drei verschiedenen Präparationen der Interphasekerne konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In allen drei Fällen sind die Signale annähernd sphärisch (siehe Tabelle 3.8).

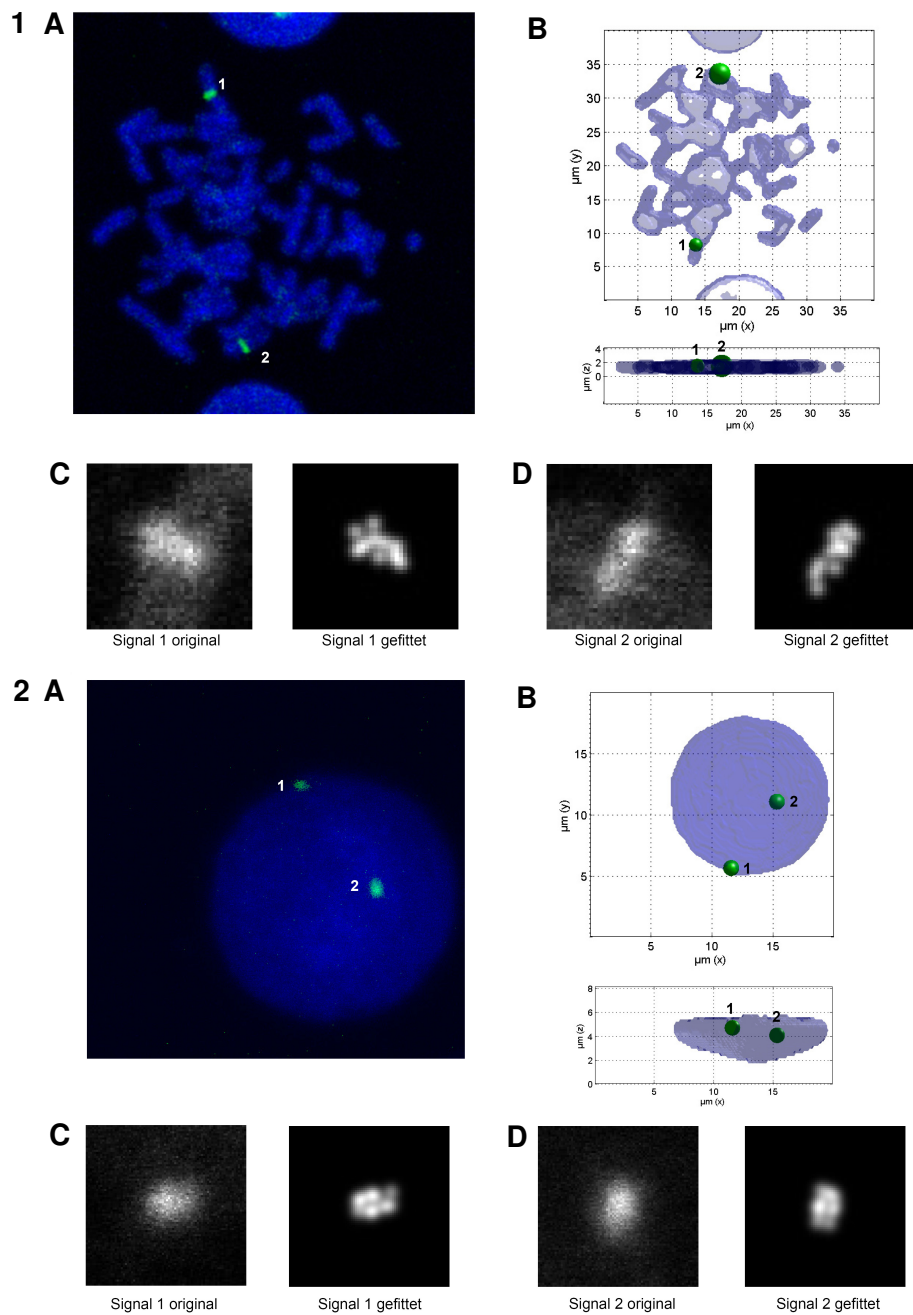


Abbildung 3.34: Centromer 9 Oligo-Sonde in Metaphasechromosomen (oben,1) und Interphasekern (unten,2) von Lymphozyten (MAA, 75 mM KCl)

A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 9 und DNA-Gegenfärbung; **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; **C,D** Originale (links) und gefittete (rechts) Signale

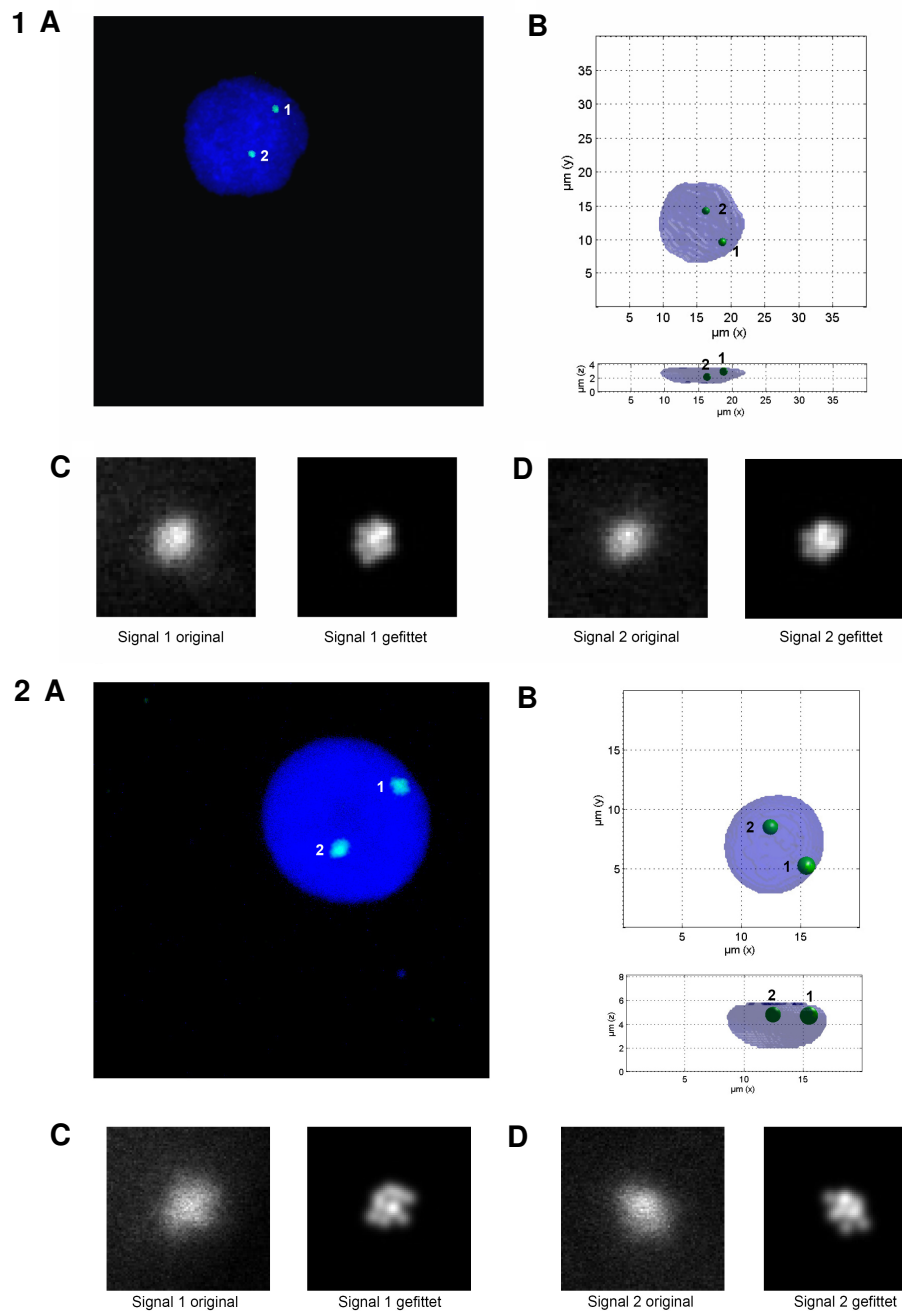


Abbildung 3.35: Centromer 9 Oligo-Sonde in Interphasekernen von Lymphozyten fixiert mit MAA ohne KCl (oben,1) und PFA (unten,2)

A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 9 und DNA-Gegenfärbung; **B** Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; **C,D** Originale (links) und gefittete (rechts) Signale

3.10 Laterale Ausdehnung und Anisotropie von Centromer 9 in PCa-Gewebe

Für die folgenden Messungen werden nur die Bindegewebszellen (Fibroblasten) ausgewertet, da sich der Hauptanteil der Zellexperimente ebenfalls auf Fibroblasten bezieht. In der Abbildung 3.37 ist jeweils ein Beispiel für Fibroblasten mit dem markierten Centromer 9 im gesunden und pathologischen (malign) Bereich des Gewebeschnittes dargestellt.

	laterale Ausdehnung ($TP-FWHM$)	Anisotropie
gesunder Bereich n=71	398 ± 57 nm	1.58 ± 0.48
kranker Bereich n=112	360 ± 45 nm	1.55 ± 0.45
Faktor gesund/pathologisch	1.11	1.02
SD	$p=3.2258e-005$	$p=0.8518$

Tabelle 3.9: Mittlere laterale Ausdehnung ($TP-FWHM$) und Anisotropie von Centromer 9 im PCa

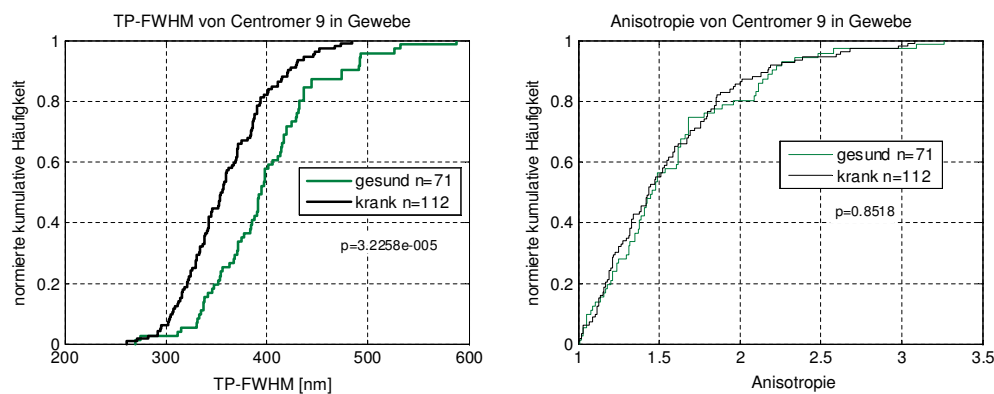


Abbildung 3.36: Laterale Ausdehnung ($TP-FWHM$) und Anisotropie von Centromer 9 im PCa

Die Abbildung 3.36 zeigt die kumulativen Häufigkeiten der lateralen Ausdehnung (*TP-FWHM*) sowie die Anisotropie des Centromers 9 in Fibroblasten als Vergleich zwischen Zellen aus gesunden mit denen aus pathologischen Arealen des Schnittes. Die Unterscheidung zwischen normalen und pathologischen Bereichen des Gewebeschnittes wurde zu Beginn der Arbeit von Prof. Gröne vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg getroffen und mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung im Kapitel 3.7 visualisiert. Die mittlere laterale Ausdehnung des Centromer 9 im Prostatakrebsgewebe beträgt im gesunden $398 \pm 57\text{nm}$ und im kranken Bereich $360 \pm 45\text{nm}$. Der KS-Test zeigt, dass die Unterschiede signifikant sind ($p=3.2258e-005$). Das Centromer 9, markiert mit einer Oligo-Sonde, ist im gesunden Areal des Schnittes um den Faktor 1.11 größer als im kranken Bereich. Die Anisotropie des markierten Centromer 9 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fibroblasten der entsprechenden Bereiche ($p=0.8518$). In beiden Fällen ist das Centromer 9 leicht ausgedehnt mit 1.58 ± 0.48 im gesunden und mit 1.55 ± 0.45 im kranken Teil des Gewebeschnittes.

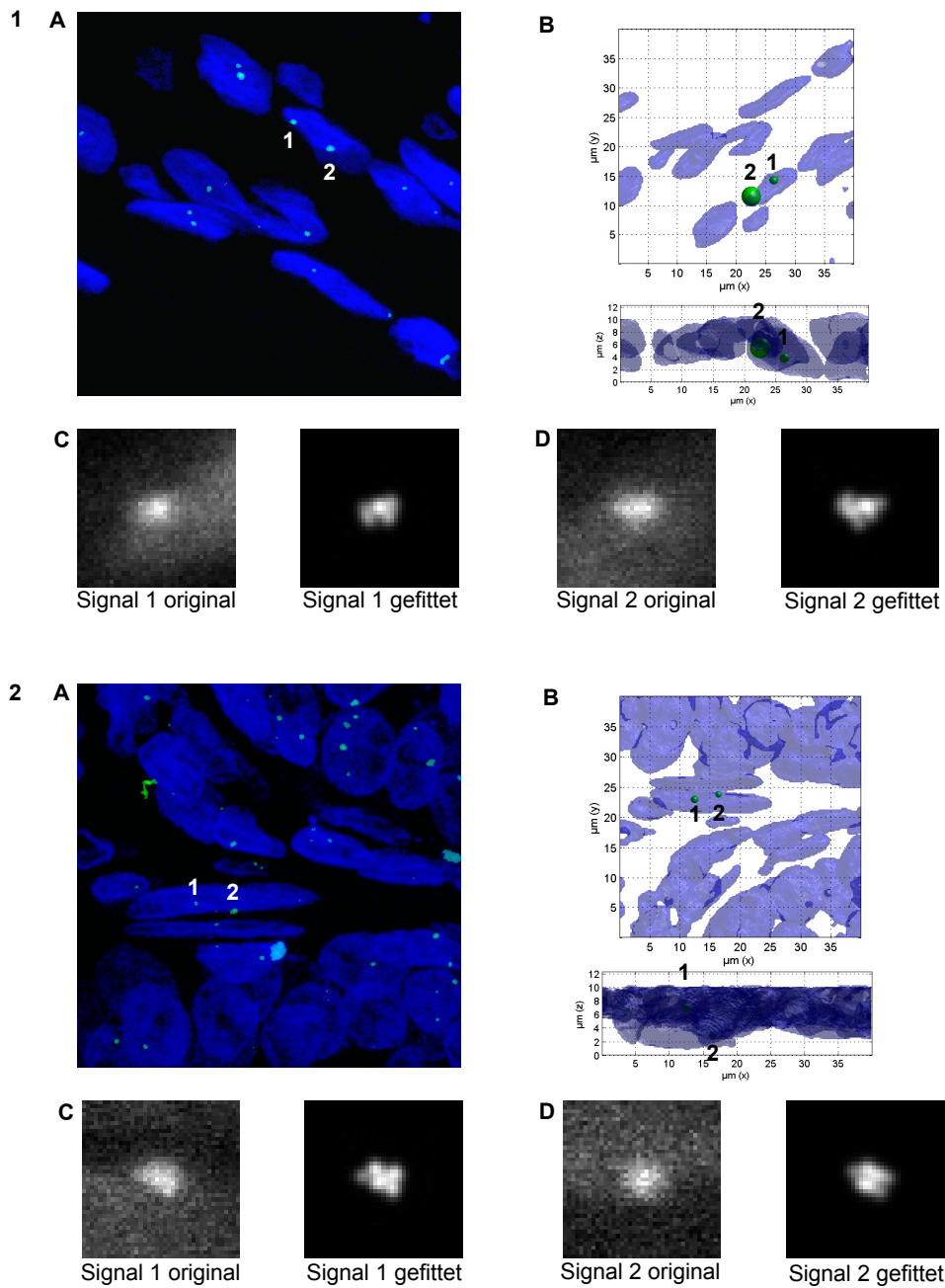


Abbildung 3.37: Centromer 9 Oligo-Sonde in Fibroblasten des normalen (obere Box) und pathologischen (untere Box) Bereichs des PCa

A CLSM-Aufnahme mit markiertem Centromer 9 und DNA-Gegenfärbung; B Detektierte Objekte der CLSM-Aufnahme, gespiegelt und gedreht; C,D Originale (links) und gefittete (rechts) Signale

3.11 Laterale Ausdehnung subchromosomaler Domänen vs. laterale Ausdehnung der Zellkerne

Im Folgenden sind die mittleren lateralen Ausdehnungen der subchromosomalen Domänen (Centromer 9, Centromer 8, 8q24/*c-myc*) in Bezug auf die mittlere laterale Ausdehnung der dazugehörigen Zellkerne korrelativ dargestellt. Bei den runden Zellkernen der Lymphozyten (Abbildung 3.40) wurde die mittlere laterale Ausdehnung aus der x- und y-Ausdehnung gemittelt (siehe Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.1). Bei den ellipsoiden Fibroblastenzellkernen wurde aus dem Volumen V der Kerne der Äquivalenzradius r für eine Kugel aus

$$r = \sqrt[3]{V_{\text{Ellipsoid}} \frac{3}{4\pi}} \quad (3.1)$$

berechnet und in Bezug zur lateralen Ausdehnung von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* gesetzt. Die mittleren Werte für die Zellkernausdehnung von VH7 Fibroblasten sind im Kapitel 3.1.2, die von den LNCAP Fibroblasten im Kapitel 3.1.3 ausführlich dargestellt.

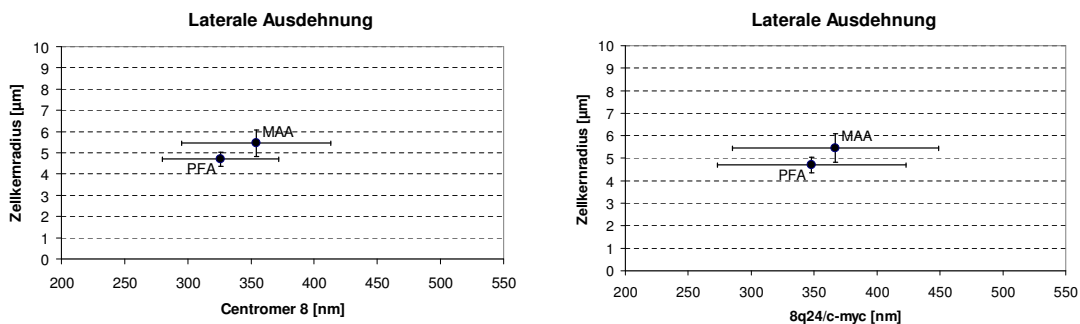


Abbildung 3.38: Korrelation der lateralen Ausdehnung ($TP-FWHM$) von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* mit dem lateralen Äquivalenzradius der Zellkerne von VH7 Fibroblasten

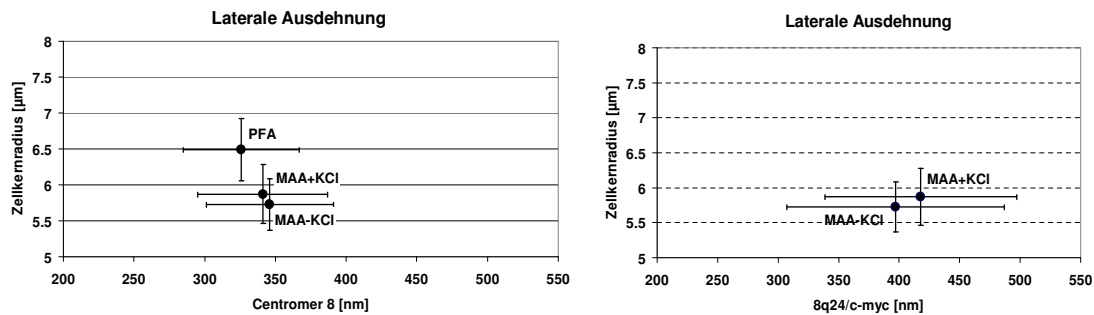


Abbildung 3.39: Korrelation der lateralen Ausdehnung (*TP-FWHM*) von Centromer 8 und 8q24/c-myc mit dem lateralen Äquivalenzradius der Zellkerne von LNCAP Fibroblasten

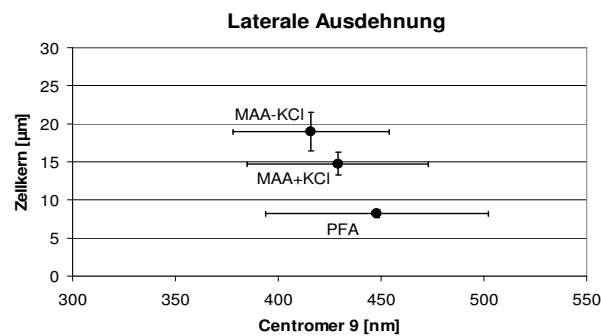


Abbildung 3.40: Korrelation der lateralen Ausdehnung (*TP-FWHM*) von Centromer 9 mit der lateralen Ausdehnung der Zellkerne von Lymphoyten

3.12 Modulationstiefe von 100 nm Beads

Mittels des SMI-Mikroskops sind Größenmessungen von sphärischen Objekten möglich, die kleiner sind als die Auflösung des konfokalen Mikroskops. Grundlage dieser Größenmessungen ist die Bestimmung der Tiefe der Modulation. Die Modulationstiefe der Signale beträgt Null, wenn keine Modulation vorliegt und steigt mit sinkender Objektgröße

bis annähernd eins an. Zur Kalibration des Wellenfeldes des SMI-Mikroskops wurden Beads verwendet, die laut Hersteller einen Durchmesser von 100 nm besitzen und damit unterhalb der Auflösung des CLSM liegen. Da bei der Hybridisierung eine *Dual Colour Probe* für das simultane Markieren des Centromer 8 und der 8q24-Gendomäne verwendet wurde, wurden entsprechend der Wellenlängen Beads präpariert, die ihr Absorptionsspektrum bei 488 nm (Centromer) und 568 nm (Gendomäne) haben. Die hier vorgestellten Auswertungen der beiden Wellenlängen stellen jeweils Einzelmessungen dar, die zufällig aus zahlreichen Messungen ausgewählt wurden. Die Tabelle 3.10 zeigt die Mittelwerte für die Messungen der Modulationstiefe und der axialen Ausdehnung der 100 nm Beads beider Wellenlängen. In den Abbildungen 3.41 und 3.43 sind auf der linken Seite die schwarz/weiß-SMI-Bilder (oben) mit den erkannten Objekten (unten, mit Farbkodierung) sowie auf der rechten Seite die Modulationstiefen (oben) und die ermittelten axialen Ausdehnungen (unten) dargestellt. Die dazugehörigen axialen Intensitätsverteilungen sind bezüglich der Wellenlängen beispielhaft in den Abbildungen 3.42 und 3.44 gezeigt.

	$\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$	$\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$
Modulationstiefe	0.64 ± 0.08	0.77 ± 0.07
Axiale Ausdehnung in nm	107 ± 15	97 ± 14
erfolgreich gefittet in %	89	76

Tabelle 3.10: Mittlere Modulationstiefe und axiale Ausdehnung von 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$ und $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$

Die Modulationstiefen der 100 nm Beads beider Wellenlängen unterscheiden sich signifikant mit $p=7.0933e-011$. Die Beads mit $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$ modulieren in diesem Fall stärker als die Beads mit $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$. Die ermittelten axialen Größen unterscheiden sich ebenfalls signifikant ($p=2.8238e-004$), trotz gleichem Durchmesser, wobei die Größe der 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$ überschätzt und bei $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$ unterschätzt wurden (siehe Tabelle 3.10).

3 Ergebnisse

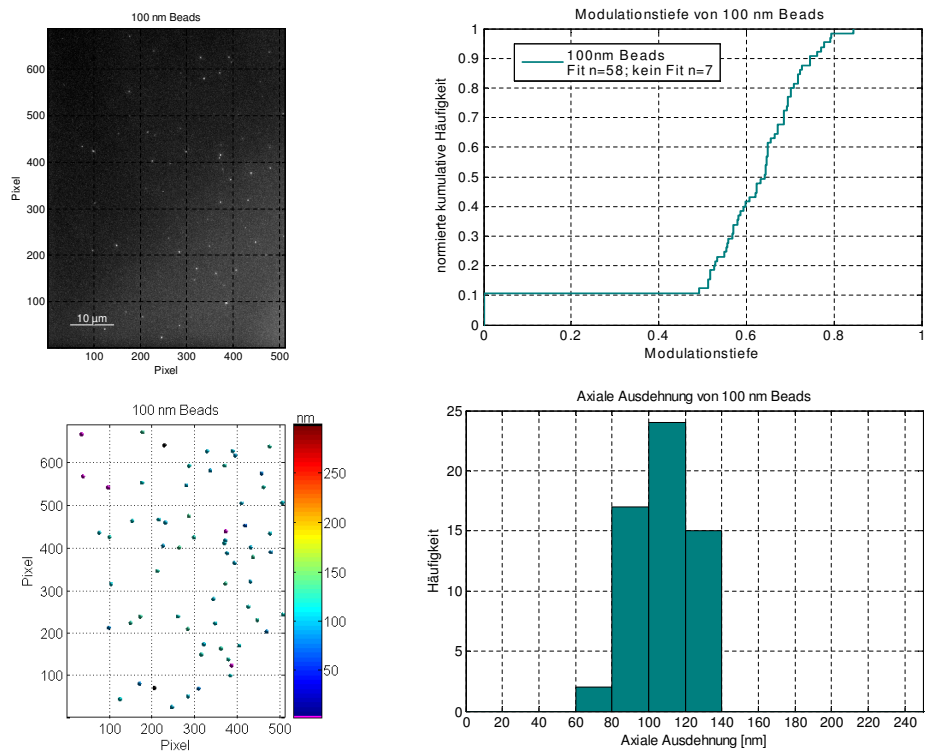


Abbildung 3.41: Modulationstiefe von 100 nm Beads bei $\lambda_{\text{Absorption}}=488\text{nm}$

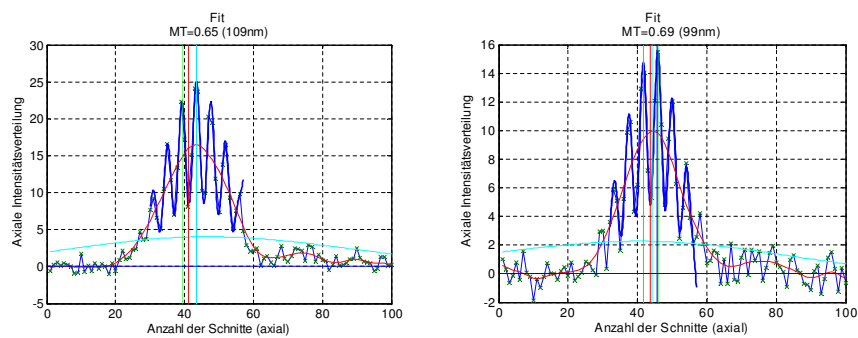


Abbildung 3.42: Axiale Intensitätsverteilung zweier 100 nm Beads bei $\lambda_{\text{Absorption}}=488\text{nm}$

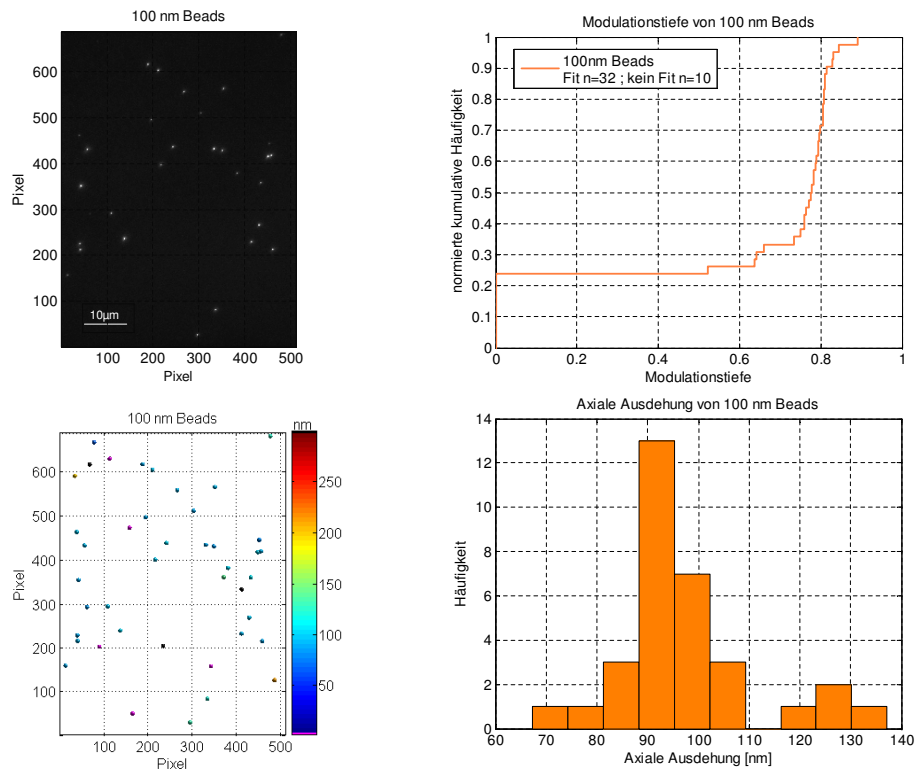


Abbildung 3.43: Modulationstiefe von 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$

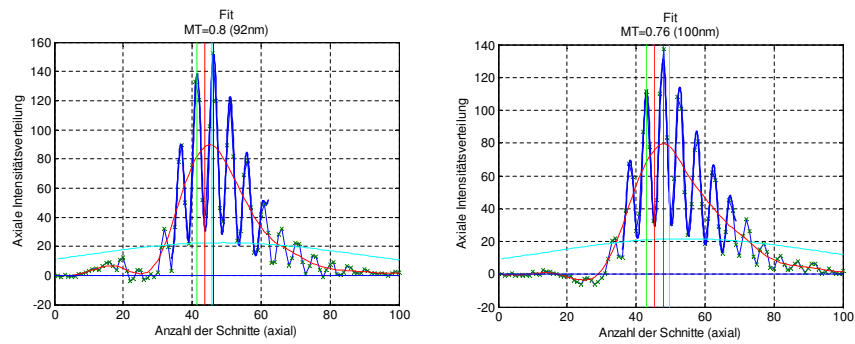


Abbildung 3.44: Axiale Intensitätsverteilung zweier 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$

3.13 Modulationstiefe von Centromer 8 und 8q24/c-myc in VH7

Um nachzuweisen, dass die subchromosomalen Domänen größer als das Limit der optischen Auflösung des CLSM sind, wurden Messungen mittels SMI-Mikroskopie durchgeführt. Alle Signale, welche nicht gefittet haben, wurden gleich null gesetzt. Ursachen für ein Nicht-fitten der Objekte liegen beispielsweise im schlechten Signal/Rausch-Verhältnis. Auch zu kleine oder zu große Objekte werden nicht gefittet. In der Abbildung 3.46 sind, entsprechend der Präparationen, Beispiele der Centromer 8 Markierung mit exemplarischen Modulationskurven gezeigt. Die Abbildung 3.45 vergleicht die Modulationstiefen (MT) von Centromer 8 in VH7 Zellen in Metaphasechromosomen mit denen in Interphasechromatin.

Zellstadium	Centromer 8 (erfolgreich gefittet in %)	8q24/c-myc (erfolgreich gefittet in %)
Metaphase (MAA)	0.09 ± 0.04 (32)	0.25 ± 0.07 (42)
Interphase (MAA)	0.23 ± 0.11 (87)	0.36 ± 0.17 (77)
Interphase (PFA)	0.14 ± 0.05 (44)	0.32 ± 0.11 (62)

Tabelle 3.11: Mittlere Modulationstiefen von Centromer 8 und 8q24/c-myc in VH7

Die mittlere Modulationstiefe des markierten Centromer 8 in Metaphasechromosomen (MAA) beträgt 0.09 ± 0.04 und ist signifikant geringer als die Modulationstiefe des Centromer 8 in Methanol/Eisessig fixierten Interphasekernen mit einem mittleren Wert von 0.23 ± 0.11 ($p=5.0568e-011$). Das Centromer 8 in PFA-fixierten Interphasekernen zeigt mit 0.14 ± 0.05 eine signifikant geringere Modulationstiefe im Vergleich zu den MAA-Präparat (Interphase) ($p=1.0589e-004$). Auffällig ist, dass bei dem Metaphase-MAA-Präparaten (32 %) und bei dem Interphase-PFA-Präparat (44 %) weniger als die Hälfte der detektierten Signale modulieren.

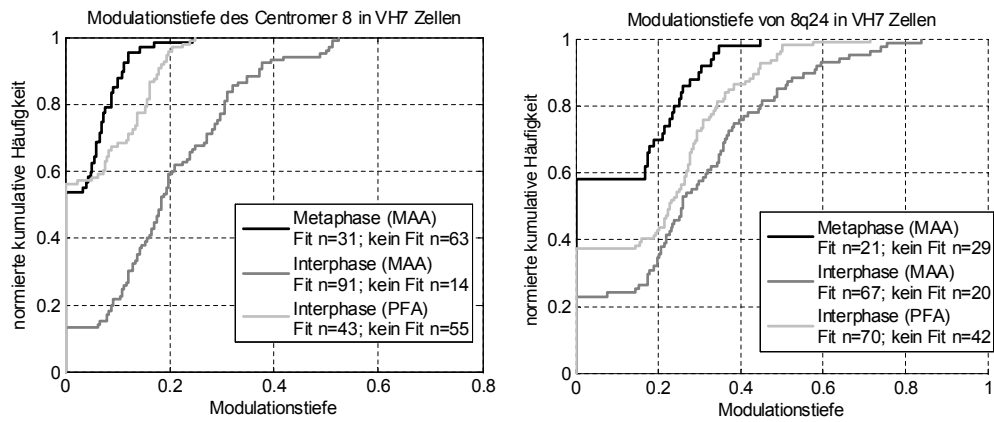


Abbildung 3.45: Modulationstiefe von Centromer 8 und 8q24 in VH7

In der Abbildung 3.46 C ist zu erkennen, dass bei den PFA-fixierten Zellen der Hintergrund sehr hoch ist. Bei den MAA-fixierten Proben ist ein reduzierter Hintergrund zu erkennen, was mit einer höheren Fitrates in Beziehung gesetzt werden kann. Bei den Metaphasesignalen wurden die, die nicht als getrennt detektiert worden sind, aus der Analyse ausgeschlossen und als nichtfittend deklariert, ebenso wie die zu kleinen Objekte. In den gleichen Präparaten wurde auch hier die Modulationstiefe der 8q24 Gendomäne bestimmt. Von insgesamt 50 Signalen der markierten c-myc Region in Metaphasen haben 21 (42 %) mit einer durchschnittlichen Modulationstiefe von 0.25 ± 0.07 erfolgreich gefittet. Im Vergleich zu den Signalen der ebenfalls MAA-fixierten Interphasekernen ist die Modulationstiefe von 0.36 ± 0.17 signifikant höher ($p=1.4431e-004$) als bei den Metaphasesignalen. Entsprechend der Ergebnisse des Centromer 8 in MAA-fixierten Interphasekernen konnte auch für die Genregion eine höhere Rate der erfolgreichen Fits festgestellt werden (77%). Bei den PFA-fixierten Kernen haben von insgesamt 112 Signalen 70 (62 %) erfolgreich gefittet. Die mittlere Modulationstiefe der Signale der 8q24 Genregion in PFA-fixierten Interphasen beträgt 0.32 ± 0.11 und ist signifikant gleich verglichen mit den MAA-fixierten Interphasekernen ($p=0.0731$). In der Abbildung 3.47 ist auch ein erhöhter Hintergrund bei der PFA-Fixierung und ein geringer bei den MAA-Präparationen (Metaphase, Interphase) zu erkennen.

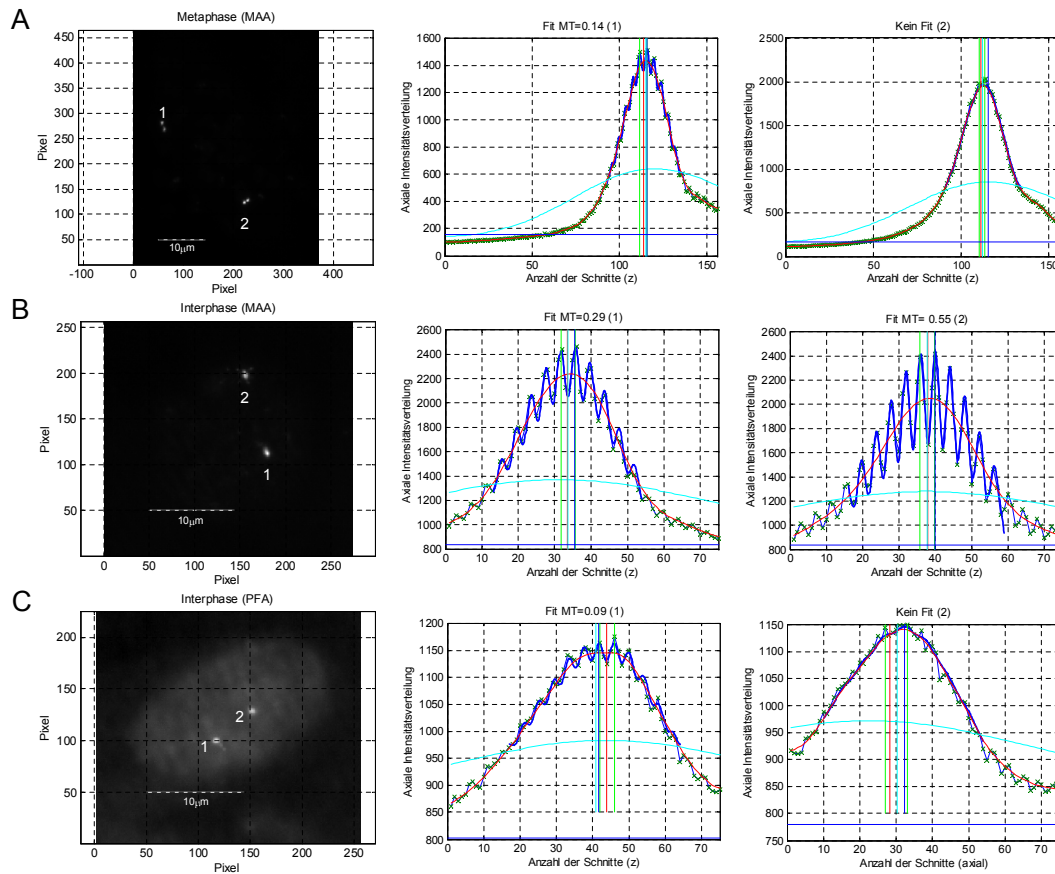


Abbildung 3.46: Centromer 8 markiert in Metaphasechromosomen und Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7 Zellen

A Centromer 8 in Metaphase (MAA) mit Fit (1) und ohne Fit (2). **B** Centromer 8 in Interphase (MAA) mit zwei Fitkurven. **C** Centromer 8 in Interphase (PFA) mit Fit (1) und ohne Fit (2).

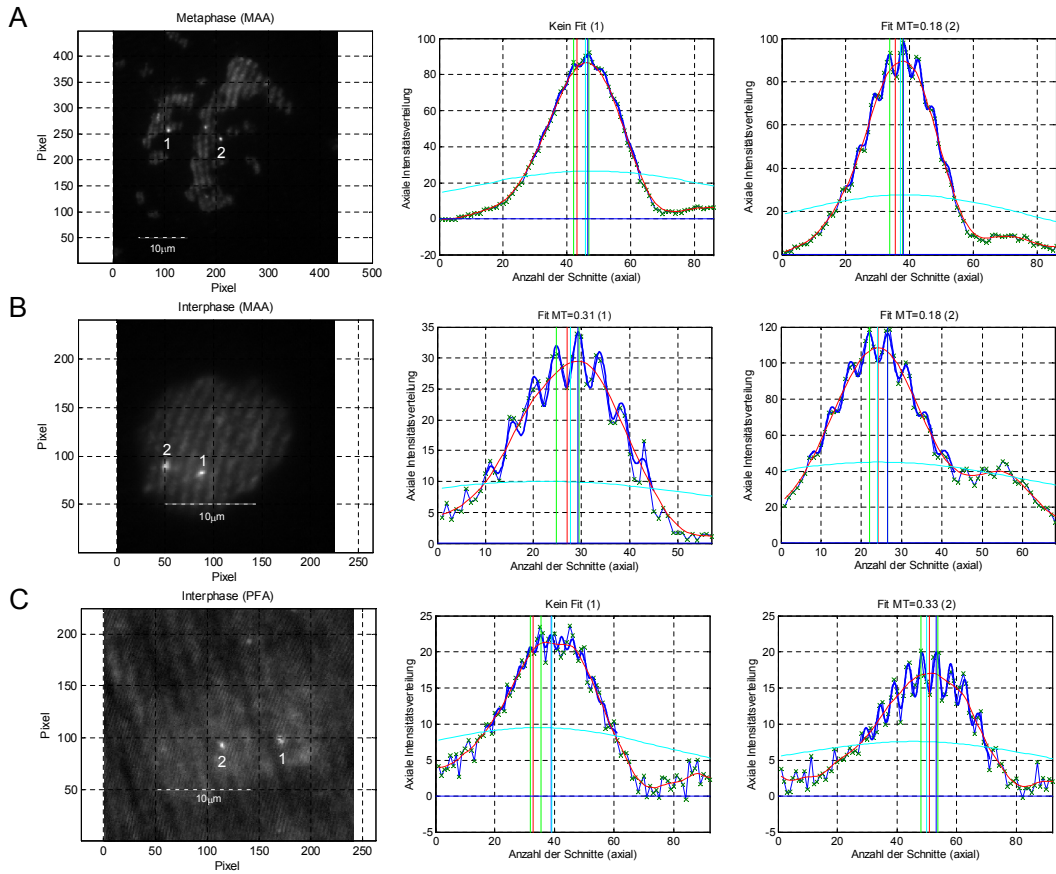


Abbildung 3.47: 8q24/c-myc Gendomäne markiert in Metaphasechromosomen und Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7 Zellen

A 8q24 in Metaphase (MAA) ohne Fit (1) und mit Fit (2). **B** 8q24 in Interphase (MAA) mit zwei Fitkurven. **C** 8q24 in Interphase (PFA) ohne Fit (1) und mit Fit (2).

3.14 Radiale Lage und Distanz von Centromer 8 und 8q24/c-myc

Zur Bestimmung der relativen radialen Position wurden die Zellkerne in fünf Schalen eingeteilt, die jeweils eine Größe von 20 % besitzen und von 0 % bis 100 % auf den Radius skaliert sind.

3.14.1 VH7

In der Tabelle 3.12 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Bestimmung der radialen Lage und der Distanz der markierten Domänen der beiden Fixierungen zusammengefasst. Die Abbildungen 3.48 und 3.49 stellen die Ergebnisse grafisch als kumulative Häufigkeiten dar.

Fixierung	Relative radiale Position [%]			Distanz [μm]		
	Centromer 8	8q24/c-myc	SD	Centromer 8	8q24/c-myc	SD
MAA	59,6 \pm 28,7 (n=51)	60,4 \pm 25,8 (n=46)	$p=1.0000$	6,80 \pm 3,66 (n=26)	8,94 \pm 4,51 (n=23)	$p=0.0994$
PFA	49,6 \pm 20,1 (n=132)	55,7 \pm 19,3 (n=108)	$p=0.0112$	6,84 \pm 3,86 (n=66)	9,93 \pm 4,34 (n=54)	$p=1.7052e-004$
SD	$p=0.0438$	$p=0.4936$		$p=0.9452$	$p=0.2501$	

Tabelle 3.12: Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den Homologen von Centromer 8 und 8q24/c-myc in VH7 Fibroblasten

Die radiale Position des Centromer 8 in VH7 Zellen, welche mittels Methanol/Eisessig fixiert wurden, liegt mit 59,6 \pm 28,7 % signifikant weiter außen als das Centromer 8 in PFA-fixierten Kernen mit einer radialen Lage von 49,6 \pm 20,1 % ($p=0.0438$). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fixierungen sind bei der Betrachtung der radialen Lage der Genregion 8q24 zu verzeichnen ($p=0.4936$). Die mittlere radiale Position von 8q24 der MAA-Fixierung liegt im Mittel bei 60,4 \pm 25,8 % des Kernradius, die der

PFA-Fixierung bei $55,7 \pm 19,3$ %. Bei beiden Fixierungen liegt die markierte Genregion 8q24 weiter zum Rand hin als das Centromer, wobei diese Feststellung nur bei der PFA-Fixierung signifikant unterschiedlich ist ($p=0.0112$).

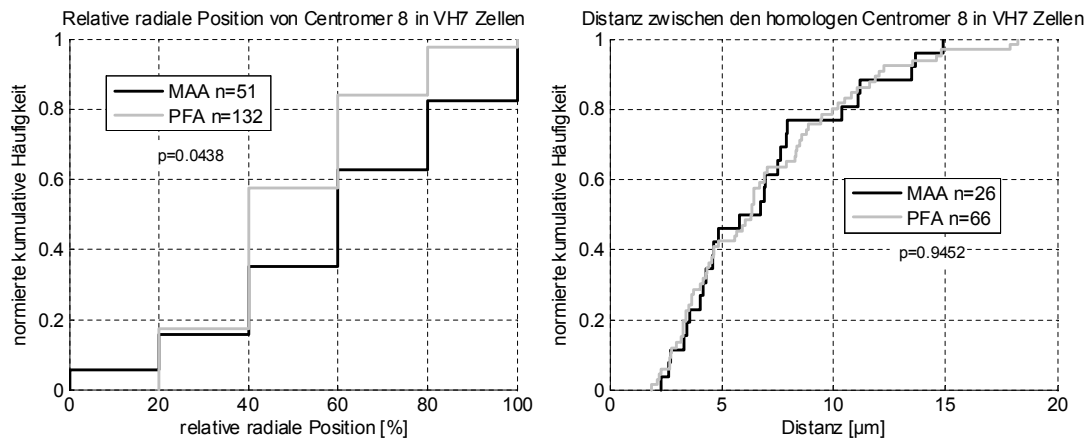


Abbildung 3.48: Relative radiale Position und Distanzen von Centromer 8 in Interphasenzellkernen (MAA, PFA) von VH7

Die mittlere Distanz zwischen den beiden Centromer 8 Signalen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Fixierungen ($p=0.9452$). Bei der MAA-Fixierung haben die homologen Centromere eine Distanz von $6,80 \pm 3,66$ μm und bei den PFA-fixierten Kernen eine Distanz von $6,84 \pm 3,86$ μm . Die Distanz der *c-myc*-Homologen in den beiden Fixierungen ist mit $p=0.2501$ signifikant gleich.

Innerhalb der Fixierungen ist die Distanz zwischen den *c-myc*-Homologen größer als die Distanz zwischen den Centromeren, wobei wieder nur bei der PFA-Fixierung signifikante Distanzunterschiede vorliegen ($p=1.70523-004$).

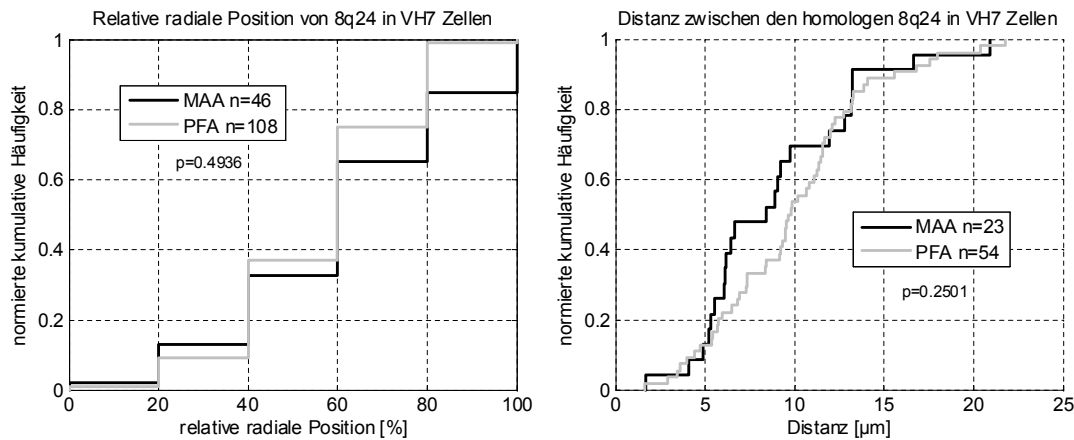


Abbildung 3.49: Relative radiale Position und Distanzen von 8q24 in Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7

3.14.2 LNCAP

Aufgrund der Tetraploidie der LNCAP Zellen hinsichtlich Chromosom 8 wird an dieser Stelle nur die radiale Lage ausgewertet. Zusätzlich zu den Fixierungen mit MAA und PFA (siehe VH7 Präparate) wurde bei den LNCAP Fibroblasten zusätzlich eine hypotone MAA-Zellsuspension (75mM KCl) verwendet.

Das Centromer 8 in LNCAP Fibroblasten der MAA+KCl-Suspension liegt mit $45,2 \pm 22,9$ % nahe der zweiten Schale und unterscheidet sich signifikant von der weiter zum Rand hin verlagerten Position des Centromer 8 markiert in MAA-fixierten Kernen ($52,7 \pm 21,4$ %; $p=0.0734$). Das Centromer 8 in PFA-fixierten Zellen befindet sich mit $65,9 \pm 22,0$ % in der Nähe der dritten Schale und ist damit am weitesten außen lokalisiert. Zwischen der Position von Centromer 8 in MAA-fixierten Zellen und der Position in PFA-fixierten Zellen gibt es signifikante Unterschiede ($p=1.3439e-006$), wie auch beim Vergleich zwischen MAA+KCl-Fixierung und PFA-Fixierung ($p=1.2172e-008$).

3.14 Radiale Lage und Distanz von Centromer 8 und 8q24/*c-myc*

Fixierung	Relative radiale Position [%]		SD
	Centromer 8	8q24/ <i>c-myc</i>	
MAA+KCl	45,2 ± 22,9 (n=170)	55,8 ± 20,3 (n=161)	$p=8.4820e-004$
MAA	52,7 ± 21,4 (n=153)	57,1 ± 18,7 (n=145)	$p=0.0296$
PFA	65,9 ± 22,0 (n=95)		
SD (MAA+KCl/MAA)	$p=0.0734$	$p=0.7118$	
SD (MAA/PFA)	$p=1.3439e-006$		
SD (MAA+KCl/PFA)	$p=1.2172e-008$		

Tabelle 3.13: Mittlere relative radiale Position von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in LNCAP Fibroblasten

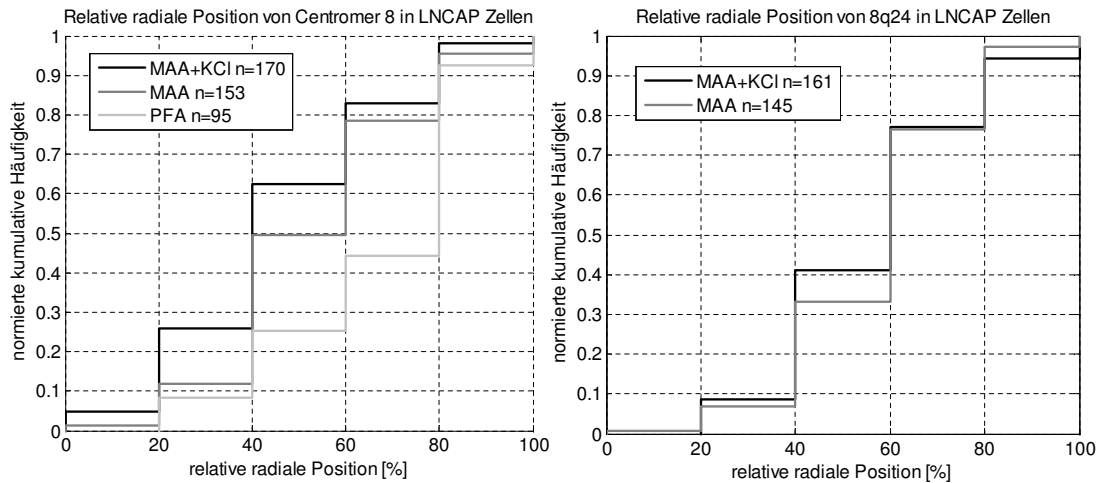


Abbildung 3.50: Mittlere radiale Position von Centromer 8 und 8q24/*c-myc* in LNCAP Fibroblasten

Die markierte Genregion 8q24 ist in den beiden MAA-Fixierungen jeweils signifikant weiter zum Rand hin positioniert als die Centromere der entsprechenden Suspensionen (siehe Tabelle 3.13). Diese, teils signifikante Verlagerung, wurde schon bei den VH7 Zellen festgestellt (siehe 3.14.1). Die radiale Lage von 8q24 in MAA+KCl-fixierten ($55,8 \pm 20,3$ %) und die der MAA-fixierten Zellen ($57,1 \pm 18,7$ %) unterscheidet sich nicht signifikant ($p=0.7118$). Beide sind etwas unterhalb der 60 % Schale zu finden.

3.15 Radiale Lage und Distanz von Centromer 9 in Lymphozyten

Die Tabelle 3.14 faßt die Werte für die mittlere radiale Position sowie die Distanz zwischen den homologen Centromer 9 in Lymphozyten unterschiedlicher Fixierung zusammen. In der Abbildung 3.51 sind die Datensätze als kumulative Häufigkeiten der Messungen der radialen Lage und der Distanzen der verschiedenen Fixierungen aufgetragen.

Fixierung	Relative radiale Position [%]	Distanz [μm]
MAA+KCl	$44,8 \pm 27,5$ (n=75)	$6,5 \pm 2,4$ (n=36)
MAA	$37,7 \pm 23,6$ (n=52)	$6,3 \pm 2,2$ (n=25)
PFA	$67,4 \pm 16,6$ (n=54)	$4,2 \pm 1,4$ (n=29)
SD (MAA+KCl/MAA)	$p=0.4128$	$p=0.997$
SD (MAA/PFA)	$p=6.0279e-011$	$p=7.6601e-004$
SD (MAA+KCl/PFA)	$p=1.1907e-007$	$p=2.1547e-004$

Tabelle 3.14: Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den Homologen von Centromer 9 in Lymphozyten

3.15 Radiale Lage und Distanz von Centromer 9 in Lymphozyten

Das Centromer 9 ist in den Lymphozyten der MAA+KCl- ($44,8 \pm 27,5 \mu\text{m}$) als auch in der MAA-Fixierung ($37,7 \pm 23,6 \mu\text{m}$) signifikant gleich in der 40 % Schale lokalisiert ($p=0.4128$). Auch bei der Betrachtung der Distanz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Fixierungen festgestellt werden ($p=0.997$). Die homologen Centromer 9 Markierungen der MAA+KCl-Fixierung haben eine mittlere Distanz von $6,5 \pm 2,4 \mu\text{m}$ und die der MAA-KCl-Fixierung eine mittlere Distanz von $6,3 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Deutliche Unterschiede liegen im Vergleich zur PFA-Fixierung vor. Die mittlere radiale Position von Centromer 9 in PFA-fixierten Lymphozyten liegt mit $67,4 \pm 16,6 \%$ oberhalb der 60 % Schale und damit weiter zum Rand als das Centromer 9 in den beiden MAA-fixierten Präparaten. Diese Verschiebung nach außen hin ist signifikant, wie aus der Tabelle 3.14 zu entnehmen ist. Die Distanz zwischen den Homologen ist in der PFA-Fixierung mit $4,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$ signifikant geringer als in der MAA+KCl- ($p=2.1547e-004$) und der MAA-KCl-Fixierung ($p=7.6601e-004$).

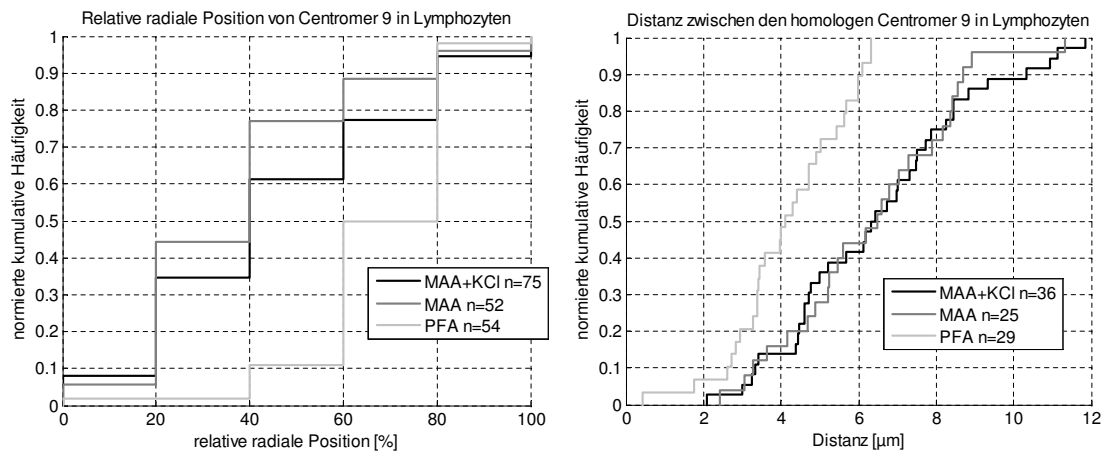


Abbildung 3.51: Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den homologen Centromer 9 in Lymphozyten

3.16 Topologie der subchromosomalen Domänen vs. Zellkernvolumen

An dieser Stelle steht die Frage im Vordergrund, ob es Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Zellkernvolumen und der radialen Lage sowie der Homolog-Distanzen in den unterschiedlichen Präparationen gibt. Veränderungen der Position von Chromatinbereichen in Abhängigkeit der Fixierung wird bei Kozubek et al. 2000 beschreiben [47]. Für die verwendeten Lymphozyten, VH7- und LNCAP-Fibroblasten¹ der verschiedenen Fixierungen sind die Mittelwerte der Zellkernvolumina gegen die Mittelwerte der radialen Position bzw. der Distanzen zwischen den Homologen graphisch in den Abbildungen 3.54 bis 3.53 aufgezeigt, um eine Zusammenfassung möglicher Tendenzen zu geben.

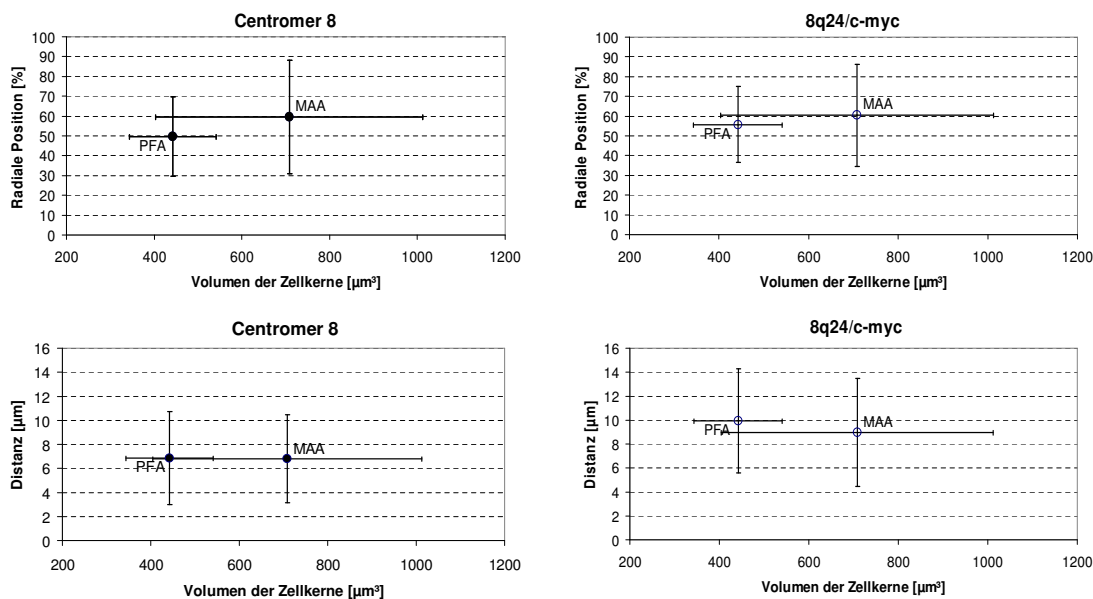


Abbildung 3.52: Korrelation der radialen Position und der Distanz zwischen Homologen mit dem Zellkernvolumen von VH7

¹Bei den LNCAP sind aufgrund der Tetraploidie nur die radiale Position für das Centromer 8 und die 8q24-Gendomäne dargestellt.

3.16 Topologie der subchromosomalen Domänen vs. Zellkernvolumen

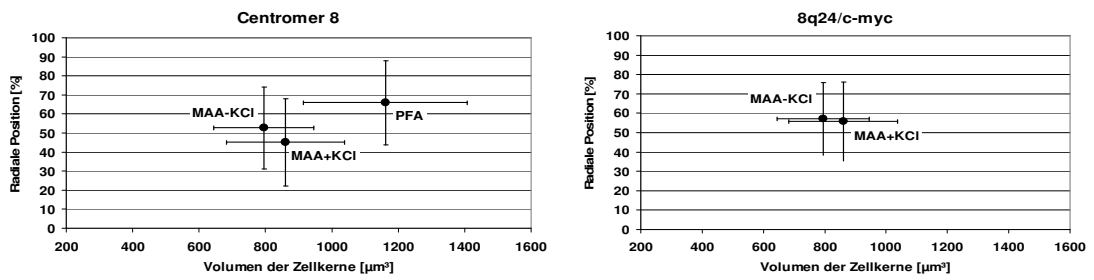


Abbildung 3.53: Korrelation der radialen Position mit dem Zellkernvolumen von LNCAP

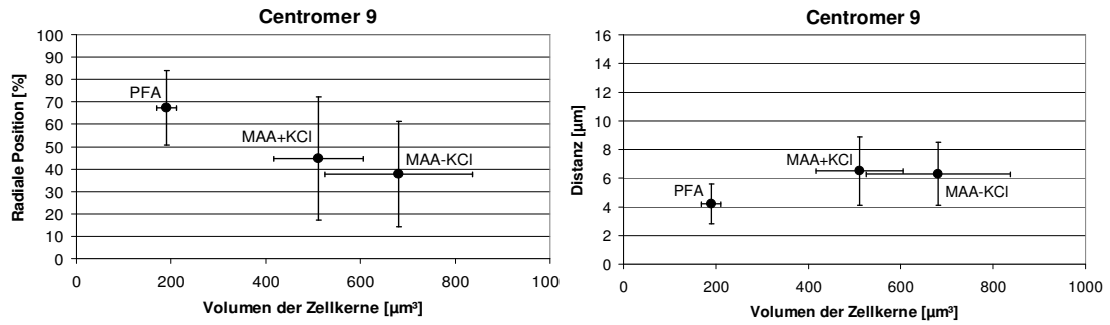


Abbildung 3.54: Korrelation der radialen Position und der Distanz zwischen Homologen mit dem Zellkernvolumen von Lymphozyten

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Fixierungs- und Hybridisierungsprozedur auf die Morphologie von Zellkernen

Quantitative Messungen der Größe von subchromosomalen Regionen im Zellkern *in vivo* sind zum jetzigen Zeitpunkt nur begrenzt möglich. Die größten Schwierigkeiten liegen dabei in der spezifischen Markierung der Zielsequenzen ohne Beeinflussung der nativen DNA-Struktur. Versuche, mittels Peptidnukleinsäuren (PNA) eine Markierung *in vivo* mit hoher Spezifität zu erreichen, sind vielversprechend [76]. Weiterhin werden zur quantitativen Bildauswertung bezüglich der subchromosomalen Größen Aufnahmen benötigt, die qualitativ hochwertig sind. Dazu sollten sich die zu untersuchenden Domänen während der Aufnahmen nicht verändern. Für einige Centromere in humanen Zellen wurde beispielsweise eine gelegentliche Motilität von 7-10 $\mu\text{m}/\text{h}$ beschrieben [7] [50], wobei sich die Bewegung von Chromatin auf einen Bereich von ca. 0,4 μm beschränkt, sich aber auch auf bis zu 1,5 μm ausdehnen kann [9]. [50] Eine räumliche Stabilisierung der Strukturen kann nur durch eine Fixierung erreicht werden. *In vivo* Größenmessungen sind auch dadurch limitiert, dass die Beleuchtung der Objekte mittels Laserlicht, vor allem im UV-Bereich, phototoxisch wirkt. Eine Reduzierung der Laserintensität würde aber zu einer Verminderung der Photonenausbeute führen (in Abhängigkeit des Fluorophors).

Um grundsätzliche Fragen des Einflusses der Fixierung und der Hybridisierungsprozedur zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Zellkerne von Lymphozyten, VH7 und LNCAP, welche mittels Methanol/Eisessig (z.T. mit und ohne KCl) und Formaldehyd fixiert wurden, vor und nach der Hybridisierung (Proteolyse, Hitzedenaturierung) quantitativ vermessen. Die Ergebnisse zeigen nicht in allen Parametern eine einheitliche

Tendenz. Beispielsweise sollten Zellkerne mit einer hypotonen Behandlung (MAA mit KCl) ein größeres Volumen aufweisen als nicht-hypotonisierte Zellkerne. Entgegen diesen Erwartungen sind bei den Lymphozyten die hypotonen Zellkerne signifikant kleiner als die nicht-KCl-behandelten Kerne. Bei den LNCAP entspricht das mittlere Volumen der mittels Formaldehyd nach Adhärenz fixierten Kerne nicht den allgemeinen Annahmen, dass diese immer kleiner sind als MAA-fixierte Kerne (mit bzw. ohne KCl) [47]. Betrachtet man die PFA-fixierten Zellkerne vor und nach der Hybridisierungsprozedur wird einheitlich sichtbar, dass das Kernvolumen durch die Hybridisierung stärker reduziert wurde als bei den Methanol/Eisessig-fixierten Zellkernen. Grundsätzlich wurde bei allen untersuchten Fixierungen das Volumen durch die Hybridisierungsprozedur (RNase-, Pepsin- und Hitzebehandlung) statistisch signifikant kleiner.

Für die Hybridisierungen der beiden Fixierungen wurde das gleiche Protokoll verwendet, wobei bei den PFA-fixierten Kernen der Proteinverdau erhöht werden mußte, um ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Der Proteinverdau und eine mögliche höhere Sensitivität gegenüber der Dehydrierung während der Ethanol-Reihen könnten Gründe für die starken Veränderungen in den Formaldehyd-Präparaten sein. Weiterhin können bei einer Dehydrierung und einer gleichzeitigen unvollständigen Vernetzung der Proteine mit Aldehyd-Fixativen die stark basischen Histon-Proteine des Chromatins koagulieren und Faser-, Klumpen- und Granula-artige Strukturen ausbilden [44]. Diese Verklumpungen der Proteine wurde auch schon bei der Verwendung von Eisessig bei der Fixierung mit Methanol beschrieben [44]. Trotz Denaturierung und Präzipitation von Proteinen (Histone) bei der Verwendung von Methanol und Eisessig als Fixativ wird die DNA durch den niedrigen pH-Wert von ca. pH 3.0 gegenüber mechanischer Schädigung stabilisiert [41]. Eine ausreichende Formaldehyd-Fixierung ist dagegen dadurch gekennzeichnet, dass das Chromatin eine auffallend glatte Textur zeigt, was laut Kiernan (2000) möglicherweise eher der Struktur im lebenden Zellkern entspricht [44]. Um den Einfluß der Dehydrierung auf die Zellkernmakrostruktur während und nach der Hybridisierung zu untersuchen, wären Experimente mit dem bei [75] und [74] beschriebenen Protokoll mittels Stickstoffaufschluss ohne Dehydrierung naheliegend.

Die axialen Ausdehnungen der Zellkerne der verschiedenen Fixierungen entsprechen fast vollständig den Erwartungen. Methanol/Eisessig-fixierte Zellkerne sind flacher als Formaldehyd-fixierte Zellkerne [47] [38]. Bei den Lymphozyten gibt es keinen signifikanten Einfluss der Hypotonisierung auf die axiale Ausdehnung vor der Hybridisierung. Bei den LNCAP sind die hypotonen Zellkerne signifikant flacher als die nicht-hypotonen Zellkerne (vor FISH). Durch die Hybridisierungsprozedur allerdings scheinen die Zellkerne eine minimal zu erreichende axiale Ausdehnung anzunehmen. Der Verlust der axialen Ausdehnung bei den Formaldehyd-fixierten Zellkernen ist in allen Versuchen signifikant höher als bei den Methanol/Eisessig-fixierten Zellkernen, was sich mit den Beobachtungen der Veränderung des Volumens der Zellkerne deckt. Die scheinbar bessere Konservierung der Zellkernmorphologie (kein Anschwellen und Abflachen der Kerne) bei der PFA-Fixierung im Vergleich zur MAA-Fixierung kann im Verlauf der Hybridisierung nicht aufrechterhalten werden. Auffällig ist auch, dass beispielsweise das Volumen der VH7-Zellkerne, welche mit Formaldehyd fixiert und noch nicht denaturiert wurden, ein ähnliches Volumen haben wie die denaturierten MAA-fixierten Zellkerne. Die axiale Ausdehnung verhält sich ebenfalls so. Die mittlere axiale Ausdehnung der Zellkerne von den VH7 Fibroblasten, welche PFA-fixiert wurden (vor FISH), entspricht der Ausdehnung der Zellkerne, welche MAA-fixiert wurden, nach der Hybridisierung.

Die sphärische, dreidimensionale Form der Lymphozyten wurde in axialer Richtung durch die Fixierung mit Methanol/Eisessig und dem Auftropfen der Zellen auf den Objektträger annähernd halbiert (verglichen mit der Formaldehyd-Präparation). Lateral betrachtet sind die Lymphozyten weiterhin rund, sowohl vor als auch nach der Hybridisierung. Bei den ellipsoid-förmigen Fibroblasten VH7 und LNCAP konnte nur bei den LNCAP der hypotonen MAA-Fixierung eine annähernd runde Morphologie festgestellt werden, was ebenfalls eine Veränderung der Kernmorphologie darstellt. Somit wird gerade bei den ellipsoiden Zellkernen der destruktive Einfluß der hypotonen Lösung sehr deutlich. Weiterhin sind die Kerne der LNCAP Fibroblasten bei der MAA-Fixierung runder als bei der PFA-Fixierung. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die Zellen für die Formaldehyd-Fixierung adhärent am Objektträger wuchsen und ohne Trypsinierung fixiert wurden, wodurch die Zellkörper gestreckt vorlagen. Dagegen werden die

adhärent gewachsenen Zellen für die Methanol/Eisessig-Fixierung trypsiniert. Dies hat ein *Abkugeln* der Zellen von der Oberfläche zur Folge, was in der Methanol/Eisessig-Suspension beibehalten wird. Fibroblasten in Suspension verlieren somit teilweise ihre langgestreckte Form, was auch Auswirkungen auf die Zellkernmorphologie hat.

Grundlegend konnte durch die Betrachtung des Einflusses der Fixierung und der anschließenden Hybridisierung hinsichtlich der Morphologie von Zellkernen Unterschiede festgestellt werden, die jedoch nicht vollständig den Erwartungen entsprachen. In dieser Arbeit erfolgte eine umfangreiche quantitative dreidimensionale Betrachtung der Zellkerne in Form der Messung des Volumens (μm^3) und der axialen Ausdehnung (μm) sowie die Berücksichtigung der lateralen Anisotropie (Verhältnis der x/y-Ausdehnung) als Parameter der Rundheit von makroskopischen Objekten (Zellkerne). Durch das Einbeziehen der Volumina und der lateralen Anisotropie der Zellkerne stellen die Daten dieser Arbeit eine umfangreichere Quantifizierung der Kernmorphologie dar als die Darstellung bei Hepperger et al. (2007) [38], wo außerdem nur die sphärische Zelllinie MEL (*mouse erythroleukemia*) und die ebenfalls sphärische murine embryonale Stammzelllinie CCE hinsichtlich der Höhe und Breite sowie das daraus resultierende Verhältnis untersucht wurden. Beiden Untersuchungen gemeinsam ist die Beobachtung einer hohen intra- und interexperimentellen Variabilität. Trotz der enormen Sensitivität der Formaldehydfixierten Zellkerne gegenüber der hier verwendeten Hybridisierungsprozedur scheint diese Fixierung unter nicht-dehydrierenden Bedingungen eine Methode zur guten Konservierung der Morphologie von Zellkernen zu sein. Diese allgemein etablierte Annahme wurde von Hepperger et al. (2007) am Beispiel eines transgenen Plasmids unter *in vivo* Verhältnissen und dem entsprechenden BACPAC¹-Klon für die *in situ* Hybridisierung bestätigt [38].

¹*Bacterial Artificial Chromosome, P1-derived Artificial Chromosome*

4.2 **c-Myc-Expression in Abhängigkeit des Synchronisierungsstatus von VH7 und LNCAP**

Das Protoonkogen *c-myc* ist an der normalen Proliferation von Zellen beteiligt und wird oft im Zusammenhang mit der Genese verschiedener Tumore genannt. Es kodiert für zwei nukleäre Proteine, die mit hoher Affinität ohne Sequenzspezifität an die DNA binden. Die Expression von *c-myc* korreliert mit der zellulären Proliferation und ist in ruhenden und differenzierenden Zellen unterdrückt [23]. Haničarová et al. (2006) stimulierten beispielsweise Zellen der humanen Adeno-Colonkarzinomzelllinie HT29 mit Natriumbutyrat, so dass diese sich differenzierten. Es wurde eine Abnahme des c-Myc-Proteinniveaus in den sich differenzierenden Enterozyten (HT29) nachgewiesen, welches nach Ausdifferenzierung der Zellen auf das Ausgangsniveau zurückkehrte [35]. Die Expression von c-Myc ist z.B. beim Astrozytom mit der Proliferation (mitotischen Index) assoziiert und nimmt mit der Progression des Tumors zu [28]. Für die verwendeten adhärenenten VH7 und LNCAP Fibroblasten wurde nach Formaldehyd-Fixierung mittels pKi-67 Antikörper die Zellzyklusphasen bestimmt und das Vorkommen des c-Myc-Proteins und die damit zusammenhängende Aktivität des *c-myc*-Gens untersucht.

Durch konfluentes Wachstum der normalen Vorhautfibroblasten VH7 in Kultur konnte eine Synchronisation in der G_0 -Phase zu 83 % erreicht werden. Somit liegt der Großteil der verwendeten VH7 Fibroblasten im nicht-proliferierenden Zustand vor und ist ruhend. Damit sollte auch eine *c-myc*-Expression bzw. -Aktivität zum Großteil ausgeschlossen sein. Die Detektion des Proteins mittels Antikörperdetektion bestätigt diese Annahme. Da die c-Myc-Proteine nukleäre Proteine sind, wurde eine Färbung im Zellkern erwartet. Eine Färbung im Zellkern trat in konfluenten Bereichen nur vereinzelt auf und blieb auch nach Erhöhung der Antikörperkonzentration und Inkubationszeiten unverändert. Die Häufigkeit der Zellkerne mit c-Myc-Antikörpermarkierung war in den nicht-konfluenten Bereichen etwas erhöht, was sich wiederum mit der Zellzyklusbestimmung deckt. In Bereichen mit Zellproliferation ist der Anteil c-Myc-positiver Zellkerne höher. Eine Synchronisation der fibroblastoiden Prostatakrebszelllinie LNCAP durch konfluentes Wachstum war nicht möglich, da die Zellen generell bevorzugt in Aggregaten

übereinander wachsen und ein Platzmangel keinen Einfluss hat. Der Anteil an Zellen in der G_0 -Phase betrug nur 30 %. Ab einer bestimmten Zellzahl kam es außerdem zu einem Ablösen der Zellhaufen vom Zellkulturflaschenboden bzw. vom Objektträger/Deckglas. Der geringe Anteil an ruhenden Zellen läßt vermuten, dass der Anteil der c-Myc-positiven Zellkerne entsprechend ansteigt. Dies wurde tatsächlich beobachtet, obwohl eine ausreichend intensive Antikörpermarkierung in den LNCAP Fibroblastenkernen schwierig war. Klusterartige Signale im Kern, wie bei den VH7 Fibroblasten, konnten nicht detektiert werden. Dafür jedoch klusterartige Akkumulationen des Antikörpers bzw. der Fluorophore im Zytoplasma einiger Zellen. Nach der Erhöhung der Permeabilisierung der Zellen, der Konzentration der verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie der Inkubationszeiten konnte eine homogene Färbung der meisten Zellkerne beobachtet werden. Dies spricht, im Gegensatz zum Färbemuster in den VH7 Zellkernen, für eine homogene Verteilung des c-Myc-Proteins in den Zellkernen der LNCAP Fibroblasten. Ob diese Verteilung des Proteins im Zellkern darauf basiert, dass es sich bei den LNCAP um Krebszellen handelt, ist fraglich. Außerdem kann ein Zusammenhang zwischen Zellzyklusphase und Proteinexpression in dieser Arbeit nur vermutet werden. Um genaue Aussagen machen zu können, wäre eine gleichzeitige Markierung des pKi-67 und c-Myc-Proteins nötig. Eine Arretierung der LNCAP in der G_0 -Phase ist, laut ersten Versuchen, durch Serumentzug ebenfalls sehr gut möglich.

Um die Methode der Immunofluoreszenzmarkierung zu validieren, wurde ergänzend zum nukleären Protein c-Myc das zytoplasmatische Protein AMACR (pAMACR) markiert. Die in den Peroxisomen und Mitochondrien vorkommende AMACR (alpha-Methylacyl-CoA Racemase) ist ein Enzym zur Konvertierung verzweigtkettiger Fettsäuren von der β - in die α -Konformation. Nur in dieser Form können verzweigtkettige Fettsäuren (z.B. Pristansäure, Phytansäure) via β -Oxidation in ihre Acetyl-Gruppen zerlegt und verstoffwechselt werden [30] [80]. In den gesunden VH7 Fibroblasten war ein spezifisches Färbemuster im Zytoplasma aller Zellen detektierbar. Bei den LNCAP scheint es, dass in einem geringen Teil der Zellen kein pAMACR vorhanden ist. Die Interpretation der Bilddaten hinsichtlich des Auftretens des Proteins in LNCAP gestaltete sich schwierig, da die Zellen in Haufen wachsen und das Zytoplasma der Zellen teilweise nicht von den

Nachbarzellen abzugrenzen war. Bei den VH7 als auch bei den LNCAP handelt es sich bei dem spezifischen Färbemuster um sphärische Signale, welche vereinzelt oder aggregiert vorkommen. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ort des Wirkens des Proteins. Die Kolokalisation des Enzyms mit den Peroxisomen und Mitochondrien wird in zahlreichen Publikationen beschrieben [30], [80], [2] und beispielhaft für Fibroblasten bestätigt [2] [80].

Eine Synchronisation von Zellen allein durch konfluentes Wachstum ist nur bei normalen primären Fibroblasten zu erreichen. Immortalisierte Zellen, wie beispielsweise Krebszellen, benötigen den Entzug von Serum oder anderen wachstumsstimulierenden Bestandteilen des Zellkulturmediums, um Zellen in der G_0 -Phase zu arretieren. Dass ruhende Zellen kein *c-myc* exprimieren, scheint auch auf die VH7 Fibroblasten zuzutreffen. Bei der Krebszelllinie LNCAP scheint das c-Myc in fast allen Zellkernen vorhanden zu sein. Damit stehen für die weiteren Untersuchungen Präparate zur Verfügung, die jeweils ein Beispiel für aktive (LNCAP) als auch inaktive (VH7) Zellkerne darstellen. Ein direkter Vergleich zwischen VH7 und LNCAP liefert darum keine vertrauenswürdigen Ergebnisse.

4.3 Größen der subchromosomalen Domänen unter Berücksichtigung der Fixierung

Um makroskopische Objekte, wie es die Zellkerne darstellen, optisch aufzulösen, bedarf es keinen großen technischen Aufwand. Epifluoreszenz- und konfokale Mikroskope sind hervorragend geeignet, um schnell hochwertige Bilddaten zu produzieren, die anschließend hinsichtlich der Intensitäten der Pixel bzw. Voxel quantitativ ausgewertet werden können. Bei Objekten kleiner als $1 \mu\text{m}$, wie beispielsweise spezifische Gene, stößt man schnell an die durch die Punktbildfunktion begrenzte optische Auflösungsgrenze der Mikroskope. Messungen von kleinen Objekten und Strukturen werden nicht nur durch die Mikroskop-spezifische Punktbildfunktion, sondern auch durch vibratorische und thermale Effekte, durch Brechungsindexänderungen zwischen dem Medium und dem Zellkern-

inneren als auch durch die Stabilität der Fluorophore (Ausbleichen, Photonenausbeute) beeinflusst. Da subchromosomale Domänen *in vivo* außerdem noch mobil sind und die Markierung mit fluoreszierenden Molekülen aufwendig ist, ist für einige grundlegende Fragestellungen eine Markierung in fixierten Präparaten ausreichend. Daraus stellt sich wiederum die Frage, wie groß der Einfluß der Fixierung auf die Struktur von Objekten im Nanometerbereich ist.

Um den Einfluß der Fixierung zu quantifizieren wurde in dieser Arbeit, dass von David Baddeley entwickelte *ten point model* verwendet und auf konfokale Bilddaten angewendet. Als Parameter für die Beeinflussung der subchromosomalen Domänen wurde die Halbwertsbreite einer Gauß-Verteilung als Synonym für die laterale Größe verwendet. Mit diesem Model erfolgt eine Abschätzung der Größe durch die Bestimmung der Verteilung von zehn gleich-hellen Punkten in dem Objekt, wobei die mittlere Distanz zwischen den Punkten und dem Objektschwerpunkt die gleiche sein sollte wie die Halbwertsbreite einer Gauß-Verteilung. Der verwendete Fit wurde an die dreidimensionale PSF des konfokalen Mikroskops angepasst, jedoch wird die z-Position der Punkte bei der Größenbestimmung nicht berücksichtigt, um eine durch die schlechtere axiale Auflösung bedingte Minderung der Qualität der Messungen zu verhindern.

Durch die Messungen an unterschiedlich großen Beads konnte in dieser Arbeit die Sensitivität dieses neuen Modells untersucht werden. Dabei wurde nachgewiesen, dass diese Methode der Größenmessung nicht für Objekte kleiner/gleich 200 nm Durchmesser geeignet ist. Vor allem die 100 nm Beads stellen Beispiele für kleine, beugungsbegrenzte Objekte dar. Die gemessene Halbwertsbreite (*TP-FWHM*) der 100 nm Beads von 142 nm lag um 71 nm deutlich über dem theoretischen Wert und wurde somit durch diese Methode überschätzt. Die 200 nm Beads liegen relativ nah an dem theoretischen FWHM und damit an der Grenze der lateralen Auflösung des konfokalen Mikroskops von ca. 250 nm. Ab einem Durchmesser von 200 nm werden die lateralen Ausdehnungen etwas unterschätzt. Die Höhe der Unterschätzung der Größen steigt mit der Größe der Beads an. Dagegen werden die Standardabweichungen mit steigender Größe der Beads geringer, die Kurve der kumulativen Darstellung wird steiler. Zudem ist der Zusammenhang

zwischen den experimentel ermittelten *TP-FWHM* und den vom Hersteller angegebenen Durchmesser der Beads linear.

Durch die Verwendung der 560 nm Beads mit Anregung bei $\lambda=488$ nm und $\lambda=568$ nm konnte außerdem der Unterschied zwischen den hier verwendeten Anregungswellenlängen bei den Größenmessungen quantifiziert werden. Im grünen Kanal sind die selben 560 nm Beads um 29 nm im Vergleich zum gelben Kanal lateral größer. Für biologische Studien mit dem Ziel, Größen quantitativ zwischen den beiden Kanälen zu vergleichen, müßte dies berücksichtigt werden. Da aber die Sequenzen und die exakten Wiederholungen der alpha Satelliten-Regionen des Centromers von Chromosom 8 nicht bekannt sind, spielt der Einfluss der Wellenlänge keine große Rolle. Im Fall, dass diese Informationen zur Verfügung stehen würden, hätte man mit diesem Model auch die Möglichkeit, die Größe hinsichtlich der Kompaktierung in Abhängigkeit der markierten DNA-Länge zu messen als Vergleich zwischen alpha-Satelliten-Chromatin (Centromer 8) und Euchromatin (8q24/*c-myc*) in der selben Probe. Die Unterschätzung der lateralen Ausdehnung und die Unterschiede zwischen den beiden Kanälen resultieren daraus, dass zur Berechnung eine geschätzte Punktbildfunktion verwendet wurde statt einer am selben Gerät experimentell gemessenen. Die Ermittlung der PSF von Beads kann zur Korrektur der geschätzten PSF vorgeschlagen werden. Allerdings wären die Beads, streng genommen, nur zur Korrektur bzw. als Kalibrationsobjekte geeignet, wenn sie nah benachbart zu den zu messenden biologischen Objekten im Zellkern positionierbar wären. Allein ein leicht veränderter Brechungsindex innerhalb der Zelle bzw. des Zellkerns gegenüber dem Einbettungsmedium würde Einfluss auf die Punktbildfunktion und damit auf die Größe nehmen. Mit einer Abweichung der gemessenen lateralen Größe vom theoretischen Wert im Bereich von minimal 16 nm bei den 200 nm und maximal 90 nm bei den 560 nm ($\lambda=488$ nm) Beads scheint die angenommene PSF von 250 nm größer als die Mikroskop-spezifische PSF zu sein. Im Folgenden wird sich hauptsächlich auf den Vergleich der Größen einer der subchromosomalen Domänen (Centromer 8 und 9, 8q24/*c-myc*) in unterschiedlichen Präparationen konzentriert, die jeweils mit der gleichen Sonde markiert und im gleichen Kanal detektiert werden.

Ein weiterer Parameter, der zur Charakterisierung von Objekten in dieser Arbeit herangezogen wird und vom *ten point model* berechnet wird, ist die Anisotropie. Sphärische Objekte sollten keine laterale Ausrichtung besitzen und eine Anisotropie von eins zeigen. Die kleineren Beads (100 nm, 200 nm) zeigen eine Anisotropie über 1, wobei sie annähernd doppelt so breit wie lang sind. Die Standardabweichungen von ± 0.7 lassen eine hohe Inhomogenität der Messungen vermuten. Ab einer Beadgröße von 290 nm wird die Standardabweichung um den Faktor 7 geringer und die Datensätze vertrauenswürdiger. Dass eine Anisotropie von $1 (\pm 0.1)$ nur bei den Beads mit ausreichend großen Durchmesser gemessen werden konnte, liegt höchstwahrscheinlich an der Asymmetrie der PSF des verwendeten konfokalen Mikroskops, an der geringen Photonenausbeute bzw. an Rauscheffekten thermischen und elektronischen Ursprungs, die sich bei kleinen Objekten (100 nm, 200 nm) deutlicher auswirken als bei den größeren Objekten. Außerdem könnte das Vorhandensein von Beadklustern ein Grund für die hohe Anisotropie der 100 nm Beads, trotz Vereinzelung im Ultraschallbad, sein.

Durch Simulationsexperimente wurde ermittelt, dass mit Hilfe der SMI-Mikroskopie Objekte im Bereich von 30 bis 200 nm hinsichtlich ihrer Größe sensitiv vermessen werden können. Die Ergebnisse der Simulation lassen auch einen Zusammenhang zwischen Struktur des Objektes und erfolgreicher Detektion (Modulation) vermuten, wobei es sich bei Objekten mit einer Modulationstiefe von 0.3 eher um die Detektion von Substrukturen handeln könnte. Voraussetzungen für die Größenmessungen basierend auf SMI-Bilddaten sind, dass die Objekte ausreichend klein, von einander optisch isolierbar sind und dass das Objekt eine homogene Fluorophorverteilung aufweist. Die in dieser Arbeit beispielhaft vermessenen 100 nm Beads zeigen deutlich eine Modulationstiefe von 0.64 für $\lambda=488$ nm (89 %²) und 0.77 für $\lambda=568$ nm (76 %³). Damit konnte eine axiale Ausdehnung von 107 ± 15 nm bzw. 97 ± 14 nm bestimmt werden. Die Größenmessungen der 100 nm Beads bei $\lambda=568$ nm sind identisch mit den Angaben des Herstellers zu dem mittels *Transmission Electron Microscopy* (TEM) zertifizierten mittleren Durchmesser, wobei die Standardabweichung mit ± 5 nm angegeben wird. Messungen mit verschie-

²umode = 0.06

³umode = 0.11

denen Beadgrößen wurden schon bei Mathée (2006) [58], Wagner et al. (2005) [81] und Failla et al. (2003) [26] ausführlich beschrieben. Der Nutzen der SMI-Mikroskopie für die Bestimmung der axialen Ausdehnung (Größe), der in dieser Arbeit markierten subchromosomalen Domänen 8q24/*c-myc* und Centromer 8, ist leider wenig aussagekräftig. Es konnten keine axialen Größen gemessen werden. Zum Einen ist der Anteil der erfolgreich gefitteten Signale mit unter 50 % sehr gering und zum Anderen liegen die Modulationstiefen der gefitteten Signale an der Grenze der Vertrauenswürdigkeit der Messungen. Mit Sicherheit kann gesagt werden, dass die hier markierten Domänen für die axiale Größenmessungen zu groß sind, d.h. über 200 nm Ausdehnung aufweisen. Die Kalkulation der Größen scheint zu dem stark vom Hintergrund abhängig zu sein. Die Formaldehyd-Präparation zeigt in den beiden Wellenlängen einen hohen Hintergrund, was sich auch in einer verringerten Fitrategie widerspiegelt. Die Signale für das Centromer 8 und die 8q24-Region der Methanol/Eisessig-Fixierung werden mit 87 % bzw. mit 77 % eher erfolgreich detektiert als die der Formaldehyd-Fixierung mit 44 % bzw. 62 %. Für die Markierungen in Metaphasechromosomen waren die Anteile der gefitteten Signale noch geringer, 32 % für die Centromere der getrennten Chromatide und 42 % für die 8q24-Region. Auch in diesen Präparaten war vermutlich der ungewöhnlich hohe Hintergrund der nicht KCl-behandelten Metaphasen ursächlich.

In vergangenen SMI-Messungen, publiziert bei Hildenbrand et al. (2005), wurde neben der p53- (45 kb) und der p58- (85 kb) Domäne, die *c-myc*-Region in humanen Lymphozyten (Methanol/Eisessig) mit einer 120 kb-langen Sonde markiert. Die ermittelte Halbwertsbreite dieser Markierung betrug 103 ± 12 nm [39]. Diese Größen wurden mir einem früheren Modell berechnet, bei dem das Objekt ein Gauß-förmiges Objekt war. Um diese Größen mit den hier gemessenen, unter der Annahme, dass das Objekt sphärisch ist, vergleichbar zu machen, ist eine Multiplizierung mit $\sqrt{2}$ erforderlich. Da die Fluorophore bei der 220 kb-Sonde direkt an den Sonden-DNA-Strang gebunden sind und nicht wie bei [39] FITC-gelabelte Digoxigenin-Antikörper verwendet wurden, sind die Daten nicht vergleichbar. Zusätzlich ist die in dieser Arbeit verwendete Sonde für die *c-myc*-Domäne mit 220 kb doppelt so lang. Außerdem wurden die Größenmessungen an unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt.

Die hier markierten subchromatischen Domänen sind deutlich zu groß für die SMI-Messungen und stellen daher ideale Objekte für die Größenmessung mittels CLSM dar. Es ist jedoch denkbar, dass unter Umständen bei solchen großen Objekten eine von der Fluorophorverteilung abhängige axiale Modulationsstruktur detektierbar ist, von der auf die Homogenität und damit auf die Struktur (offen, geschlossen/kompakt) des markierten Objektes geschlossen werden könnte. Für die 8q24/c-myc Domäne könnte dies bedeuten, dass die geringere Modulationstiefe dieser Region (0.25 ± 0.07) in Metaphasechromosomen der VH7 Fibroblasten im Vergleich zu dieser Region in Interphasechromatin (0.36 ± 0.17) eine breitere Fluorophorverteilung zeigt. Diese unterschiedliche Fluorophorverteilung könnte möglicherweise mit einer offeneren Struktur dieser Domäne in der Metaphase verglichen mit der Interphase zusammenhängen. Für diese Vermutung sprechen die Messung der lateralen Ausdehnung mittels CLSM, bei der die 8q24 Domäne in der Metaphase ausgedehnter vorliegt als in der Interphase. Die Modulationstiefe als Parameter für die Struktur von Objekten bietet eine hervorragende Möglichkeit, Fragen zur Zellkernarchitektur zu untersuchen. Denkbar sind dazu Studien, die den Unterschied zwischen aktiven und inaktiven Chromatinbereichen in Hinblick auf mögliche Strukturveränderungen untersuchen. Dies ist neben der Grundlagenforschung vor allem für den Bereich der Tumorforschung von Interesse, wo Abberationen von Genen (Proto-/Onkogene) bezüglich der Diagnose und Prognose (Aggressivität) des Tumors beurteilt werden könnten. Für nicht Chromatin-Bereiche, wie beispielsweise *Transcription Factories* (40 - 80 nm [57]), Ribosomen und Kernporenkomplexe, ist aus elektronenmikroskopischen Studien bekannt, dass sie annähernd eine sphärische Form besitzen, ausreichend klein sind und somit ideale Objekte für die SMI-Mikroskopie darstellen.

Mit Hilfe des *ten point models* und der daraus resultierenden Größenmessung basierend auf konfokalen Bilddaten kann außerdem die grundlegende Frage quantitativ untersucht werden, wie groß der Unterschied zwischen kondensiertem (Metaphase) und nicht-kondensiertem Chromatin (Interphase) ist. Bezüglich der Unterschiede in der Kompaktierung der DNA ermittelten Manders et al. (2003) eine Reduzierung der Kompaktierung von der Anaphase zur *G1*-Phase um den Faktor 2 [54]. Für die alpha-Satelliten

Region des Chromosom 8 in Methanol/Eisessig-fixierten VH7 Fibroblasten konnte in dieser Arbeit ein Faktor für die unterschiedliche laterale Ausdehnung von 1.18 ermittelt werden. Nur bei den VH7 Zellen war es möglich, Centromere zu untersuchen, die benachbart lagen, aber schon getrennt detektierbar waren. Das Centromer von Chromosom 8 in den LNCAP Fibroblasten und von Centromer 9 in Lymphozyten ist in Metaphasen signifikant größer als im Interphase-Zellkern. Dass in diesen Präparaten die Centromere nicht getrennt sind und dadurch größer sind, wird aus der Bestimmung der Anisotropie deutlich. Für das Centromer 8 in LNCAP liegt die Anisotropie bei 1.52 ± 0.47 und für das Centromer 9 in Lymphozyten bei 1.95 ± 0.67 . In Interphase-Zellkernen zeigen die beiden Domänen in den entsprechenden Zellen jeweils eine einheitliche Anisotropie, die eine nicht ganz sphärische Morphologie der Centromere beschreibt (Centromer 8 = 1.4, Centromer 9 = 1.2).

Für die Genregion 8q24 in den synchronisierten VH7 Fibroblasten wurde in den mitotischen Chromosomen eine signifikant 1.1-fach größere laterale Ausdehnung ermittelt als in den Interphasezellkernen. Somit zeigt die Centromer 8 Region ein anderes Verhalten als die 8q24-Gendomäne im gleichen Präparat unter identischen Fixierungs- und Hybridisierungsbedingungen. Bringt man die laterale Ausdehnung mit einer möglichen Korrelation zur Kondensation von Chromatin in Zusammenhang, kann dies ein Hinweis auf eine geringere Kompaktierung der 8q24/*c-myc*-Domäne in Metaphasechromosomen verglichen mit Chromatin in Interphase-Zellkernen sein. Möglich ist aber auch, da es sich bei dem Metaphasenpräparat um sich teilende bzw. sich geteilte Chromatiden handelt (getrennte Centromere), dass sich die Genregion in dieser Phase beginnt zu relaxieren und daher größer wird. Außerdem wurden die Metaphasen auf den Objektträger aufgetropft, wobei sich die Zellen abflachen (siehe Kapitel 4.1). Eine Abflachung der Metaphasechromosomen könnte in den Armen der Chromosomen deutlicher sichtbar sein als bei den sphärischen Centromeren, da diese noch zusätzlich an stabilisierende Proteine des Spindelapparates gebunden sind. Gegen diese Abflachungstheorie spricht allerdings, dass die 8q24/*c-myc* Domäne in den Metaphasen der LNCAP-Präparation nicht größer ist verglichen mit dieser Domäne in Interphasechromatin. Da bei dem LNCAP Metaphasepräparat KCl als hypotone Lösung verwendet wurde, können die Unterschiede auf dem Einfluss

der KCl-Behandlung basieren und die geringere Kompaktierung der 8q24 Domäne in Metaphasen der VH7 Fibroblasten eher den wirklichen Bedingungen entsprechen. Messungen der lateralen Ausdehnung von Centromeren in Interphasezellkernen der LNCAP Fibroblasten und Lymphozyten unterstützen das Argument der KCl-Behandlung nicht (kein Einfluss). Der Einfluss von KCl auf die Genregion in LNCAP Interphasechromatin ist dagegen signifikant, was für eine unterschiedliche Sensitivität von centromerer und euchromatischer DNA spricht. In der Zytologie ist allgemein bekannt, dass durch eine Behandlung mit KCl die Metaphasechromosomen eine klarere stabförmige Form erhalten als ohne KCl. Die Vorstellung, dass gen-reiche Chromatinschleifen von 0,2 bis 2 Mbp aus kondensierten, heterochromatischen Bereichen ausstrahlen [83] und dadurch möglicherweise in Metaphasechromosomen zu einer größeren Ausdehnung führen, könnte auf die Messungen der 8q24-Gendomäne der VH7 Fibroblasten übertragbar sein. Allerdings muß dies durch Kontrollexperimente (mit und ohne KCl in VH7 und LNCAP) bestätigt werden.

Die Präparation von Chromosomen in der Metaphase/Anaphase mit Centromeren, die sich von einander trennen, ist durch die Reversibilität des *Colcemid*-Blocks möglich. Grundsätzlich kann die Isolierung von Metaphasen auf direkte Weise durch das so genannte *Abklopfen* ohne *Colcemid*-Behandlung erfolgen. Die abgekugelten Zellen (charakteristisch für sich teilende Zellen) gehen dabei durch mehr oder weniger starkes Schlagen mit der Hand an den Zellkulturflaschenrand ins Medium über, welches dann abzentrifugiert, gewaschen und in Fixativ aufgenommen werden kann. Dies ist aber nur für adhärenzte Zellen möglich und bietet eine, je nach Teilungsaktivität der kultivierten Zelllinie, geringe Ausbeute an Metaphasen. Um die Zahl der mitotischen Zellen zu erhöhen, ist die Synchronisation der Zellen in der Routine mit dem Mitosegift *Colcemid* üblich. Dieses Alkaloid der Herbstzeitlosen verhindert die Ausbildung des mikrotubulären Systems und des Spindelapparates der Zellen durch Hemmung der Polymerisierung von Proteinen im Verlauf der Zellteilung und arretiert so die Zellen in der Metaphase. Mittels zweidimensionaler Elektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass die *Colcemid*-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinzusammensetzung von Metaphasechromosomen hat [79]. Kenntnisse über die Proteinzusammensetzung und deren mögliche Funk-

tion bei der Strukturgebung von Metaphasechromosomen ist von großer Bedeutung bei der Interpretation der Größenmessungen nach Fixierung und Denaturierung der Proben. Von Vorteil ist es ebenfalls, dass sich das Proteinmuster zwischen verschiedenen Zelllinien, z.B. BALL-1⁴ und K562⁵, nicht unterscheidet [79], da hier ebenfalls verschiedene Zelllinien verwendet wurden. Nach Erneuerung des Zellkulturmediums (Entfernung des Alkaloids) und weiterer Inkulturnahme der Zellen unter Standardbedingungen konnten die mitotischen Zellen in die Anaphase übertreten, was dadurch zu erkennen war, dass sich die Centromere leicht getrennt haben, aber noch nah benachbart sind. Dadurch war die Größenmessung einzelner Centromere in kondensiertem, mitotischen Chromatin vergleichend mit einzelnen Centromeren in relaxierten Chromatin möglich.

Laut Darzynkiewicz et al. (1977) denaturiert DNA in mitotischen Zellen bei 8 bis 10 °C geringerer Temperatur als DNA in Interphasezellkernen [21]. Eine Ursache dafür könnte der Verlust von stabilisierenden Proteinen durch Hitze sein, der bei den gespreiteten Chromosomen größer ist als bei dem im Kernplasma eingebetteten Chromatin der Interphase. Da das Centromer des Chromosom 8 der VH7 Fibroblasten in der Metaphase kleiner ist als in der Interphase, die Genregion 8q24 jedoch in der Metaphase größer als in der Interphase, würde dies bedeuten, dass die Temperatursensitivität innerhalb eines mitotischen Chromosoms nicht einheitlich ist. An dieser Stelle könnten ebenfalls centromer-spezifische und Kinetochor-bildende Proteine stabilisierend auf die Struktur der Centromere wirken [75].

Neben der Denaturierung der Proteine durch hohe Temperaturen, wird auch die Protein-denaturierende und -ausfällende Wirkung des im MAA-Fixativ enthaltene Eisessig beschrieben. Bei einer Metaphasen-Spreitung in der pathologischen Zytologie ist diese Präzipitation teilweise sogar erwünscht. Außerdem liegt das Fixativ durch einen Eisessig-Anteil von 30 % im saurer pH-Wertbereich, wodurch es zu einer Abschwächung des Cytoplasmas kommt, so dass die Zellen beim Auftropfen leichter brechen. Dagegen bewirken saure Bedingungen aber auch eine Stabilisierung der Chromosomen gegenüber

⁴human leukemic B-cell line

⁵human erythromyeloblastoid leukemia cell line

mechanischer Beanspruchung. [41] Bei einer Standard-Extraktion der Proteine aus isolierten Chromosomen mittels Eisessig erhält man aus 2.8×10^8 Zellen typischerweise $500 \mu\text{g}$ säurelösliche Proteine [79]. Insgesamt sind laut Analyse mittels zweidimensionaler Elektrophorese mehr als hundert Proteine in den isolierten Chromosomen enthalten, wobei die Histone mengenmäßig den größten Teil ausmachen [79]. Eine unterschiedliche, säureempfindliche Protein-DNA-Komplexbildung der beiden gemessenen Bereiche in mitotischen Chromosomen könnte ursächlich für die gegensätzlichen Größenmessungen sein.

Die Unterschiede der gemessenen lateralen Größen des Centromer 8 und der 8q24/*c-myc* Domäne in mitotischen und in Interphasechromosomen sind mit $\Delta = 54 \text{ nm}$ bzw. $\Delta = 48 \text{ nm}$ nicht sehr groß. Ebenso gering ist der Einfluss der Fixierung auf die laterale Ausdehnung subchromosomaler Domänen. In den Fibroblasten VH7 und LNCAP sind die Signale des Centromer 8 der Formaldehyd-Fixierung kleiner als die der Methanol/Eisessig-fixierten Kerne. Bei den VH7 Fibroblasten beträgt die Differenz 28 nm , bei den LNCAP Fibroblasten unterscheiden sich die Signale zwischen Metaphase und Interphase in nur 20 nm . Die 8q24 Gendomäne der VH7 Fibroblasten ist in den Methanol/Eisessig-fixierten Zellen um 19 nm größer im Vergleich zu den Signalen in den Formaldehyd-fixierten Kernen. In Verbindung mit den im Kapitel 3.1.2 ermittelten Ausdehnungen der Zellkerne der VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung konnte ein Zusammenhang zwischen lateraler Ausdehnung des Centromer 8 und der 8q24 Domäne mit der lateralen Zellkernausdehnung festgestellt werden. Die Formaldehyd-fixierten Kerne zeigen eine geringere laterale Ausdehnung als die Methanol/Eisessig-fixierten. Dem entsprechend ist die laterale Ausdehnung des Centromer 8 in Formaldehyd-fixierten Kernen geringer als in Methanol/Eisessig-fixierten. Die mittlere laterale Ausdehnung der 8q24/*c-myc* Domäne korreliert ebenfalls mit der mittleren lateralen Ausdehnung der Zellkerne der beiden Fixierungen. Das Centromer 9 in humanen Lymphozyten ist in den Formaldehyd-fixierten Kernen um 32 nm größer als in den Methanol/Eisessig-fixierten Kernen und zeigt keine Korrelation mit der lateralen Kernausdehnung. Eine Ursache könnte sein, dass die gemessenen Größen für das Centromer 9 in Lymphozyten von $416 \pm 38 \text{ nm}$ für die Methanol/Eisessig-Fixierung und $448 \pm 54 \text{ nm}$ für die Formaldehyd-Fixierung sehr groß sind. In den dazugehörigen Abbildungen 3.34 und 3.35 des Kapitels 3.9 sind die

gefitteten Signale abgebildet, wobei die einzelnen Kugeln des *ten point models* zu erkennen sind. Möglicherweise liegt die Grenze für die Anwendbarkeit des *ten point models* in der Größenordnung der *TP-FWHM* von ungefähr 400 nm. Anscheinend muss für größere Objekte die Punktzahl von 10 auf 15 oder 20 erhöht werden.

Weiterhin sind aus der Größe des DNA-Moleküls, der Nukleosomen und der Zellkernvolumina Angaben über das Volumen von subchromosomalen Domänen möglich (siehe Kapitel 1.1), wobei genaue Größenangaben nur durch direkte Messungen subchromosomaler Bereiche *in situ* realisierbar sind. Bezüglich der Messungen in dieser Arbeit hinsichtlich der Unterschiede der verwendeten Fixierungen kann, unter der einfachen Annahme, dass die ca. 6000 Mbp [46] im Zellkern homogen verteilt sind, unter Berücksichtigung des in Kapitel 3.1.2 bestimmten Kernvolumens, das theoretische Volumen der mittels 220 kbp Sonde markierten 8q24/*c-myc* Domäne berechnet werden. Demzufolge hat die 8q24/*c-myc* Domäne in Methanol/Eisessig-fixierten VH7 Fibroblasten ein Volumen von $0,0259 \mu\text{m}^3$. In den Formaldehyd-fixierten Kernen der VH7 Fibroblasten ist das Volumen der Domäne mit $0,016 \mu\text{m}^3$ geringer als in der Methanol/Eisessig-Fixierung.

Umgekehrt kann aus der lateralen Ausdehnung der Gendomäne das Volumen berechnet werden, wenn man annimmt, dass es sich um eine Kugel handelt. Die 8q24/*c-myc* Domäne in der Methanol/Eisessig-Fixierung der VH7 Fibroblasten hat eine mittlere laterale Ausdehnung von 367 nm und damit ein Kugelvolumen von $0,0258 \mu\text{m}^3$. Das Kugelvolumen der Gendomäne mit einer lateralen Ausdehnung von 348 nm in Formaldehyd-fixierten VH7 Fibroblastenkernen beträgt $0,022 \mu\text{m}^3$. Beide Ansätze führen zu sehr ähnlichen Volumina.

Unter den gleichen Annahmen, wie eben beschrieben, kann die Volumenkompaktierung ($Mbp/\mu\text{m}^3$) berechnet werden. Für die Gendomäne bekannter Markierungslänge⁶ als auch für die gesamte DNA des humanen Genoms⁷ kann in Methanol/Eisessig-fixierten Zellen eine Volumenkompaktierung von $8,5 Mbp/\mu\text{m}^3$ ermittelt werden. In Formaldehyd-

⁶ $0,22Mbp/0,0258\mu\text{m}^3$

⁷ $6000Mbp/708\mu\text{m}^3$

fixierten Zellkernen beträgt die Volumenkompaktierung für die Genregion⁸ $10 \text{ Mpb}/\mu\text{m}^3$ und die Gesamt-DNA im Kern $13,6 \text{ Mbp}/\mu\text{m}^3$ ⁹. Diese höhere Kompaktierung der DNA in Zellkernen der Formaldehyd-Fixierung könnte an der Präzipitation der Proteine durch das Eisessig in dem Methanol/Eisessig-Fixativ liegen. Dies würde auch für eine bessere Konservierung der Zellkerne bei der Formaldehyd-Fixierung sprechen.

Eine weitere Anwendung des *ten point models* ist die Größenmessung von Domänen in Gewebe. Dazu wurde die Hybridisierung in Gewebe am Beispiel des Centromer 8, der 8q24 Gendomäne sowie des Centromer 9 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Prostatakrebsgewebe etabliert, wobei nur letzteres in die Auswertung eingeht und hier vorgestellt wurde. Nach Etablierung der Hämatoxylin/Eosin-Färbung konnte der gesunde vom pathologischen Bereich des Schnittes unterschieden werden und die Markierungen hinsichtlich möglicher Unterschiede der lateralen Ausdehnung des Centromer 9 in diesen Bereichen untersucht werden. Das Centromer 9 der Fibroblasten des gesunden Bereichs des selben Schnittes ist statistisch signifikant um 38 nm größer als im pathologischen Bereich. Eine Veränderung der Anzahl der Chromosomen 9 (Aneuploidie), wie bei [10] beschrieben, konnte nicht festgestellt werden. Brown et al. (1994) wiesen mittels FISH den Verlust von Chromosom 9 in ein von 12 Prostatakrebsproben nach [10]. Eine Aneuploidie von Chromosom 9 ist mit der Häufigkeit einer rezidiven Erkrankung verbunden. In wie weit die ermittelten Größenunterschiede krankheitsrelevant sind, ist fraglich. Eine automatisierte Detektion und Größenmessung tumor-relevanter Gene ist jedoch bei der schnellen Quantifizierung amplifizierter Chromatinbereiche sehr hilfreich. Außerdem hat die Charakterisierung subchromosomaler Domänen im Gewebe den Vorteil, die Domänen in den Zellkernen im Verband mit anderen Zellen zu erfassen. Zusätzlich bieten Gewebeschnitte die Möglichkeit subchromosomale Domänen in der selben Probe unter identischen Bedingungen bzw. Behandlungen in verschiedenen Zelltypen, je nach Art des Gewebes, vergleichend zu untersuchen. Um eine hohe Anzahl von Gewebeproben unter gleichen Bedingungen zu untersuchen, können so genannte *Tissue Microarrays* durchgeführt werden [65]. Dabei lassen sich bis zu 500 Proben aus Stanzbiopsien in einen

⁸ $0,22 \text{ Mbp}/0,022 \mu\text{m}^3$

⁹ $6000 \text{ Mbp}/442 \mu\text{m}^3$

Paraffinblock zusammenbringen und als Schnitt definierter Dicke auf einen Objekträger aufbringen.

Quantitative Studien zur Messung von Größen subchromosomaler Domänen sind rar [39]. Mittels SMI-Mikroskopie können Domänen zwischen 30 und 200 nm aufgelöst und gemessen werden. Größenmessungen von Chromatinbereichen mittels *ten point model* basierend auf CLSM-Bilddaten sind abhängig von der Größe des Objektes, der damit zusammenhängenden ausreichenden Photonenausbeute, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und die Genauigkeit der PSF-Abschätzung. Bei der verwendeten lateralen PSF von 250 nm ermöglicht dieses Modell die vertrauenswürdige Größenmessung oberhalb von 290 nm (Beads). Für Objekte größer als ca. 400 nm *TP-FWHM* sollte das Modell zur Auswertung der Größen neu angepaßt werden. Größenmessungen mittels CLSM sind nicht nur in fixierten Zellen möglich sondern auch in komplexen Gewebestrukturen. Veränderungen der Morphologie durch die Fixierung werden bei den Zellkernen deutlicher sichtbar als bei den subchromosomalen Domänen im Nanometer-Bereich. Auf eine Behandlung der Zellkerne mit hypotoner-Kaliumchlorid-Lösung reagiert nur der 8q24/c-myc Bereich mit einer signifikanten Zunahme der lateralen Ausdehnung. Die laterale Ausdehnung der markierten Centromere bleibt unverändert durch die Behandlung. In den Fibroblasten haben die subchromosomalen Bereiche der Formaldehyd-Fixierungen eine signifikant geringere Ausdehnung als in den Methanol/Eisessig-fixierten Zellen. Die laterale Ausdehnung der Domänen hängt z.T. mit der lateralen Ausdehnung der Zellkerne zusammen. Die untersuchten Domänen haben in mitotischen Chromosomen und Chromatin in Interphasekernen signifikant unterschiedliche laterale Ausdehnungen, wobei das Centromer 8 in Metaphasechromosomen kleiner ist als in Interphasechromatin und die 8q24 Domäne den umgekehrten Fall präsentiert. Die Unterschiede zwischen den beiden Zuständen des Chromatins betragen im Mittel jedoch nur 51 nm.

4.4 Topologie subchromosomaler Domänen unter Berücksichtigung der Fixierung

Modifikationen¹⁰ und die zeitlich-räumliche Anordnung des Chromatins im Zellkern und in den Chromosomenterritorien spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation von Prozessen im Kern (siehe Kapitel 1.1.3). Die zwei Arten von Chromatin, Eu- und Heterochromatin, sind beispielsweise in bestimmten Bereichen des Zellkerns zu finden, wobei das transkriptions-aktive Euchromatin bevorzugt im Inneren des Zellkerns vorkommt und das transkriptions-inaktive Heterochromatin nukleär peripher liegt. Daher wird vermutet, dass Gene, die vom inaktiven zum aktiven Status wechseln, auch ihre Position im Zellkern verändern. Am Beispiel des *Mash1* Gens konnte dies schon gezeigt werden [86]. Allerdings wurde auch gezeigt, dass nicht nur die Aktivität eines Gens eine Änderung der Position verursachen kann, sondern auch die Art der Präparation der Zellen (Fixierung) [47]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Fixierung (MAA+KCl, MAA-KCl, PFA) auf die radiale Position der subchromosomalen Domänen 8q24/*c-myc* und Centromer 8 in VH7 und LNCAP sowie des Centromer 9 in Lymphozyten in dreidimensionalen konfokalen Bilddaten untersucht. Außerdem wurden die Distanzen zwischen den homologen Domänen bestimmt, um eine Aussage über die Veränderungen der Domänen zu einander machen zu können. Neu an dieser Stelle ist die Quantifizierung der Lage der Domänen in ellipsoiden Zellkernen (Fibroblasten) mittels einer randbasierten, relativen radialen Positionierung [76].

Aufgrund der unterschiedlichen Synchronisation der VH7, LNCAP und Lymphozyten werden die Ergebnisse nur unter Vorbehalt vergleichend diskutiert. Die nicht-einheitliche Synchronisation der Zellen in der G_0 -Phase scheint der bedeutendste Grund für die interexperimentellen Schwankungen der Ergebnisse zu sein, wodurch nur wenige einheitliche Tendenzen des Einflusses der Fixierung auf die radiale Position und die Distanzen von subchromosomalen Domänen erkennbar werden. Die hohe Variabilität der Ergebnisse der Bestimmung der Zellkernmorphologie spiegelt sich somit teilweise auch an dieser Stelle wieder. Interessant ist allerdings, dass, obwohl sich beispielsweise das Volumen

¹⁰wie z.B. DNA-Methylierung, Histonmethylierung, Histonazetylierung

der Lymphozytenzellkerne der MAA+KCl-Fixierung im Vergleich mit denen ohne KCl-Behandlung signifikant ändert, die radiale Position als auch der Abstand der Signale (Centromer 9) hingegen unbeeinflusst bleibt. Bei den LNCAP Fibroblasten der beiden MAA-Suspensionen (+/- KCl) konnte ebenfalls kein Einfluss der KCl-Behandlung auf die Position und die Distanz der 8q24/*c-myc* Domäne sowie des Centromer 8 gemessen werden. Dies deckt sich aber mit den signifikant gleichen Kernvolumina der LNCAP Fibroblasten dieser Fixierungen (MAA +/- KCl) nach der Hybridisierung. Bei den Messungen der radialen Position der Chromatinbereiche in den Formaldehyd-fixierten Zellkernen der nichtsynchronisierten LNCAP Fibroblasten und der Lymphozyten zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Fixierung (MAA/PFA). Die markierten Regionen liegen bei den Formaldehyd-fixierten Kernen signifikant weiter außen im Vergleich zu den MAA-fixierten Kernen. Dieser Effekt ist zudem unabhängig davon, ob es sich um ellipsoide (Fibroblasten) oder sphärische (Lymphozyten) Zellen handelt. Die Distanz der Centromer 9 Homologen in PFA-fixierten Zellkernen von Lymphozyten ist signifikant geringer verglichen mit der Distanz der Homologen in MAA-fixierten Kernen. Dieses Ergebnis korreliert mit dem ebenfalls viel geringeren Zellkernvolumen der Formaldehyd-fixierten Kerne. Für folgende Experimente ist es unter Umständen von Interesse, die Distanz zwischen dem Gen (8q24) und dem Centromer des entsprechenden Chromosomenterritoriums nach gleichzeitiger Markierung des ganzen Chromosomes zu bestimmen, um den Einfluss der Fixierung auf die Lokalisation der subchromosomalen Domänen innerhalb des Territoriums zu untersuchen.

Bei allen Messungen der verschiedenen Chromatinbereiche der unterschiedlichen Zellen und Fixierungen lagen alle Mittelwerte für die radiale Lage zwischen der 40 %- und der 70 %-Schale des Zellkernradius. Um eine Aussage über die Lage (zentral, peripher) im Zellkern machen zu können, muß allerdings das Volumen der einzelnen Schalen berücksichtigt werden. Die wird erreicht, indem die jeweiligen Ergebnisse normiert auf 1 und in die dritte Potenz gesetzt werden. Für die Schalen bedeutet dies, dass erst die 80 %-Schale den inneren vom äußeren Kernbereich trennt ($80\%/100=0,80$; $0,80^3=0,51$). Damit liegen alle gemessenen radialen Positionen von Centromer 8, 9 und der 8q24/*c-myc* Domäne im Inneren der Zellkerne von VH7 und LNCAP bzw. den Lymphozyten. Zudem liegt die

8q24/*c-myc* Domäne in allen Präparationen weiter außen, wobei dies nur bei der MAA-Fixierung der ruhenden VH7 Fibroblasten nicht signifikant ist. Weiterhin ist auffällig, dass bei den VH7 Fibroblasten die markierten 8q24-Homologen bei beiden Fixierungen jeweils weiter von einander entfernt liegen als das Centromer 8 in den identischen Präparaten. Ob sich das Gen in G_1 -arretierten Fibroblasten bezüglich des Centromer 8 weiter zum Inneren des Zellkerns hin verlagert, wäre in einer weiteren Arbeit zu untersuchen. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivität des *c-myc* nicht zwingend eine signifikante Änderung der Position bewirkt. Dies wurde z.B. bei [35] beschrieben, wo die Lokalisation von *c-myc*-Transkriptionsstellen (aktiv, inaktiv) in HT29 Zellen untersucht wurde. Während der Zelldifferenzierung (inaktiv) veränderte sich die Lokalisation des *c-myc* Gens im Zellkern nicht signifikant im Vergleich zum aktiven Stadium des Gens [35]. Das *c-myc* Gen lag in dieser Studie ebenfalls im Zellkerninneren bei einer radialen Position von 46 % für das aktive Gen während der Differenzierung (keine Expression) und 51 % ohne Induktion der Differenzierung (Expression).

Laut Mahy et al. 2002 ist für die nukleäre Lokalisation von Chromatinbereichen neben dem Transkriptionsstatus vor allem die Gendichte der Chromosomen ausschlaggebend und weniger die Aktivität einzelner Gene [53]. Chromosomen mit einer hohen Gendichte befinden sich bevorzugt im Inneren, wobei gen-arme Chromosomen eher in der Peripherie der Zellkerne lokalisiert sind. Entgegen diese Annahme wurde für die 8q24/*c-myc*-Gendomäne als auch für die Centromere von Chromosom 8 und 9 unter Berücksichtigung des Zellkernvolumens eine Lokalisation im Zellkerninneren ermittelt, was, wie schon erwähnt, den Daten von [35] entspricht. Das Chromosom 8 ist mit ca. 145 Mbp größer als das Chromosom 9 (ca. 109 Mbp) und mit 614 bekannten Genen gen-arm ($5,6 \text{ Gene Mbp}^{-1}$)¹¹ mit nahezu 50 % sich wiederholenden Sequenzen [61] [42]. Das *c-myc* Gen befindet sich eher in heterochromatischen Bereichen des Chromosom 8 und ist nicht in so genannte *Genkluster* involviert [35]. Die Abbildung 4.1 zeigt die Lokalisation des *c-myc* Gens im langen Arm von Chromosom 8 mit den benachbarten proteinkodierenden Bereichen (braun). Die 220 kb-Sonde für die Markierung des *c-myc* bindet zwischen den Markern D8S1128 und D8S490 (Abbildung 4.1). Beim Chromosom 9 wurden dagegen

¹¹durchschnittliche Gendichte im humanen Genom beträgt 10 Gene Mbp^{-1}

1149 Gene und 426 Pseudogene identifiziert. Es gilt als gen-reich mit einem hohen GC-Anteil. Das markierte Centromer 9 ist außerdem durch heterochromatische C-Banden flankiert, die reich an Satelliten-Sequenzen sind. [42] Da in den meisten Publikationen nicht klar definiert wurde, ab welcher radialen Lage es sich um eine zentrale oder periphere Lokalisation der Chromosomen bzw. Chromatindomänen handelt, sind vergleichende Aussagen über den Zusammenhang zwischen Gendichte und Lage schwierig. Weiterhin sind die Algorithmen der Bildauswertung laborspezifisch und eine mögliche Ursache für die inhomogenen Ergebnisse, die großen Spielraum zur Interpretation der Daten und zum Aufstellen neuer innovativer Modelle zur Zellkernarchitektur geben. Die bei Bártová et al. (2002) verwendete FISH 2.0 Software des eigenen Laboratoriums scheint ähnlich der hier verwendeten Bildanalyse zu sein, bei der die radiale Position als Euklidische Distanz zwischen einem Gen und dem nächsten Punkt der Kerngrenze berechnet wird [11]. Diese Herangehensweise eignet sich besonders für Zellkerne mit einer veränderten Morphologie [11]. Allerdings wurden bei [11] die Distanzen zum Rand auf der Basis von zweidimensionalen Projektionen berechnet.

Bei der Betrachtung der radialen Position der Centromere 8 und 9 konnte gezeigt werden, dass die Fixierung einen Einfluss auf die Position heterochromatischer Bereiche im Zellkern hat. Dabei scheint aber eher der Verlust der Proteine durch die Verwendung von Eisessig [44] ursächlich zu sein, als mögliche Veränderungen der DNA durch Denaturierung. Hinweise dazu gibt die Untersuchung von Petrova et al. (2005), bei der humane primäre Fibroblasten lysiert, permeabilisiert und mit RNase behandelt sowie das Chromatin mittels DNase I und II aufgeschlossen wurden [63]. Anschließend erfolgte die Formaldehydfixierung und Markierung der Centromere von Chromosom X, 1 und 19. Das Hybridisierungsprotokoll beinhaltet ebenfalls zwei Ethanol-Reihen (Dehydrierung der Kerne). Die radiale Position der markierten Centromere wurde durch die starke Degradierung des Chromatins nicht beeinflusst, was für die Autoren ein Hinweis darauf ist, dass Proteine der Kernmatrix die Organisation des Interphasezellkerns bestimmen und weniger die elektrostatische Abstoßung des negativ geladenen Chromatins. In dieser Arbeit wurde Pepsin-Lösung zum Proteinabbau (Reduzierung der Eigenfluoreszenz und Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis) bei den Methanol/Eisessig- als auch bei den

PFA-fixierten Zellen verwendet. Der Einfluss des Proteinverdaues auf die Zellkernstruktur verhält sich anscheinend nicht identisch. Es ist naheliegend, dass bei der Vernetzung der Proteine durch Formaldehyd die Architektur des Zellkerns stabilisiert wird und ein Proteinverdau verzögert stattfindet. Dies könnte auch eine Ursache für den erhöhten Hintergrund (Eigenfluoreszenz der Proteine) bei den Formaldehyd-Präparationen sein, was bei den konfokalen und bei den Messungen mit dem SMI auffällig war. Bei den Methanol/Eisessig fixierten Zellen findet zu dem, wie schon beschrieben, ein Ausfällen der Proteine statt, was zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Größe (laterale Ausdehnung) und die radiale Position subchromosomaler Domänen sowie die Distanzen zwischen den Homologen der Domänen im Zellkern quantitativ mit neuen und verbesserten Algorithmen der Bildauswertung gemessen. Um eine konventionelle Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durchzuführen, eine Stabilisierung der Domänen zu erreichen und eine Mobilität der Domänen, wie es bei *in vivo* Messungen der Fall ist, zu vermeiden, wurden die Präparate fixiert. Da die am verbreitetsten Fixativa zum einen Methanol/Eisessig und zum anderen Formaldehyd sind, lag ein Schwerpunkt der Messungen auf der Quantifizierung des Einflusses dieser Fixierungen auf die Morphologie der Zellkerne sowie auf der lateralen Ausdehnung und Topologie der Domänen. Ein weiterer Schwerpunkt war die Bestimmung des Unterschiedes der lateralen Ausdehnung der Domänen in mitotischen Chromosomen und in Interphasezellkernen. Eine Markierung der Domänen wurde durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erreicht, wobei auch der Einfluss der Hybridisierungsprozedur auf die Zellkernmorphologie untersucht wurde.

In den normalen VH7 Fibroblasten und den fibroblastoiden LNCAP wurde das Centromer von Chromosom 8 und die heterochromatische Proto-Onkogen-Domäne 8q24/*c-myc* simultan markiert. Das Centromer von Chromosom 9 wurde in normalen Lymphozyten und Prostatakrebsgewebe mit einer Oligonukleotid-Sonde bekannter Sequenz (18 nt) hybridisiert. Die Detektion der präparierten Zellkerne erfolgte mittels konfokalem Laser-Rastermikroskop und mit dem *Spatially Modulated Illumination*-Mikroskop.

Der besondere Wert, der hier vorgelegten Untersuchungen der Zellkernmorphologie unter Berücksichtigung der Fixierung, liegt in der Quantifizierung des Einflusses mit Hilfe konfokaler Präzisionsmessungen und läßt folgende Schlussfolgerungen zu:

- Die Art der Fixierung und die anschließende Hybridisierung bewirken eine Veränderung der Zellkernmorphologie. Die Veränderungen sind nicht für alle Zellen gleich.
- Methanol/Eisessig-fixierte Zellkerne sind flacher als Formaldehyd-fixierte Kerne.
- Das Zellkernvolumen wird bei allen Präparaten unabhängig von der Fixierung durch die Hybridisierungsprozedur kleiner, wobei der Effekt bei den Formaldehyd-fixierten Zellen am Ausgeprägtesten ist.
- Der Morphologieverändernde Einfluss der KCl-Behandlung wird, vor allem bei den Zellkernen der Fibroblasten, durch Verlust der ellipsoiden Form deutlich.
- Die ellipsoide Form der Zellkerne von Fibroblasten nähert sich der Form von sphärischen Zellkernen an, wenn Fibroblasten in Suspension aufgenommen werden.

In dieser Arbeit wurden weiterhin erstmals konfokale quantitative Hochpräzisionsmessungen mit Hilfe des von David Baddeley entwickelten *ten point models* durchgeführt, deren Ergebnisse wie folgt zusammengefaßt werden können:

- Das zur Größenmessung verwendete *ten point model* führt zu einer Überschätzung der Größe von Objekten im 100 nm-Bereich und eine Unterschätzung der Größe ab 200 nm. Dies liegt an der physikalisch-begrenzte lichtoptischen Auflösung des CLSM (lateral \approx 250 nm, axial \approx 600 nm).
- Das *ten point model* kann hervorragend auch auf Gewebeschnitte angewendet werden.
- Der Unterschied der lateralen Ausdehnung der subchromosomalen Domänen zwischen mitotischen Chromosomen und Interphasechromatin ist mit einem Faktor von 1.18 für das Centromer 8 und 1.11 für die 8q24/c-myc Domäne gering, wobei die Genregion in Metaphase ausgedehnter ist als in Interphase.
- Die Gegensätzlichkeit der lateralen Ausdehnung von Centromer 8 und der Genregion in Meta- und Interphase in der selben Präparation lassen eine unterschiedliche Sensitivität innerhalb mitotischer Chromosomen gegenüber dem Fixativ, dem Proteinverdau und/oder der hohen Temperatur vermuten.

-
- Die Fixierung der Zellkerne hat auf die laterale Ausdehnung der subchromosomalen Domänen im Interphasekern einen geringen Einfluss. Die Domänen sind in Formaldehyd-fixierten Fibroblasten im Mittel um 22 nm kleiner als in Methanol/-Eisessig-fixierten Fibroblasten.
 - Die geringere laterale Zellkernausdehnung der Formaldehyd-fixierten Fibroblasten steht mit der geringeren lateralen Ausdehnung der subchromosomalen Domänen dieser Fixierung im Zusammenhang (verglichen mit Methanol/Eisessig).

Zusätzlich wurde der Einfluss der Fixierung auf die Topologie von Domänen im Zellkern quantifiziert, wobei das von Stefan Stein entwickelte Programm zur randbasierten, relativen radialen Positionsbestimmung verwendet wurde und diese Folgerungen zulässt:

- Die radiale Position der subchromosomalen Domänen und die Distanz zwischen den Homologen wird nicht durch die KCl-Behandlung beeinflusst.
- Bei den Zellkernen der Formaldehyd-Fixierung liegt das Centromer 8 (LNCAP) bzw. 9 (Lymphozyten) bei den nicht-synchronisierten Zellen weiter außen als in Methanol/Eisessig-fixierten Kernen.

Die quantitativen Messungen der subchromosomalen Domänen mit dem SMI-Mikroskop lassen nur wenige Aussagen zu, die da wären:

- Signale in Methanol/Eisessig-fixierten Zellen zeigen ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis als in Formaldehyd-fixierten Zellen.
- Die untersuchten Domänen sind alle deutlich größer als 200 nm.
- Die 8q24 Domäne in VH7 Fibroblasten zeigt im Zellkern eine höhere Modulationstiefe als in mitotischen Chromosomen, was auf Unterschiede in der Struktur dieser Domäne hinweisen könnte.

Um in zukünftigen Arbeiten, Aussagen über den Zusammenhang zwischen Größe der Domäne und Genaktivität bzw. Position im Zellkern und Genaktivität machen zu können, sollten die Zellen in der G_0 - als auch in der G_1 -Phase synchronisiert und mittels gleichzeitiger pKi-67 und Myc-Antikörpermarkierung identifiziert werden. Eine simultane Mar-

kierung der mRNA- und der DNA sollte ebenfalls aussagekräftig hinsichtlich der Aktivität sein. Größenmessungen *in vivo* bezüglich der Aktivität des Gens und damit zusammenhängende mögliche Strukturveränderungen sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau möglich. Für die Größenmessungen mittels SMI-Mikroskop wird eine Sonde benötigt, die einen kleineren Bereich der DNA markiert bzw. die Messungen sollten sich auf Objekte konzentrieren, bei denen man weiß, dass sie klein und sphärisch genug sind. Die Unterschätzungen der Größen mittels *ten point model* sollten reduziert werden, wenn statt eines Schätzwertes für die PSF (basierend auf anderen Messungen) eine, den Untersuchungen direkt begleitend, experimentell-ermittelte PSF verwendet wird. Außerdem sollte für zukünftige Abschätzungen der Größen von Domänen mittels *ten point models* der Zusammenhang zwischen mittlerer Distanz und Standardabweichung einer Gauß-förmigen Verteilung, an Stelle des eindimensionalen Falls, der zwei- bzw. dreidimensionale Fall verwendet werden. Der Korrekturfaktor von 1.128 wurde hier nicht mehr berücksichtigt, da zum jetzigen Zeitpunkt keine Vergleiche mit externen Daten durchgeführt werden.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Bilder von Chromatin bedeutender Experimente zwischen 1963 und 1994	11
1.2	Chromosomenterritorien verschiedener Chromosomen im Fibroblasten vom Huhn	12
1.3	Vergleich des ausgedehnten Chromatins in Interphase mit Chromatin in Mitosechromosomen	17
1.4	Schematische Darstellung der Kompaktierung von Chromatin	19
1.5	Schematische Darstellung des c-Myc-Proteins	23
1.6	Schematische Darstellung der Aktivierung der Genexpression durch Myc/Max-Bindung an die E-Box-Sequenz	24
1.7	Vereinfachtes Energietermdiagramm (Jablonski-Diagramm)	26
1.8	Prinzip des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	28
1.9	Objektraum des SMI-Mikroskops	32
1.10	Theoretische Punktbildfunktionen des CLSM und des 4Pi Typ A	33
2.1	<i>full width at half maximum</i>	64
2.2	<i>ten point model</i> am Beispiel eines 560 nm Beads (links) und des Centromer 9 (rechts)	65
2.3	Randbasierte relative radiale Position	67
2.4	Zusammenhang zwischen Modulationstiefe und einer kugelförmigen, homogenen Farbstoffverteilung ($\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$)	69
3.1	Visualisierung repräsentativer Zellkerne von Lymphozyten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung	74
3.2	Volumen der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	75

3.3	Axiale Ausdehnung der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	76
3.4	Anisotropie der Zellkerne von Lymphozyten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	77
3.5	Visualisierung repräsentativer Zellkerne von VH7 Fibroblasten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung	81
3.6	Volumen der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	82
3.7	Axiale Ausdehnung der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	83
3.8	Anisotropie der Zellkerne von VH7 Fibroblasten in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	84
3.9	Visualisierung repräsentativer Zellkerne von LNCAP Fibroblasten als Vergleich vor und nach FISH der MAA- und PFA-Fixierung	88
3.10	Volumen der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	89
3.11	Axiale Ausdehnung der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	90
3.12	Anisotropie der Zellkerne von LNCAP Zellen in Abhängigkeit der Fixierung und Hybridisierung	91
3.13	Detektion des Ki-67 Proteins mittels CLSM in VH7	93
3.14	Detektion des Ki-67 Proteins mittels CLSM in LNCAP	94
3.15	c-Myc-Expression in VH7	96
3.16	c-Myc-Expression in LNCAP	97
3.17	pAMACR-Expression in VH7	98
3.18	pAMACR-Expression in LNCAP	99
3.19	Beads mit steigendem Durchmesser	101
3.20	TP-FWHM von Beads unterschiedlichen Durchmessers	102
3.21	Anisotropie von Beads unterschiedlichen Durchmessers	102
3.22	Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 8 in VH7 Fibroblasten	105

3.23 Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von 8q24 in VH7 Fibroblasten	105
3.24 Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in Metaphase (1) und Interphase (2) der MAA-Fixierung von VH7 Zellen	106
3.25 Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in PFA-fixierten VH7 Zellen	107
3.26 Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie des Centromer 8 in LNCAP Fibroblasten	109
3.27 Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie der 8q24 Domäne in LNCAP Fibroblasten	109
3.28 Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in Metaphasen (MAA + KCl) von LNCAP Zellen	111
3.29 Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in MAA + KCl fixierten LNCAP Zellen . .	112
3.30 Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in MAA- (oben, 1) und PFA- (unten, 2) fixierten Interphasekernen von LNCAP Zellen	113
3.31 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Prostatakrebsgewebeschnitt	114
3.32 Bindungsspezifität der Oligo-Sonde für das Centromer 9 in Lymphozyten (A-D) und Gewebe (E-H)	117
3.33 Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten	119
3.34 Centromer 9 Oligo-Sonde in Metaphasechromosomen (oben,1) und Interphasekern (unten,2) von Lymphozyten (MAA, 75 mM KCl)	120
3.35 Centromer 9 Oligo-Sonde in Interphasekernen von Lymphozyten fixiert mit MAA ohne KCl (oben,1) und PFA (unten,2)	121
3.36 Laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 9 im PCa	122
3.37 Centromer 9 Oligo-Sonde in Fibroblasten des normalen (obere Box) und pathologischen (untere Box) Bereichs des PCa	124
3.38 Korrelation der lateralen Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> mit dem lateralen Äquivalenzradius der Zellkerne von VH7 Fibroblasten	125

3.39	Korrelation der lateralen Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> mit dem lateralen Äquivalenzradius der Zellkerne von LNCAP Fibroblasten	126
3.40	Korrelation der lateralen Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) von Centromer 9 mit der lateralen Ausdehnung der Zellkerne von Lymphocyten	126
3.41	Modulationstiefe von 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$	128
3.42	Axiale Intensitätsverteilung zweier 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$.	128
3.43	Modulationstiefe von 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$	129
3.44	Axiale Intensitätsverteilung zweier 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$.	129
3.45	Modulationstiefe von Centromer 8 und 8q24 in VH7	131
3.46	Centromer 8 markiert in Metaphasechromosomen und Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7 Zellen	132
3.47	8q24/ <i>c-myc</i> Gendomäne markiert in Metaphasechromosomen und Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7 Zellen	133
3.48	Relative radiale Position und Distanzen von Centromer 8 in Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7	135
3.49	Relative radiale Position und Distanzen von 8q24 in Interphasezellkernen (MAA, PFA) von VH7	136
3.50	Mittlere radiale Position von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in LNCAP Fibroblasten	137
3.51	Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den homologen Centromer 9 in Lymphocyten	139
3.52	Korrelation der radialen Position und der Distanz zwischen Homologen mit dem Zellkernvolumen von VH7	140
3.53	Korrelation der radialen Position mit dem Zellkernvolumen von LNCAP .	141
3.54	Korrelation der radialen Position und der Distanz zwischen Homologen mit dem Zellkernvolumen von Lymphocyten	141
4.1	Position des <i>c-myc</i> Gens auf Chromosom 8	167

Tabellenverzeichnis

1.1	Auswahl genetischer Veränderungen im Prostatakrebs [www.expertreview.org]	21
2.1	Fluorochrome und verwendete Sonden	39
2.2	Denaturierung kommerzieller Sonden	56
3.1	Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von Lymphozyten	72
3.2	Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von VH7 Fibroblasten	80
3.3	Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Werte der Kerne von LNCAP Fibroblasten	87
3.4	Laterale Ausdehnung (<i>FWHM</i> , <i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie unterschiedlich großer Beads	100
3.5	Mittlere laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in VH7 Fibroblasten	104
3.6	Mittlere laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in LNCAP Zellen	110
3.7	Bindungsspezifität der Oligo-Sonde für das Centromer 9	115
3.8	Mittlere laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 9 in Lymphozyten	118
3.9	Mittlere laterale Ausdehnung (<i>TP-FWHM</i>) und Anisotropie von Centromer 9 im PCa	122
3.10	Mittlere Modulationstiefe und axiale Ausdehnung von 100 nm Beads bei $\lambda_{Absorption}=488\text{nm}$ und $\lambda_{Absorption}=568\text{nm}$	127
3.11	Mittlere Modulationstiefen von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in VH7 . . .	130

3.12 Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den Homologen von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in VH7 Fibroblasten	134
3.13 Mittlere relative radiale Position von Centromer 8 und 8q24/ <i>c-myc</i> in LNCAP Fibroblasten	137
3.14 Mittlere relative radiale Position und Distanz zwischen den Homologen von Centromer 9 in Lymphozyten	138

Literaturverzeichnis

- [1] ALERS, J.C., P.J. KRIJTENBURG, A.N. VIS, R.F. HOEDEMAEKER, M.F. WILDHAGEN, W.C. HOP, T.T. VAN DER KWAST, F.H. SCHRODER, H.J. TANKE und H. VAN DEKKEN: *Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies: early cancers may contain aggressive genetic features*. Am J Pathol., 158(2):399–406, 2001.
- [2] AMERY, L., M. FRANSEN, K. DE NYS, G.P. MANNAERTS und P.P. VAN VELDHoven: *Mitochondrial and peroxisomal targeting of 2-methylacyl-CoA racemase in human*. Journal of Lipid Research, 41:1752–1759, 2000.
- [3] BADDELEY, D.: *Dissertation: im Prozess*, 2007.
- [4] BADDELEY, D., Y. WEILAND, U. BIRK und C.CREMER: *Model based precision structural measurements on barely resolved objects*. Manuskript fertig.
- [5] BAILEY, B., D.L. FARKAS, D.L. TAYLOR und F. LANNI: *Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation*. Nature, 366(6450):44–48, 1993.
- [6] B.ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS und P. WALTER: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, ISBN 0815340729, 2002.
- [7] BORNFLETH, H., P. EDELMANN, D. ZINK, T. CREMER und C. CREMER: *Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy*. Biophysical Journal, 77:2871–2886, 1999.
- [8] BOYLE, S., S. GILCHRIST, J.M. BRIDGER, N.L. MAHY, J.A. ELLIS und W.A. BICKMORE: *The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells*. Hum Molec Genet., 10(3):211–219, 2001.

- [9] BRANCO, M.R. und A. POMBO: *Chromosome organization: new facts, new models*. TRENDS in Cell Biology, 17(3):127–134, 2007.
- [10] BROWN, J.A., A. ALCARAZ, S. TAKAHASHI, D.L. PERSONS, M.M. LIEBER und R.B. JENKINS: *Chromosomal aneusomies detected by fluorescent in situ hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma*. J Urol., 152(4):1157–1162, 1994.
- [11] BÁRTOVÁ, E., S. KOZUBEK, P. JIRSOVÁ, M. KOZUBEK, H. GAJOVÁ, E. LUKÁSOVÁ, M. SKALNÍKOVÁ, A. GANOVÁ, I. KOUTNÁ und MICHAEL HAUSMANN: *Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells*. Journal of Structural Biology, 139(2):76–89, 2002.
- [12] CARTER, N. P.: *Fluorescence in situ hybridization - state of the art*. Bioimaging, 4:41–51, 1996.
- [13] CHENG, S.-W.G., K.P. DAVIES, E. YUNG, R.J. BELTRAN, J. YU und G.V. KALPANA: *c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function*. Nature Genetics, 22:102–105, 1999.
- [14] CHUNG, H.-J. und D. LEVENS: *c-myc Expression: Keep the Noise Down!* Mol Cells, 20:157–166, 2005.
- [15] CREMER, C. und T. CREMER: *Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field*. Microsc Acta., 81(1):31–44, 1978.
- [16] CREMER, M., J. VON HAASE, T. VOLM, A. BRERO, G. KRETH, J. WALTER, C. FISCHER, I. SOLOVEI, C. CREMER und T. CREMER: *Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells*. Chromos Res., 9:541–567, 2001.
- [17] CREMER, T. und C. CREMER: *Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells*. Nature Reviews Genetics, 2:292–301, 2001.
- [18] CREMER, T., M. CREMER, S. DIETZEL, S. MUELLER, I. SOLOVEI und S. FAKAN: *Chromosome territories - a functional nuclear landscape*. Curr Opin Cell Biol., 18:307–316, 2006.

- [19] CROFT, J.A., J.M. BRIDGER, S. BOYLE, P. PERRY, P. TEAGUE und W.A. BICKMORE: *Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus*. J. Cell Biol., 145(6):1119–1131, 1999.
- [20] DANG, C.V.: *c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism*. Mol Cell Biol., 19(1):1–11, 1999.
- [21] DARZYNKIEWICZ, T., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS und M.R. MELAMED: *Different sensitivity of DNA in situ in interphase and metaphase chromatin to heat denaturation*. J Cell Biol, 73(1):128–38, 1977.
- [22] DEHGHANI, H., G. DELLAIRE und D.P. BAZETT-JONES: *Organization of chromatin in the interphase mammalian cell*. Micron, 36:95–108, 2005.
- [23] EILERS, M., S. SCHIRM und J.M. BISHOP: *The MYC protein activates transcription of the α -prothymosin gene*. EMBO Journal, 10(1):133–141, 1991.
- [24] E.K., DR. HARTMUT SCHULTHEISS: *Immunhistochemie. Paraffingängige Antikörper. Färbereagenzien*. Katalog 2003/2004, Seite 15, 2003/2004.
- [25] EVAN, G.I., G.K. LEWIS, G. RAMSAY und J.M. BISHOP: *Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product*. Mol. Cell Biol., 5(12):3610–3616, 1985.
- [26] FAILLA, A.V., B. ALBRECHT, U. SPÖRI, A. SCHWEITZER, A. KROLL, G. HILDENBRAND, M. BACH und C. CREMER: *Nanostructure Analysis Using Spatially Modulated Illumination Microscopy*. ComPlexUs, 1:77–88, 2003.
- [27] FAKAN, S.: *The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry*. Histochem Cell Biol., 122:83–93, 2004.
- [28] FARIA, M.H.G., B.P.A. GONCALVES, R.M.DO S.V. DO PATROCÍNIO, M.O. DEMORAES FILHO und S.H.B. RABENHORST: *Expression of Ki-67, Topoisomerase II α and c-MYC in astrocytic tumors: Correlation with the histopathological grade and proliferative status*. Neuropathology, 26:519–527, 2006.
- [29] FERCHER, A.F.: *Medizinische Physik*. Springer-Verlag, ISBN 3-211-82371-9, 1992.

- [30] FERDINANDUSSE, S., S. DENIS, L. IJLST, G. DACREMONT, H.R. WATERHAM und R.J.A. WANDERS: *Subcellular localization and physiological role of α -methylacyl-CoA racemase*. Journal of Lipid Research, 41:1890–1896, 2000.
- [31] FORD, S., I.C. GRAY und N.K. SPURR: *Rearrangement of the long arm of chromosome 10 in the prostate adenocarcinoma cell line LNCaP*. Cancer Genet. Cytogenet., 102(1):6–11, 1998.
- [32] GOLDMAN, R.D., Y. GRUENBAUM, R.D. MOIR, D.K. SHUMAKER und T.P. SPANN: *Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture*. Genes Dev., 16:533–547, 2002.
- [33] GROSSMANN, C.: *Diplomarbeit: Vergleichende fluoreszenzoptische Untersuchungen zur Genom-Mikro- und Nanostruktur der BCR- und ABL-Region an Kontroll-, Remissions und CML-Präparaten*, 2005.
- [34] GRUENBAUM, Y., K.L. WILSON, A. HAREL, M. GOLDBERG und M. COHEN: *Review: Nuclear Lamins — Structural Proteins with Fundamental Functions*. J Struct Biol., 129:Abstract, 2000.
- [35] HARNICAROVÁ, A., S. KOZUBEK, J. PACHERNÍK, J. KREJCI und E. BÁRTOVÁ: *Distinct nuclear arrangement of active and inactive c-myc genes in control and differentiated colon carcinoma cells*. Experimental Cell Research, 312(20):4019–4035, 2006.
- [36] HELL, S.W. und E. H. K. STELZER: *Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation*. Opt. Commun., 93:277–282, 1992.
- [37] HELL, S.W. und E. H. K. STELZER: *Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope*. J. Opt. Soc. Am. A., 9:2159–2166, 1992.
- [38] HEPPERGER, C., S. OTTEN, J.V. HASE und S. DIETZEL: *Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments*. Chromosoma, 116:117–133, 2007.

- [39] HILDENBRAND, G., A. RAPP, U. SPÖRI, C. WAGNER, C. CREMER und M. HAUSMANN: *Nano-Sizing of Specific Gene Domains in Intact Human Cell Nuclei by Spatially Modulated Illumination Microscopy*. Biophysical Journal, 88:4312–4318, 2005.
- [40] HIRANO, T.: *Chromosome Cohesion, Condensation, and Separation*. Annu Rev Biochem., 69:115–144, 2000.
- [41] HUBERMAN, J.A. und G. ATTARDI: *ISOLATION OF METAPHASE CHROMOSOMES FROM HELA CELLS*. Journal of Cell Biology, 31:95–105, 1966.
- [42] HUMPHRAY, S.J., K. OLIVER, A.R. HUNT, R.W. PLUMB und ET AL.: *DNA sequence and analysis of human chromosome 9*. Nature, 429:369–374, 2004.
- [43] KELLEY, J.C.: *Histologie*. Springer Verlag, ISBN 3-540-41858-X, 2002.
- [44] KIERNAN, J.A.: *Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do*. Microscopy Today, 00-1:8–12, 2000.
- [45] KILL, I.R.: *Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus*. J. Cell Sci., 109(6):1253–1263, 1996.
- [46] KNIPPERS, R.: *Molekulare Genetik*. Thieme-Verlag, ISBN 3-13-477008-3, 2001.
- [47] KOZUBEK, S., E. LUKÁSOVÁ, J. AMRICHOVÁ, M. KOZUBEK, A. LISKOVÁ und J. SLOTOVÁ: *Influence of Cell Fixation on Chromatin Topography*. Analytical Biochemistry, 282:29–38, 2000.
- [48] KRAMER, M.: *Evaneszente Wellen in der Mikroskopie*. Photonik, 2:42–44, 2004.
- [49] KUBBUTAT, M.H.G., G. KEY, M. DUCHROW, C. SCHLUETER, H.-D. FLAD und J. GERDES: *Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein)*. J. Clin. Pathol., 47(6):524–528, 1994.
- [50] LAMOND, A.I. und W.C. EARNSHAW: *Structure and Function in the Nucleus*. SCIENCE, 280:547–553, 1998.

- [51] LATIL, A. und R. LIDEREAU: *Genetic aspects of prostate cancer*. Virchows Arch., 432:389–404, 1998.
- [52] LODISH, H., A. BERK, L.S. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE und J. DARNELL: *Molecular Cell Biology*. online: <http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>, ISBN 0-7167-3136-3, 2000.
- [53] MAHY, N.L., P.E. PERRY und W.A. BICKMORE: *Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH*. Journal of Cell Biology, 159(5):753–763, 2002.
- [54] MANDERS, E.M.M., A.E. VISSER, A. KOPPEN, W.C. DE LEEUW, R. VAN LIERE, G.J. BRAKENHOFF und R. VAN DRIEL: *Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus*. Chromosome Research, 11(5):537–547, 2003.
- [55] MANUEL, M., C. SCASSELLATI, G. MEISTER, O. PLÖTTNER, D. BÜHLER, G. SOWA, T.E. MARTIN, E. KEIDEL, U. FISCHER und S. FAKAN: *Ultrastructural characterisation of a nuclear domain highly enriched in survival of motor neuron (SMN) protein*. Experimental Cell Research, 292:Abstract, 2004.
- [56] MANUELIDIS, L.: *Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization*. Hum Genet., Seiten 288–293, 1985.
- [57] MARTIN, S., A.V. FAILLA, U. SPÖRI, C. CREMER und A. POMBO: *Measuring the Size of Biological Nanostructures with Spatially Modulated Illumination Microscopy*. Molecular Biology of the Cell, 15:000–000, 2004.
- [58] MATHÉE, H.: *Dissertation: Hochpräzisionsmikroskopie mit räumlich strukturierter Beleuchtung und Zweiphotonenanregung*, 2006.
- [59] MINSKY, M.: *Microscopy Apparatus*. US Patent 3013467, 1961.
- [60] MISTELI, T.: *Concepts of nuclear architecture*. BioEssays, 27:477–487, 2005.
- [61] NUSBAUM, C., T.S. MIKKELSEN, M.C. ZODY, S. ASAKAWA und ET AL.: *DNA sequence and analysis of human chromosome 8*. Nature, 439(19):331–335, 2006.

- [62] PARADA, L.A. und T. MISTELI: *Chromosome positioning in the interphase nucleus*. Trends in Cell Biology, 12(9):425–432, 2002.
- [63] PETROVA, N.V., O.V. IAROVAIA, V.A. VERBOVOY und S.V. RAZIN: *Specific radial positions of centromeres of human chromosomes X, 1, and 19 remain unchanged in chromatin-depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix*. J Cell Biochem, 96(4):850–587, 2005.
- [64] POPPA, D., A. YAMAMOTOB, M. IWASAA und Y. MAÉDA: *Direct visualization of actin nematic network formation and dynamics*. Biochem Biophys Res Communic, 352(2):348–353, 2006.
- [65] RIJN, M. VAN DE und C.B. GILKS: *Applications od microarray to histopathology*. Histopathology, 44:97–108, 2004.
- [66] RUJITER, E., C. VAN DE KAA, G. MILLER, D. RUJITER, F. DEBRUYNE und J. SCHALKEN: *Molecular Genetics and Epidemiology of Prostate Cancer*. Endocrine Reviews, 20(1):22–45, 1999.
- [67] SCHARDIN, M., T. CREMER, H.D. HAGER und M. LANG: *Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories*. Hum Genet., 71(4):281–287, 1985.
- [68] SCHLOSSER, I.: *Dissertation: Zielgene des Proto-Onkogens c-myc: Von der genomweiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung*, 2003.
- [69] SCHLOSSER, I.: *Dissertation: Zielgene des Proto-Onkogens c-myc: Von der genomweiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung*, 2003.
- [70] SCHMIDT, W.: *Optische Spektroskopie - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker*. Verlag VCH, ISBN 3-527-29035-4, 1994.
- [71] SCHOLZEN, T. und J. GERDES: *The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown*. J. Cell. Physiol., 182(3):311–322, 2000.
- [72] SCHRADER, M., K. BAHLMANN, G. GIESE und S.W. HELL: *4Pi-Confocal Imaging in Fixed Biological Specimens*. Biophys. Journal, 75(4):1659–1668, 1998.

- [73] SLAVÍK, J.: *Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. Plenum Press, ISBN 0-306-45392-4, 1996.
- [74] SOLOVEI, I., A. CAVALLO, L. SCHERMELLEH, F. JAUNIN, C. SCASELATI, D. CMARKO, C. CREMER, S. FAKAN und T. CREMER: *Spatial Preservation of Nuclear Chromatin Architecture during Three-Dimensional Fluorescence in Situ Hybridization (3D-FISH)*. *Experimental Cell Research*, 276:10–23, 2002.
- [75] SOLOVEI, I., L. SCHERMELLEH, K. DÜRING, A. ENGELHARDT, S. STEIN, C. CREMER und T. CREMER: *Differences in centromere positioning of cycling and post-mitotic human cell types*. *Chromosoma*, 112:410–423, 2004.
- [76] STEIN, S.: *Dissertation: Quantifizierung der dreidimensionalen Mikroarchitektur von Genomelementen nach spezifischer Fluoreszenzmarkierung in fixierten und vitalen Zellen*, 2006.
- [77] STREFFORD, J.C., D.M. LILLINGTON, B.D. YOUNG und R.T.D. OLIVER: *The use of multicolor fluorescence technologies in the characterization of prostate carcinoma cell lines: a comparison of multiplex fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping data*. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 124(2):112–121, 2001.
- [78] TOMLINS, S.A., R. MEHRA, D.R. RHODES, X. CAO, L. WANG, S.M. DHANASEKARAN, S. KALYANA-SUNDARAM, J.T. WEI, M.A. RUBIN, K.J. PIANTA, R.B. SHAH und A.M. CHINNAIYAN: *Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression*. *Nat Genet.*, 39(1):41–51, 2007.
- [79] USCHIYAMA, S., S. KOBAYASHI, H. TAKATA, T. ISHIHARA, T. SONE, S. MATSUNAGA und K. FUKUI: *Protein composition of human metaphase chromosomes analyzed by two-dimensional electrophoreses*. *Cytogenetic Genome Research*, 107:49–54, 2004.
- [80] VERHOEVEN, N.M., D.S. ROE, R.M. KOK, R.J. WANDERS, C. JAKOBS und C.R. ROE: *Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reaction in cultured fibroblasts*. *Journal of Lipid Research*, 39:66–74, 1998.

- [81] WAGNER, C., U. SPÖRI und C. CREMER: *High-precision SMI microscopy size measurements by simultaneous frequency domain reconstruction of the axial point spread function*. *Optik*, 116:15–21, 2005.
- [82] WATSON, J. D. und F. H. C. CRICK: *Molecular structure of nucleic acids: a structure for desoxyribose nucleic acid*. *Nature*, Apr 26(248):765, 1974.
- [83] WEGEL, E. und P. SHAW: *Gene activation and deactivation related changes in the three-dimensional structure of chromatin*. *Chromosoma*, 114(5):331–337, 2005.
- [84] WILHELM, S., B. GRÖBLER, M. GLUCH und H. HEINZ: *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie - Grundlagen*, Zeiss.
- [85] WILLIAMS, K., S. FERNANDEZ, X. STIEN, K. ISHII, H.D. LOVE, Y.-F. LAU, R.L. ROBERTS und S.W. HAYWARD: *Unopposed c-MYC Expression in Benign Prostatic Epithelium Causes a Cancer Phenotype*. *The Prostate*, 63:369–384, 2005.
- [86] WILLIAMS, R.R., V. AZUARA, P. PERRY, S. SAUER, M. DVORKINA, H. JORGENSEN, J. ROIX, P. MCQUEEN, T. MISTELI, M. MERKENSCHLAGER und A.G. FISCHER: *Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus*. *J. Cell Sci.*, 119:132–140, 2006.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die ich während meiner Arbeit kennen und schätzen gelernt habe.



Prof. Dr. Dr. C. Cremer als meinem Doktorvater danke ich vielfach für die Überlassung des vielseitigen Themas, die Betreuung und seine Begeisterung für meine Arbeit.

Bei PD K. Rippe möchte ich mich ebenfalls vielfach bedanken. Vor allem für die Erstbegutachtung meiner Arbeit und die Möglichkeit, biologische Fragen zu klären.

Dr. Gregor Kreth gilt mein ganz persönlicher Dank für die umfangreiche Hilfe bei meiner Arbeit. Danke für dein Fachwissen, für die zahlreichen kleinen und großen Diskussionen, deine Ratschläge, dein Zuspruch, deine Freundschaft. Danke für alles!

Frau Dr. Jutta Schwarz-Finsterle möchte ich danken für die Einführung in die Arbeitsgruppe und die Methodik, die Unterstützung bei meinen Vorhaben und den herzlichen Beistand während der ersten und schwierigsten Hälfte meiner Arbeit.

Margund Bach möchte ich ganz herzlich für ihre liebe Art und ihr Engagement, nicht nur bei der Suche nach verschollenen Publikationen, danken.

Prof. N. Gretz vom Zentrum für Medizinische Forschung in Mannheim danke ich für die finanzielle Unterstützung, für die nicht-Physik-orientierten Seminare und für die halbjährlichen *progress reports* auf nicht ganz freiwilliger Basis. Frau Dr. S. Zimmermann danke ich ganz herzlich für die große Geduld bei der Entgegennahme meiner zahlreichen

Fragen und die Organisation der Veranstaltungen vom Graduiertenkollege.

David Baddeley danke ich vielmals für die Entwicklung der zahlreichen Programme, ohne die ich meine Daten nicht auswerten hätte können. Danke für die manchmal sehr langen und kritischen aber sehr netten Diskussionen, deinen Ideenreichtum und deine Begeisterungsfähigkeit.

Bei Dr. Stefan Stein möchte ich mich vor allem dafür bedanken, dass er meine Daten mit seinem neuesten Programm ausgewertet hat und dass er nicht nur unser Büro sondern auch die Mittagessen mit guter Laune und komischen Ideen belebt hat.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Carmen Boxler. Danke dafür, dass du mir so viele Tipps in Sachen Histologie gegeben hast und ich deine Aufnahmen in meiner Arbeit verwenden durfte, dass du so voller Ideen und Energie bist, dass du an mich glaubst, dass du mir in Davos die Hand gehalten hast und danke für die extreme *sightseeing* Tour in Barcelona. Danke!

Vielen Dank Florence Tchegnà Djikimi, dass du meine Diplomandin warst, dass du die Untersuchungen des AMACR-Gens übernommen hast und die Aufnahmen der Zellkerne vor FISH durchgeführt hast. Danke auch dafür, dass du weibliches *flair* ins Büro gebracht hast und wir zusammen Pferde stehlen konnten.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Zuhail Kaya. Danke für die fachliche Hilfe in der Zellkultur und bei Fragen der Chemie, aber vor allem danke, dass du meine beste Freundin geworden bist, danke, für deine offene, selbstbewusste und zielstrebige Art, für die vielen gemeinsamen lustigen Stunden.

Für das enorme Engagement bei meinen großen und kleinen Computerproblemen bin ich Gregor, David, Jürgen und Roman zu tiefen Dank verpflichtet. Danke! Danke!

Für die Bereitschaft, meine Arbeit Korrektur zu lesen, bedanke ich mich ganz herzlich bei Gregor, David, Patrick, Thomas, Carmen, Jutta, Roman, Jürgen, Margund, Bianca und bei beiden Gutachtern.

Bei Yanina Weiland, Wei Jiang, Patrick Müller, Heinz Eipel und Thibaud Jegou bedanke ich mich ganz herzlich für die Diskussion biologischer Themen an guten und schlechten Tagen.

Prof. Dr. M. Hausmann und Dr. E. Schmitt (IMB, Jena) danke ich für die Aktivitäten im Gebiet der COMBO-FISH. Ich danke auch Dr. Johann v. Hase für die Bildauswertungen, Dr. Nikolaus Kepper alias Nick für die Simulationen, Yanina Weiland für die Etablierung der BAC-Sonden-Präparation und Jürgen Reymann für die gemeinsamen Messungen am vertikalen SMI. Leider gingen die Daten nicht in diese Arbeit ein. Für die Etablierung der pKi-67 Immunofluoreszenz bedanke ich mich ebenfalls bei Yanina Weiland.

Mein Dank geht auch an Prof. H.-J. Gröne vom DKFZ, Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie, für die Bereitstellung und die Beurteilung der histologischen Schnitte sowie an Frau G. Schmidt für die Präparation der Schnitte. Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Frau Prof. P. Boukamp vom DKFZ, Abteilung Genetik der Hautcarcinogenese, für die normalen, primären Vorhautfibroblasten bedanken.

Bei Corina Müller, Rosemarie Eidsness und Harald Jacobson bedanke ich mich ganz herzlich dafür, dass ihre Bürotüren nicht nur zu den Öffnungszeiten offen standen.

Den aktuellen Diplomanden Manuel Gunkel, Paul Lemmer und Reza Shaiganfar wünsche ich alles Gute für die Abgabe der Diplomarbeit.

Um auch die Ehemaligen im Gedächtnis zu behalten, möchte ich mich für die gemeinsame Zeit ganz herzlich bei Jürgen Bastert, Dr. Udo Birk, Dr. Christian Carl, Constance Großmann, Susanne Fenz, Dr. Lars Hildenbrand, Daniel Hübschmann, Katrin Mäcken,

Dr. Hans Mathée, Senthilkumar Pazhanisamy, Adrian Pfeiffer, Bianca Reinhard, Dr. Nutan Sampat, Dr. Andreas Schweitzer, Florian Staier, Elvira Steinwand und Dr. Christian Wagner bedanken.

» «

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinen Brüdern, meinen Großeltern und Freunden für die anhaltende Unterstützung während des Studiums und der Promotion aus ganzem Herzen danken.

» «