

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Struktur des Chromosoms 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Jan Claussen
aus Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling

2. Prof. Dr. I. Hansmann

3. Prof. Dr. C. Fonatsch

Datum der Promotion: 04.02.2009

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1. Das Konzept der Chromosomenkondensation - bestätigende Phänomene	10
1.2. Das Konzept der Chromosomenkondensation - widerlegende Beobachtungen	12
1.3. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	14
1.4. Die Grundlagen: M-FISH und SKY	16
1.5. Das Multicolor-banding (MCB)	17
2. PROBLEMSTELLUNG	19
2.1. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen	19
2.2. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen während der verschiedenen Zellzyklusstadien	20
2.3. Erkennung von Chromosom 5-spezifischen Chromosomenaberrationen im Interphasekern	20
2.4. Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern	20
2.5. Chromosomenform	21
2.6. Länge des Chromosoms 5 der HeLa-Zellen in der Interphase	21
2.7. Chromosomenfläche	21
2.8. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen	22
3. MATERIAL UND METHODE	23
3.1. Kultivierung von HeLa-Zellen	23

Inhaltsverzeichnis

3.2. Synchronisation	23
3.2.1. Synchronisation in der G1-Phase bis zur frühen S-Phase	24
3.2.2. Synchronisation in der S-Phase bis zur G2-Phase	24
3.3. Aufarbeitung und Präparation	25
3.3.1. Aufarbeitung	25
3.3.2. Präparation	26
3.4. Multicolor-banding	26
3.4.1. Vorbehandlung und Denaturierung der OT	27
3.4.2. Hybridisierung der Proben	27
3.4.3. Detektion	28
3.5. Auswertung	29
3.5.1. Auswahlkriterien	29
3.5.1.1. Form des Kerns	30
3.5.1.2. Morphologie des Chromosoms	30
3.5.1.3. Darstellung des Chromosoms	30
3.5.2. Analytierte Parameter	30
3.5.2.1. Fläche des Kerns	30
3.5.2.2. Lage des Chromosoms im Kern	31
3.5.2.3. Chromosomenlänge und Chromosomenform	32
3.5.2.4. Chromosom im Zentromer geknickt?	33
3.5.2.5. Falschfarbachse 6	33
3.5.2.6. Falschfarbachse 11	33
3.5.2.7. Falschfarbachse 16	34
3.5.2.8. Chromosomenfläche	34
3.5.2.9. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen	35
3.6. Statistische Methoden	36
3.6.1. Metrische Faktoren	37
3.6.2. Morphologische Faktoren	38

Inhaltsverzeichnis

4. ERGEBNISSE	42
4.1. Fläche des Kerns	43
4.2. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen	44
4.3. Darstellung der HeLa-Zellen während der verschiedenen Zellzyklusstadien	45
4.4. Chromosom 5-spezifische Chromosomenaberrationen	48
4.5. Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern	48
4.6. Chromosomenform	49
4.7. Chromosomenlänge	50
4.8. Chromosomenfläche	52
4.9. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen	53
5. DISKUSSION	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
7. LITERATURVERZEICHNIS	66
8. DANKSAGUNG	72
ERKLÄRUNG	73
LEBENS LAUF	74
EIGENE PUBLIKATIONEN	75

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CCD-Kamera	charged coupled device-Kamera, gekühlter - ladungsgekoppelter Bildsensor
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cy	Cyanin
DAPI	4'-6-Diamino-2-Phenylindol
DEAC	Diethylaminocoumarin-5-dUTP
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTG	G-Bands by Trypsin using Giemsa
h	hour (Stunde)
KCl	Kaliumchlorid
MCB	multi color banding
M-FISH	multi color-FISH
min	Minuten
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N ₂ O	Lachgas
NaOH	Natronlauge
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
pcp	partial chromosome painting

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCC	premature chromosome condensation
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentrationen
U/min	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
SKY	Spectral Karyotyping
SSC	Standard saline citrate, Natriumchlorid-Tri-Natriumcitrat
SSCT	SSC mit Tween® (Detergenz)
Tab.	Tabelle
v.a.	vor allem
wcp	whole chromosome painting
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

Einleitung

1. Einleitung

Chromosomen im Interphasekern zeigen nach Einsatz herkömmlicher Techniken, beispielsweise zur Darstellung der Banden von Metaphasechromosomen, keinerlei Strukturen. Sie stehen damit im Gegensatz zu Metaphasechromosomen, an denen die Zentromere, die Telomere, die Chromatiden, deren Form sowie auch deren Länge gesehen, vermessen und bewertet werden können. Dieser seit Jahrzehnten bekannte Unterschied hat wesentlich zu unserem Verständnis von Chromosomen im Interphasekern beigetragen (Comings, 1968) und unsere Vorstellungen zur Kondensation und Dekondensation von Chromosomen während des Zellzyklus geprägt. Dieses Konzept der Kondensation von Chromosomen sieht vor, dass die Chromosomen im Interphasekern dekondensiert sind und nach der S-Phase über ein „Clustering of loops“ sich zu den langen Prophasechromosomen verkürzen, die nach GTG-Bänderung mehr als Tausend Banden aufweisen (Yunis, 1981). Auf dem Weg über die Metaphase zur Anaphase findet eine weitere Verkürzung der Chromosomen statt. Dekondensation erfolgt, nachdem die Zelle sich in ihre beiden Tochterzellen geteilt hat.

Für die Richtigkeit dieses dynamischen Konzeptes sprechen zahlreiche, sich aus der zytogenetischen Routinediagnostik ergebenden Beobachtungen, wie beispielsweise das Auftreten sehr langer Prophasechromosomen nach chromosomaler Aufarbeitung kurz nach Abschluss der G₂-Phase. Eine spätere Aufarbeitung führt regelmäßig zu kürzeren Chromosomen (z.B. zu Metaphasechromosomen).

Es haben sich aber auch Zweifel an der Richtigkeit des Konzeptes der Chromosomenkondensation ergeben, die auf der Beobachtung beruhen, dass Metaphasechromosomen hoch elastisch sind und während der Chromosomenpräparation durch den Einfluss der Fixation gedehnt werden (Claussen et al., 1994; Hliscs et al., 1997a).

Die vorliegende Arbeit befasst sich am Beispiel von Chromosom 5 mit der Frage der Struktur menschlicher Chromosomen im Interphasekern unter besonderer Berücksichtigung des Zellzyklus. Die Ergebnisse an HeLa-Zellen zeigen, dass Chromosomen im Interphasekern mittels Einsatz der FISH-Technologie, und damit auf

Einleitung

DNA-Ebene, sichtbar gemacht werden können. Sie zeigen im Vergleich zu Metaphasechromosomen ein sehr ähnliches Bandenmuster, sind von vergleichbarer Länge, erscheinen aber besonders in der S-Phase breiter. Das Konzept der Kondensation und Dekondensation von Chromosomen muss demnach überdacht werden. Die in HeLa-Zellen bekannten Chromosomenaberrationen sind auch in den Interphasekernen darstellbar. Dies weist darauf hin, dass in Zukunft auch bei Zellen, die sich nicht mehr teilen, eine chromosomale Diagnostik auf Bandenniveau in Interphasekernen möglich sein dürfte.

Einleitung

1.1. Das Konzept der Chromosomenkondensation – bestätigende Phänomene

Das zur Zeit akzeptierte Konzept der Chromosomenkondensation während des Zellzyklus ist in Abb. 1.1. dargestellt. Es macht deutlich, wie es zur Verkürzung der Chromosomen auf dem Weg von der Interphase zur Metaphase über ein „Clustering of chromatin loops“ kommt. Dieser „chromosome cycle“ wurde von Mazia (1963; zitiert nach Sperling, 1982) erstmals vorgeschlagen.

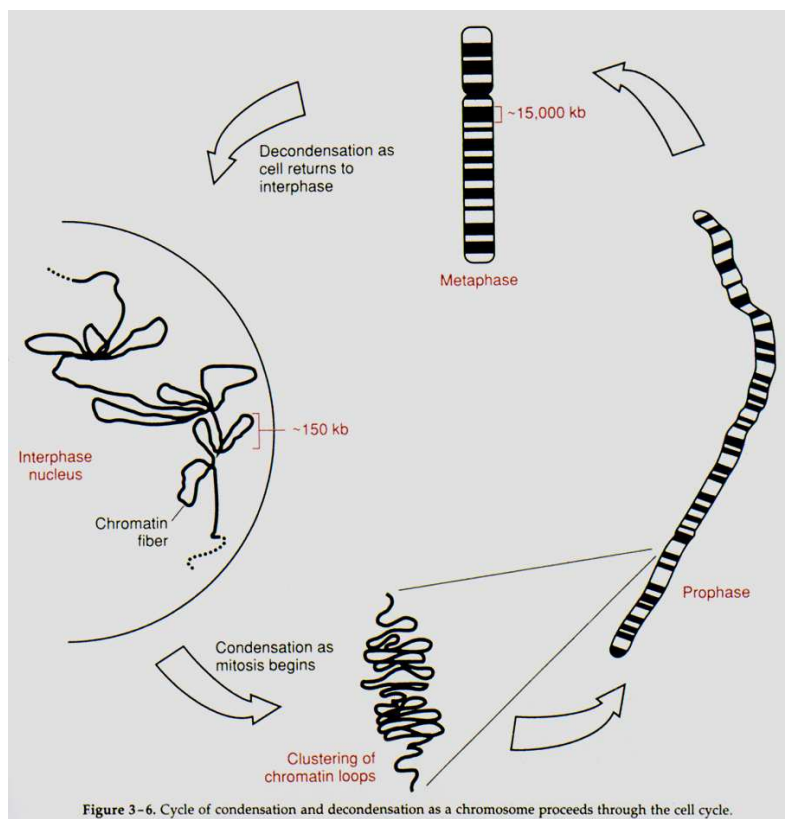


Abb. 1.1. Konzept der Kondensation und Dekondensation von Chromosomen während des Zellzyklus (Thompson et al., 1991)

Abweichend von bzw. differenzierend zu diesem Konzept hat sich vor allem durch Untersuchungen von Cremer et al. (2001) über den Einsatz molekularzytogenetischer Verfahren gezeigt, dass die DNA von Chromosomen nicht über den gesamten Interphasekern diffus verteilt ist, sondern sich in abgrenzbaren „Domänen“ befindet (siehe: Cremer und Cremer, 2001; Chevret et al., 2000). In seiner Arbeitsgruppe konnte

Einleitung

auch nachgewiesen werden, dass die Chromosomenarme innerhalb der gesamten chromosomalen Domäne eigene Areale einnehmen (Dietzel et al., 1998).

Weitere Hinweise auf die Richtigkeit des Konzeptes der Chromosomenkondensation ergeben sich aus der alltäglichen Routinezytogenetik. Die chromosomale Aufarbeitung zur zytogenetischen Diagnostik kurz nach Abschluss der G₂-Phase führt regelmäßig zu langen Pro- bzw. Prometaphasechromosomen, die im Falle der Prophasechromosomen nach GTG-Bänderung mehr als Tausend Banden zeigen können (Yunis, 1981). Die erste Arbeit hierzu wurde von Yunis (1976) verfasst. Sie war Ausgangspunkt für eine Entwicklung in der Zytogenetik, die eine differenziertere Prüfung auf Anomalien an Chromosomen mit höherer Bandenauflösung zur Folge hatte.

Molekularzytogenetische Untersuchungen an Interphasekernen von Hefe (Guacci et al., 1994) und menschlichen Lymphom-Zelllinien (Lawrence et al., 1988) haben ebenfalls durch den Einsatz von spezifischen single-copy-DNA-Proben belegt, dass während des Durchlaufs der Mitose eine zwei- bis zehnfache Verkürzung des Abstandes der Proben zueinander beobachtet werden kann. Dies wird im Sinne einer zwei- bis zehnfachen Verlängerung der Chromosomen im Interphasekern interpretiert.

Ein weiteres, optisch sehr eindrucksvolles Phänomen, „premature chromosome condensation“ (PCC; Johnson und Rao, 1970; Schmiady et al., 1986), zeigt, dass sich durch Fusion von Mitose- mit Interphasezellen, die sich in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden, eine vorzeitige Kondensation von Chromosomen induziert wird, die zum Teil zu sehr langen, Prophase-ähnlichen Chromosomen führt. Werden beispielsweise Zellen in der G₁ Phase mit solchen in der Mitose (Stadium der Metaphase) fusioniert, zeigen sich zum Teil sehr lange „G₁-Chromosomen“. Die Fusion in der S-Phase führt zu einem sehr fragmentierten Bild, bei dem keine einzelnen Chromosomen identifiziert werden können. Eine chromosomale Kontinuität ist jedoch noch vorhanden. Erfolgt die Fusion hingegen in der G₂-Phase, so zeigen sich ebenfalls lange Chromosomen, bei denen jedoch beide Chromatiden erkennbar sind. Die Länge der vorzeitig kondensierten Chromosomen nimmt im Laufe der G₁-Phase zu und in der G₂-Phase ab (Übersicht bei Sperling, 1982).

Einleitung

Das Phänomen der Chromosomenkondensation während des Zellzyklus wurde auf molekularer Ebene gründlich analysiert. Diese Untersuchungen weisen die Beteiligung spezifischer Proteine wie Topoisomerase II, HMC, SMS, Histon 1 und Histon 3 nach, die in einem zum Teil sehr komplexen Zusammenspiel für den Vorgang der Kondensation verantwortlich sind. Eine zusammenfassende Darstellung vermittelt die Arbeit von Koshland und Strunnikov (1996). In Verbindung mit den bekannten, die Länge der Chromosomen beeinflussenden und Zellzyklus-spezifischen Veränderungen hat sich wie von selbst die Vorstellung etabliert, dass sich die Chromosomenkondensation über die Länge der Chromosomen definiert.

1.2. Das Konzept der Chromosomenkondensation - widerlegende Beobachtungen

Die Hinweise auf die Richtigkeit des Konzeptes von Chromosomenkondensation während des Zellzyklus erscheinen überwältigend. Im Ergebnis bestätigen sie die Vorstellung, dass chromosomale Strukturen, wie sie Chromosomen im Stadium der Metaphase in charakteristischer Weise eigen sind, in Interphasekernen nicht gefunden werden können. Dennoch ergeben sich einige Hinweise, die Zweifel an der Richtigkeit des Konzeptes aufkommen lassen. Beispielsweise ist unter Routinezytogenetikern bekannt, dass Chromosomen am Außenrand der Metaphaseplatte gelegentlich eine deutlich höhere Bandenauflösung zeigen als ihre homologen Chromosomen, die mehr im Zentrum der Metaphase liegen. Dieses Phänomen ist nicht ohne weiteres mit dem zur Zeit akzeptierten Kondensationskonzept erklärbar und weist vielmehr auf eine Ursache der Chromosomenverlängerung hin, die während der Chromosomenpräparation stattfindet. In diesem Zusammenhang konnte von Hliscs et al. (1997b) gezeigt werden, dass während des letzten Schrittes der Chromosomenpräparation, dem Verdunsten des Fixativs bzw. der Trocknung der auf einen Objektträger aufgetropften Lymphozytensuspension, sich eine dramatische Verlängerung von Chromosomen ergibt. Während des Verdunstens von Fixativ auf dem Objektträger quellen die mitotischen Zellen, wobei die Chromosomen in die Länge gezogen werden. Dabei vollzieht sich das Spreiten der Metaphase nicht – wie bisher angenommen – im Sinne eines Platzens (Holmquist and Motara, 1987), das durch den Auftropfvorgang plötzlich beim ersten Kontakt des Tropfens mit der Oberfläche des Objektträgers erfolgt, sondern sehr langsam erst unmittelbar vor Abschluss des

Einleitung

Trocknungsvorganges. Ergänzende Untersuchungen von Claussen et al. (2002) lassen in Verbindung mit „chromosome stretching“-Experimenten (Claussen et al., 1994; Hlics et al., 1997a; Kuechler et al., 2001) erkennen, dass bei dem Vorgang der Chromosomenpräparation Giemsa-negative Banden erst entstehen beziehungsweise sichtbar werden. Für die Entstehung der Bänderung ist das komplizierte Zusammenspiel von Fixativ, chromosomalen Proteinen und Wasser verantwortlich. Holmquist und Motara (1987) haben hierzu die Literatur zusammengestellt und die Grundlagen der Entstehung der verschiedenen chromosomalen Bandenmuster interpretiert. Sie halten jedoch auch unbewiesene Phänomene für Tatsachen, die einer Prüfung nicht standhalten. So behaupten sie, dass beim Auftropfvorgang einer fixierten Zellsuspension zum Zwecke der zytogenetischen Aufarbeitung auf Objektträgern die mitotischen Zellen platzen und dadurch spreiten. Dies wurde von Hlics et al. (1997a) als nicht zutreffend nachgewiesen. Nach dem Auftropfen von fixierter Zellsuspension auf den Objektträger verdunstet Methanol als ein Bestandteil des Fixativs präferenziell und hinterlässt in ansteigender Konzentration Essigsäure, den zweiten Bestandteil des Fixativs. Essigsäure wirkt hygroskopisch, zieht somit Wasser aus der Umgebungsluft an, das entsprechend der gegebenen Luftfeuchtigkeit zur Verfügung steht. Das Wasser seinerseits induziert eine dramatische Quellung der fixierten Zellen bzw. der Mitosen im Stadium der Metaphase, bei dem die Chromosomen länger werden (Claussen et al., 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch das Konzept der Chromosomenkondensation zumindest differenzierter gesehen werden muss. Eine Überprüfung der Richtigkeit des Konzeptes wäre sehr einfach möglich, wenn ein Verfahren zur Darstellung von Chromosomen in gebänderter Form in Interphasekernen zur Verfügung stünde. Exakt ein solches Verfahren wurde von Chudoba et al. (1999) für Metaphasechromosom 5 entwickelt und steht in der Zwischenzeit für alle menschlichen Chromosomen als Multicolor-banding (MCB) zur Verfügung (Liehr et al., 2002a, b). Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die Chromosomen in ihrer Struktur am Beispiel des menschlichen Chromosoms 5 in Interphasekernen darzustellen.

1.3. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die in-situ-Hybridisierung ist eine geeignete Methode zur Lokalisation von DNA- oder RNA-Sequenzen in Geweben, Zellen und intrazellulären Strukturen oder auf einzelnen Chromosomenbereichen. Im Gegensatz zu anderen Hybridisierungsverfahren (Northern- oder Southern-Blot-Hybridisierung) wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Material (in-situ) sichtbar (Gall und Pardue, 1969; John et al., 1969). Ursprünglich war nur eine radioaktive Markierung für die Nukleinsäuren und eine Detektion der Hybridisierung über Autoradiographie möglich. Die Auflösung war durch die Reichweite der radioaktiven Strahlung vorgegeben bzw. eingeschränkt und die Ergebnisse lagen meist erst nach 1 – 3 Wochen vor.

Von Pinkel und Mitarbeitern wurde erstmals 1986 und von Lichter und Mitarbeitern 1988 die Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an menschlichen Chromosomen beschrieben. Durch die Entwicklung dieser nicht-radioaktiven Methode der in-situ-Hybridisierung boten sich eine Reihe weiterer Vorteile, wie z.B. die Möglichkeit, verschiedene Markierungen gleichzeitig in einem Experiment durchzuführen, sowie eine hohe Flexibilität durch viele zur Verfügung stehende Antikörper-Detektionssysteme. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Genauigkeit der Lokalisation sowie die Schnelligkeit, denn Ergebnisse können hier schon nach 1 – 3 Tagen vorliegen.

Bei der FISH werden die DNA-Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin (indirekte Methode), über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1986) oder mittels „Nick Translation“ (Rigby et al., 1977) markiert und anschließend denaturiert (DNA liegt dann als Einzelstrang vor). Die DNA der zu untersuchenden Metaphaseplatten bzw. Interphasekernen auf dem Objektträger (OT) werden ebenfalls denaturiert. Die markierte und denaturierte DNA der Sonde lagert sich während der Hybridisierung an homologe DNA Sequenzen der Ziel-DNA auf dem Objektträger an. Bei der indirekten Methode ist eine anschließende Detektion der mit Haptenen markierten DNA nötig. Dies geschieht über Fluoreszenz-markierte Antikörper. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop (Prinzip siehe Abb. 1.2.).

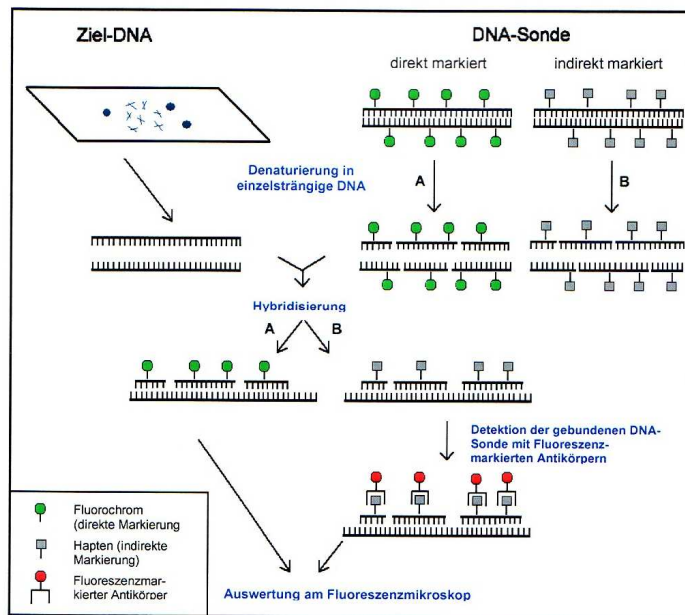


Abb. 1.2. Schematische Darstellung des Prinzips der FISH

DNA-Sonden werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (direkte Methode A) oder mit Haptenen, wie Biotin oder Digoxigenin (indirekte Methode B), entweder über PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (Telenius et al., 1992) oder über eine Nick-Translation (Rigby et al., 1977) markiert. Dann wird sowohl die Sonden- als auch die Ziel-DNA, welche auf einem Objektträger fixiert ist, durch Hitze-Denaturierung einzelsträngig gemacht. Im anschließenden Hybridisierungsschritt lagert sich die markierte DNA-Sonde an homologe DNA-Sequenzen der unmarkierten Ziel-DNA. Nach direkter Markierung (A) der DNA-Sonde kann die Auswertung der Signale unmittelbar an einem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Bei der indirekten Methode (B) ist eine vorherige Detektion der mit Hapten markierten DNA mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nötig (aus Heller, 2003; modifiziert).

Der Vorteil dieser Methode, dass mehrere unterschiedlich markierte Sonden gleichzeitig eingesetzt werden können, hat im Bereich der Diagnostik den Vorzug, dass mit einem Präparat gleichzeitig Informationen über verschiedene Bereiche des Genoms gewonnen werden können. Dies ist vor allem für die Pränataldiagnostik wichtig, da hier ist meist nur eine geringe Menge an Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht. Zusätzlich kann durch den gleichzeitigen Einsatz verschieden markierter Sonden auch Zeit, Arbeitsaufwand und Geld gespart werden. Heute findet die FISH in der molekularen Zytogenetik weitere Anwendungsfelder:

Einleitung

- 1) Erstellen physikalischer Karten von Chromosomen
- 2) Analysieren der Chromosomenstruktur und deren Abweichung
- 3) Untersuchungen zur Struktur, Funktion und Evolution von Chromosomen und Genomen
- 4) Bestimmen der räumlichen und zeitlichen Expression von Genen

Eine wichtige Anwendung stellt die FISH im Rahmen der molekularzytogenetischen Diagnostik dar. Als Sonden werden zum einen DNA-Banken, die das gesamte Chromosom („whole chromosome painting“, wcp) oder nur Teilbereiche des Chromosoms markieren („partial chromosome painting“, pcp), eingesetzt, um Translokationen bzw. Aneuploidien sichtbar zu machen. Für die gezielte Anfärbung bestimmter Chromosomenbanden, Gene oder definierter DNA Sequenzen, bedient man sich außerdem künstlich erzeugter DNA-Vektoren, in die menschliche Genomsequenzen hineinkloniert werden und somit als Sonden-DNA für die FISH zur Verfügung stehen.

1.4. Die Grundlagen: M-FISH und SKY

In den letzten ca. 10 Jahren fand eine Vielzahl von Neu- und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der FISH-Technik für die immer genauere Bearbeitung diagnostischer Fragestellungen statt. So wurde 1989 erstmals die gleichzeitige Darstellung von Zielsequenzen mit 3 Farbstoffen von Nederlof und Mitarbeitern beschrieben (Nederlof et al., 1989). Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet führte zur gleichzeitigen Darstellung aller Chromosomen einer menschlichen Zelle in 24 verschiedenen Farben mit nur einer einzigen Hybridisierung (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996). Diese Methoden bezeichnet man je nach der Auswertungstechnik als „Spectral Karyotyping“ (SKY) bzw. als „Multiplex-FISH“ (M-FISH). Sie beruhen auf wcp-Sonden (Sonde für ein gesamtes Chromosom = whole chromosome painting), die für jedes Chromosom auf der Basis von Mikrosezierung oder „flow sorting“ von Chromosomen gewonnen worden waren. Durch die kombinierte Markierung der wcp-Sonden mit 5 bis 7 Fluorochromen (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996; Saracoglu et al., 2001) kann für jedes Chromosom eine andere Farbe erzeugt werden. Für ein qualitativ gutes Ergebnis der Hybridisierung ist allerdings die Zugabe von unmarkierter COT-1 oder genomischer DNA nötig, die repetitive Sequenzen (vor allem im Zentromer- und in

Einleitung

Heterochromatinbereichen) schon vor der eigentlichen Hybridisierung „abblockt“. Die Auswertung der Signale erfolgt über eine CCD-Kamera in Verbindung mit einem geeigneten Auswertungsprogramm am Computer, um auch Farbstoffe, die für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, darstellen zu können (z.B. Infrarotfarbstoffe wie Cy 5 und Cy 5.5). Somit ist es z.B. möglich, die Herkunft von Markerchromosomen, die man häufig in Tumorzellen findet, zu bestimmen oder die an Translokationen beteiligten Chromosomen zu identifizieren. Allerdings ist eine Darstellung von intrachromosomalen Veränderungen mittels M-FISH nicht in jedem Fall möglich, da jedes Chromosom mit nur einer Farbe dargestellt wird. So bleiben z.B. para- und perizentrische Inversionen genauso unerkant wie kleine Duplikationen oder Deletionen.

1.5. Das Multicolor-banding (MCB)

Die erste grundlegende Arbeit zum Thema „multicolor-FISH“ wurde - wie bereits erwähnt - 1989 von Nederlof und Mitarbeitern veröffentlicht. Mit diesem neu entwickelten Verfahren ist es den Autoren gelungen, mehrere menschliche Chromosomen spezifisch und in jeweils unterschiedlichen Farben darzustellen. Die gleichzeitige Darstellung aller 24 verschiedenen Chromosomen des Menschen gelang erst 1996 (Schröck et al., 1996; Speicher et al., 1996). Das Ziel, alle menschlichen Chromosomen auf der DNA-Ebene in ihrer Bandenstruktur darzustellen, ergab sich zwangsläufig. Hierzu wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen (Übersicht bei: Liehr et al., 2002a; Liehr et al., 2002b). Das MCB, erstmals von Chudoba et al. (1999) beschrieben, zeigt die höchste Auflösung und kann dazu genutzt werden, in nahezu frei wählbarer Auflösung die Bandenstruktur ganzer Chromosomen darzustellen. Es basiert auf der Hybridisierung miteinander überlappender, unterschiedlich markierter Mikrosezierungsbanken, bei denen mit Hilfe der ISIS-Software (MetaSystems, Altusheim, Germany) in die Überlappungsbereiche hinein Chromosomenregion-spezifische Falschfarben gelegt werden können (siehe Abb. 1.3.). Mit der Konstruktion von insgesamt 138 verschiedenen Mikrosezierungsbanken ist die Darstellung des MCB für alle menschlichen Chromosomen (Liehr et al., 2002) gelungen. Da nicht ausreichend viele Fluorochrome für eine gleichzeitige Darstellung aller menschlicher Chromosomenbanden zur Verfügung stehen, können parallel zueinander nur wenige Chromosomen in ihrer

Einleitung

Bandenstruktur abgebildet werden. Dieses grundsätzliche Problem des MCB wurde durch Weise et al. (2003) gelöst. Inzwischen ist es möglich, alle menschlichen Chromosomen in gebänderter Form mittels MCB im Rahmen einer einzigen Hybridisierung darzustellen. Die dabei erzielten Bandenmuster über den einzelnen Chromosomen müssen jedoch auf ihre Chromosomenspezifität hin mittels M-FISH abgesichert werden.

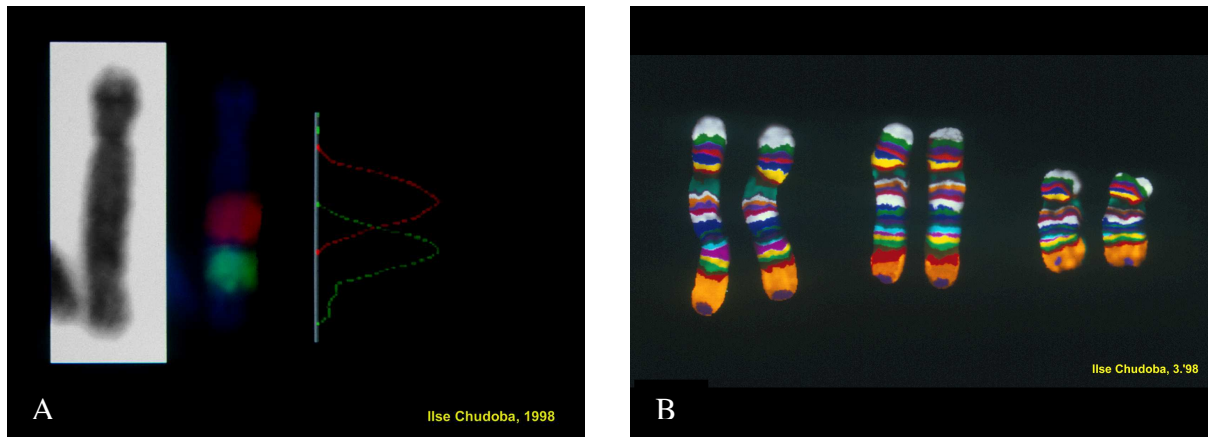


Abb. 1.3. Prinzip des Multicolor-banding (MCB)

In A ist ein schwach GTG-gebändertes menschliches Chromosom 5 gezeigt, das für eine erfolgreiche Mikrosezierung mit anschließender DNA-Amplifikation sehr geeignet ist. Rechts daneben sind zwei miteinander überlagernde Mikrosezierungsbanken auf ein Chromosom 5 hybridisiert, deren Überlappung anhand der in B dargestellten Fluoreszenzprofile deutlich wird. Mit Hilfe der ISIS-Software und der Hybridisierung mit allen Chromosom 5 spezifischen Mikrosezierungsbanken ($n=7$) in einem Schritt lassen sich dann die Bandenmuster von Chromosom 5 weitgehend unabhängig von der Länge der Chromosomen darstellen (Chudoba et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Darstellung eines Chromosoms im Interphasekern beispielhaft der Hybridisierung MCB-Proben-Mix („mBand probe mix X-Cyte 5 probe cocktail“ der Firma Metasystems GmbH) für das menschliche Chromosom 5 gewählt.

2. Problemstellung

Ziel der Arbeit ist, die Frage der Richtigkeit des Konzeptes der Chromosomenkondensation über eine Visualisierung von Chromosomen im Interphasekern zu klären. Durch die Untersuchungen von Cremer ist bekannt (Übersicht bei Cremer und Cremer, 2001), dass Chromosomen im Interphasekern bestimmte Territorien einnehmen. Hierbei lassen sich sogar die Bereiche, die von den beiden Chromosomenarmen eingenommen werden, voneinander unterscheiden (Dietzel et al., 1998). Nach Entwicklung des MCB (Chudoba et al., 1999) hat sich als logische Konsequenz die Überprüfung der von der Arbeitsgruppe um Thomas Cremer erhobenen Befunde auf dem DNA-vermittelten Bandenniveau ergeben. Vorversuche mit dem MCB-Probenmix für das Chromosom 5 an Interphasekernen von Lymphozyten, die zur zytogenetischen Routinediagnostik präpariert worden waren (Lemke et al., 2002), haben ein Bandenmuster erkennen lassen, das mit dem von Metaphasechromosomen nahezu identisch war. Hieraus haben sich folgende Fragestellungen für die vorliegende Arbeit ergeben:

2.1. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen

Gilt das bei Lymphozyten beobachtete Bandenmuster nach Hybridisierung mit dem MCB-Proben-Mix für das menschliche Chromosom 5 auch für ein anderes Gewebe? Zur Beantwortung dieser Frage wurden HeLa-Zellen als zweites Gewebe ausgewählt. Sie lassen sich erstens leicht kultivieren und sind zweitens gut in den verschiedenen Interphasestadien zu synchronisieren.

Problemstellung

2.2. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen während der verschiedenen Zellzyklusstadien

Bekanntermaßen befinden sich periphere Lymphozyten im Stadium der G₀-, bzw. der G₁-Phase und zeigen hier ein Falschfarbbandenmuster entsprechend dem von Metaphasechromosomen (Lemke et al., 2002). In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, ob sich das Chromosom 5 in anderen Stadien der Interphase und hier speziell in der S-Phase darstellen lässt.

2.3. Erkennung von Chromosom 5-spezifischen Chromosomenaberrationen im Interphasekern

Voruntersuchungen zu dieser Arbeit haben gezeigt, dass HeLa-Zellen einen aberranten Karyotyp bezogen auf das Chromosom 5 zeigen. Es wurde deshalb untersucht, ob die an Metaphasechromosomen bekannten chromosomalen Aberrationen auch in den verschiedenen Zellzyklusphasen erkennbar sind.

2.4. Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern

Nehmen die Chromosomen 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen eine bestimmte Lage ein?

Aus der Literatur ist bekannt, dass genreiche Chromosomen, wie beispielsweise das Chromosom 19, sich bevorzugt im Zentrum des Interphasekerns befinden. Genarme Chromosomen, wie zum Beispiel das Chromosom 18, liegen eher in den peripheren Bereichen des Interphasekerns.

Interphasekerne sind nach konventioneller Chromosomenpräparation abgeflacht. Sollte eine festgelegte Position des Chromosoms 5 in Bezug auf eine zentrale oder periphere Position vorliegen, so müsste dies erkennbar sein. Zentral gelegene Chromosomen 5 bleiben in ihrer Position nach Abflachung des Kerns. Peripher gelegene Chromosomen 5 können sowohl eine zentrale als auch periphere Lage einnehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Interphasekerne in verschiedene Sektoren eingeteilt und die Position der Chromosomen zugeordnet.

Problemstellung

2.5. Chromosomenform

Metaphasechromosomen zeigen vielfach eine gestreckte Form. Wie sind menschliche Chromosomen 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen angeordnet?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde auf die Form der Chromosomen 5 im Interphasekern geachtet. Die Form der Interphasechromosomen wurde in ihrer Unterschiedlichkeit spezifisch definiert und danach die Chromosomen entsprechend, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, eingeordnet. Es wurde zudem darauf geachtet, ob die Chromosomen im Zentromerbereich bevorzugt abgeknickt sind.

2.6. Länge des Chromosoms 5 der HeLa-Zellen in der Interphase

Welche Länge weisen Interphasechromosomen 5 in HeLa-Zellen auf?

Anhand der Telomerbanden nach Hybridisierung mit dem MCB-Proben-Mix für das Chromosom 5 lassen sich in Lymphozyten die Enden der Chromosomenachsen gut definieren. Deshalb wurde bei HeLa-Zellen nach Darstellung des MCB-Musters auf dem 6-Falschfarbbandenmodus eine morphologische Chromosomenachse bestimmt. Des Weiteren wurde auf dem 6-, 11- und 16-Falschfarbniveau die kürzeste Verbindung zwischen den Telomerbanden, die durch die geschätzten Mittelpunkte der übrigen Falschfarbbanden hindurchläuft, als Falschfarbachse gemessen. Dabei wurden Zellzyklus-spezifische Unterschiede in der Länge des Chromosoms 5 und der Länge der Falschfarbachsen untersucht.

2.7. Chromosomenfläche

Welche Fläche nehmen die Chromosom-5-spezifischen Farbbanden im Interphasekern ein?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden bei HeLa-Zellen die Flächen der Farbbanden von Chromosom 5 im 6-Falschfarbmodus im Verlauf der einzelnen Interphasestadien bestimmt. Im Hinblick auf die in der S-Phase ablaufende Replikation ist mit einer Flächenzunahme der Chromosomen während der S-Phase zu rechnen.

Problemstellung

2.8. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen

Aus den „chromosome stretching“-Experimenten am menschlichen Chromosom 6 (Hliscs et al., 1997a) wird ersichtlich, dass sich die Giemsa-hellen Banden, wenn sie als solche erkennbar sind, experimentell kaum noch weiter dehnen lassen. Die Giemsa-dunklen Banden hingegen lassen sich gut dehnen und spalten sich durch das Erscheinen von neuen Giemsa-hellen Subbanden auf. Dies konnte durch die Untersuchungen von Claussen et al. (2002) bestätigt werden. Hieraus ergibt sich die Frage nach dem Verhalten von Giemsa-hellen im Vergleich zu den Giemsa-dunklen Banden auf DNA-Niveau im Verlaufe des Zellzyklus. Zur Bearbeitung dieser Frage wurde nach MCB-Banden für das Chromosom 5 auf Metaphasechromosomen gesucht, die nach GTG-Bänderung zum einen einer Giemsa-hellen und zum anderen einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen. Die Dynamik der Veränderungen der jeweiligen Falschfarbflächen dieser beiden Banden wurde unter Berücksichtigung des Zellzyklus analysiert.

Entsprechend der eigenen Vorversuche sollten die Antworten auf diese Fragen ermöglichen, das Interphasechromosom 5 auf der DNA-Ebene in Relation zum Metaphasechromosom 5 zu beschreiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit dürften in der Lage sein, einige offene Fragen des Verhaltens von Chromosomen im Verlaufe des Zellzyklus zu beantworten.

3. Material und Methode

3.1. Kultivierung von HeLa-Zellen

Es wurden HeLa-Zellen (Zervixkarzinom) der Linie HeLa 18L1, die in flüssigem Stickstoff gelagert waren, aufgetaut und durch mehrmaliges Abzentrifugieren und unter Zugabe frischen Mediums gewaschen. Die HeLa-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit jeweils 5 ml Medium bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für 72 h inkubiert. Die Zellen wurden mittels eines Mykoplasmentests (Myc-Kit®) untersucht, dabei konnte festgestellt werden, dass sich keine Mykoplasmen in der Kultur befanden.

Um mehrere Zellkulturen zur weiteren Aufarbeitung zu erhalten, wurden die Kulturen „in die Breite“ gezogen. Dazu wurden solche Kulturen weiterverwendet, die einen konfluenten Zellrasen auf dem Flaschenboden gebildet hatten.

Um die Zellen vom Boden zu lösen, wurden nach dem Abpipettieren und Sammeln des Mediums die Zellen mit Trypsin gespült. Danach wurden 12 Tropfen frischen Trypsins auf den Zellrasen gegeben und die Kultur für weitere 2 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Die Kulturen wurden erneut mit Medium abgespült, die Zellsuspension auf zwei Kulturflaschen verteilt und jeweils mit 5 ml frischem Medium versetzt.

3.2. Synchronisation

Die HeLa-Zellkulturen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt.

In der ersten Gruppe wurde durch die Kombination eines Thymidin-Blocks und eines anschließenden N₂O-Überdruck-Blocks erreicht, dass die Zellen in der Mitose arretiert wurden. Nach Aufheben des Überdrucks traten die Zellen in die Interphase ein und konnten zeitversetzt aufgearbeitet werden.

In der zweiten Gruppe wurde ein zweimaliger Thymidin-Block eingesetzt, um die Zellen am Übergang der G1-Phase in die S-Phase zu arretieren. Nach der Aufhebung des zweiten Blocks gingen die Zellen gleichzeitig in die S-Phase über und wurden im Verlauf der S-Phase und der darauffolgenden G2-Phase aufgearbeitet.

Material und Methode

3.2.1. Synchronisation in der G1-Phase bis zur frühen S-Phase

Um eine Vorsynchronisation zu erreichen, wurden die Zellen durch Zugabe von 2,5 mM Thymidin für 16 h in der S-Phase arretiert. Durch zweimaliges Spülen mit frischem Medium wurde die Blockade aufgehoben. Nach weiteren 7 h Inkubation (37°C) wurde N₂O im Überdruck (4,2 at) zugegeben. Hierdurch wurden die Zellen in der Mitose arretiert. Nach 8,5 h wurde der Überdruck abgelassen, die Mitosezellen durch einfaches Schütteln gewonnen und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 6 Petrischalen (5 cm) aufgeteilt. Parallel hierzu wurde eine Cytozentrifugenpräparation zur Bestimmung des Mitoseindex hergestellt. Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte alle zwei Stunden.

Durch die Synchronisation wurden 6 Zellsuspensionen von der frühen bis mittleren G1-Phase ausgehend hergestellt, mit:

Zellsuspensionen A3:	Zellen in der frühen bis mittleren G1-Phase,
Zellsuspensionen B3:	Zellen in der mittleren G1-Phase,
Zellsuspensionen C3:	Zellen in der späten G1-Phase bis frühen S-Phase,
Zellsuspensionen D3:	Zellen in der frühen S-Phase,
Zellsuspensionen E3:	Zellen in der frühen bis mittleren S-Phase und
Zellsuspensionen F3:	Zellen in der mittleren S-Phase.

3.2.2. Synchronisation in der S-Phase bis zur G2-Phase

Mittels der Zugabe von 2,5 mM Thymidin wurde eine Blockierung der Zellen in der S-Phase erreicht. Dieser Block wurde für 16 h (37°C, Brutschrank) beibehalten, so dass Zellen, die sich zum Zeitpunkt des Blockanfangs in der G2-Phase befanden, die Mitose durchlaufen konnten, dann aber ebenfalls in der S-Phase gestoppt wurden.

Durch Abpipettieren des Überstandes und zweimaliges, vorsichtiges Spülen mit frischem Medium wurde der Block aufgehoben und die Kulturen bei 37°C im Brutschrank weiter inkubiert.

Um eine höhere Synchronisationsrate zu erreichen, erfolgte nach 11 h erneut die Zugabe eines 2,5 mM Thymidin-Blocks. Nach einer 12-stündigen Blockierung wurden

Material und Methode

die HeLa-Zellen abtrypsiniert, abzentrifugiert (10 min bei 1000 U/min) und in frischem kaltem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 6 Petrischalen (5 cm), aufgeteilt.

Nach zwei Stunden erfolgte die Aufarbeitung der ersten Kultur, danach alle zwei Stunden die weiteren Kulturen.

Durch die Synchronisation wurden 6 Zellsuspensionen von der frühen S-Phase ausgehend hergestellt, mit:

- Zellsuspensionen A1: Zellen in der frühen S-Phase,
- Zellsuspensionen B1: Zellen in der frühen bis mittleren S-Phase,
- Zellsuspensionen C1: Zellen in der mittleren S-Phase,
- Zellsuspensionen D1: Zellen in der mittleren bis späten S-Phase,
- Zellsuspensionen E1: Zellen in der späten S-Phase bis frühe G2-Phase und
- Zellsuspensionen F1: Zellen in der G2-Phase.

3.3. Aufarbeitung und Präparation

3.3.1. Aufarbeitung

Zur Aufarbeitung wurde die Petrischale schräg gehalten, der Überstand abpipettiert und in ein rundes Zentrifugenröhrchen verbracht. Die verbliebenen Zellen wurden wie oben trypsiniert. Unter dem Durchlichtmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden gelöst hatten. Nach Abzentrifugieren (1000 U/min für 10 min) und Verwerfen des Überstandes folgte die hypotone Behandlung. Hierzu wurde das Zellpellet im Zentrifugenröhrchen vorsichtig in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert in eine Pipette aufgenommen, und mit 5 ml KCl (0,56%) in einem spitzen Zentrifugenröhrchen vermischt (Einwirkdauer 15 min bei 37°C im Wasserbad). Erneutes Abzentrifugieren (1000 U/min für 10 min) und Verwerfen des Überstandes. Vorsichtiges Resuspendieren des Zellpellets und tropfenweises Zugeben von 1 ml Fixativ (Methanol : Eisessig = 3 : 1, eisgekühlt). Mischen der Lösung und Auffüllen auf 5 ml mit Fixativ.

Material und Methode

Die folgenden Schritte wurden mindestens dreimal wiederholt. Abzentrifugieren (1000 U/min für 10 min) und Verwerfen des Überstandes, vorsichtiges Resuspendieren des Zellpellets und Auffüllen mit 5 ml Fixativ.

Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in ca. 1 ml Fixativ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2. Präparation

Vorbehandlung der Objektträger (OT, Menzel-Superfrost®)

Nach gründlichem Reinigen mit Seidenpapier wurden die OT in Aqua dest. gestellt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Auftropfen der Zellen wurden die OT aus den mit Aqua dest. gefüllten Küvetten genommen und kurz abtropfen gelassen.

Auftropfen der Zellsuspension

Jeweils ein Tropfen der auf Eis gelagerten, zuvor mit frischem Fixativ gespülten Zellsuspension wurde aus einer Höhe von etwa 15 cm auf einen OT aufgetropft. Danach wurden die OT auf eine mit feuchten (Aqua dest.) Zellstofftüchern belegte Heizplatte (50°C) gelegt. Auf der Heizplatte blieben die OT für 3 min bis zur Trocknung liegen und wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung in einer Transportbox aufbewahrt.

3.4. Multicolor-banding

Verwendet wurde der „mBand probe mix X-Cyte 5 probe cocktail“ der Firma Metasystems GmbH, bestehend aus einem Probenmix für das 5er Chromosom, Block-Reagenz und Detektionsmix.

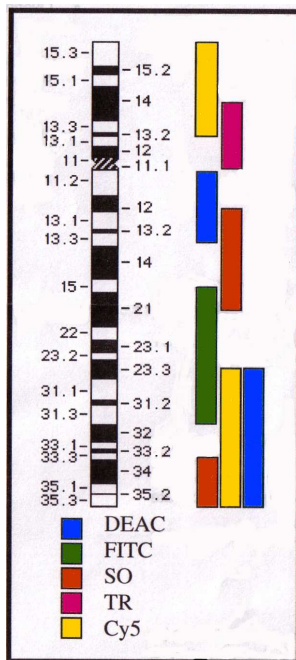


Abb. 3.1. Ideogramm des Chromosoms 5 in Gegenüberstellung zu den fluorochromierten Chromosomenabschnitten (Metasystems GmbH, Altlußheim)

3.4.1. Vorbehandlung und Denaturierung der OT

Die OT wurden für jeweils 1 min in einer absteigenden (100%, 95%, 70%) Alkoholreihe bei Raumtemperatur rehydriert, danach für 1 min in 0,1xSSC-Lösung bei Raumtemperatur gestellt. Daraufhin fand eine Inkubation für 30 min in einer 2xSSC-Lösung (70°C, Wasserbad) statt. Nach Ablauf der 30 min wurde die Heizung des Wasserbades ausgestellt und etwa 20 min gewartet, bis sich die Temperatur auf 37°C gesenkt hatte. Einem einminütigen Stehenlassen der OT in 0,1xSSC-Lösung folgte Denaturierung bei Raumtemperatur in 0,07N NaOH für 1 min. Verbringen der OT für 1 min in 0,1xSSC-Lösung (4°C), danach für 1 min in 2x SSC-Lösung (4°C). Abschließendes Rehydratisieren in einer absteigenden (100%, 95%, 70%) Alkoholreihe (Raumtemperatur), Lufttrocknen.

3.4.2. Hybridisierung der Proben

Jeweils 12 µl des ProbenMCB-Poben-Mixes pro OT wurden in einem ThermoCycler (PTC200, MJ Research®) für 5 min bei 75°C denaturiert, 2 min auf 4°C abgekühlt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Material und Methode

Danach wurden je 12 µl der denaturierten und vorhybridisierten Probe auf einen OT pipettiert, mit einem 24x24 mm² Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogumm (Marabu® Rubber Cement) abgedichtet. Anschließend wurden die OT in einer „feuchten Kammer“ bei 37°C in einem Brutkasten für 72 Stunden inkubiert.

3.4.3. Detektion

Nachdem Fixogumm und Deckgläschen vorsichtig entfernt wurden, wurden die OT für 1 min in vorgewärmte (75°C) 2xSSC-Lösung gestellt. Danach kamen sie für 5 min in 2xSSCT-Lösung. Vor der Weiterverarbeitung wurden sie in 4xSSCT-Lösung geschwenkt.

Detektion der Biotin-markierten Proben mit Cy5

Blockierungsschritt

Es wurden auf jeden Objektträger 50 µl Blockreagenz aufgetragen, mit einem 24x60 mm² Deckgläschen abgedeckt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Deckgläschens wurden die Objektträger kurz in 4xSSCT-Lösung gestellt.

Detektionsschritt

Für jeden OT wurden 50 µl Blockreagenz mit jeweils 1 µl Detektionsreagenz (1&3) gemischt, aufgetragen, mit einem 24x60 mm² Deckgläschen abgedeckt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach folgten zwei Waschschritte mit 4xSSCT-Lösung (Raumtemperatur, geschüttelt) für 3 min, sowie 3 min in 1xPBS-Puffer (Raumtemperatur, geschüttelt). Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Blasebalgs getrocknet, je 20 µl DAPI aufgebracht und mit einem 24x60 mm² Deckgläschen abgedeckt.

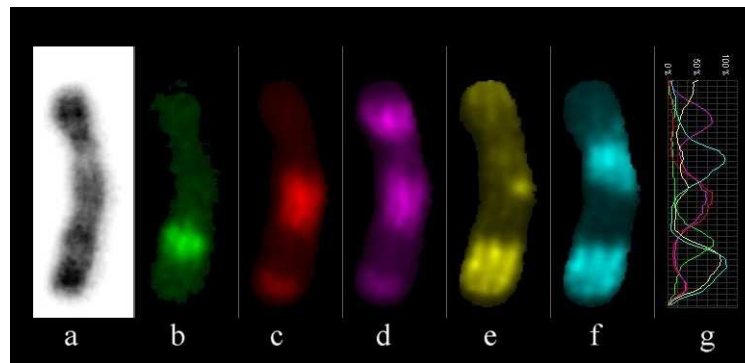


Abb. 3.2. Darstellung der Fluorochromverteilung des Chromosoms 5

- a) zeigt eine DAPI-Darstellung des Chromosoms 5, die in etwa einer Giemsa-Bänderung entspricht. Die Darstellungen b) bis f) zeigen die Markierung des Chromosoms mit verschiedenen Fluorochromen:
- b) FITC-Markierung
- c) Spectrum-Orange-Markierung
- d) Texas-Red-Markierung
- e) Cy5-Markierung
- f) DEAC-Markierung
- g) zeigt die Fluorochromverteilungen und deren Überlappungen im Verlauf des Chromosoms 5 bei Markierung mit allen fünf Fluorochromen.

3.5. Auswertung

Die Präparate wurden am Axioplan-2-Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss®) mit einem Fünffachfilterrad ausgewertet, welches die Aufnahme von DAPI, FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy5 und DEAC nacheinander ermöglicht.

Die Bildaufnahme und Verarbeitung erfolgte mit einer Standard-CCD Videokamera (IMAC®) und der ISIS-3-Software (MetaSystems GmbH, Altusheim), der Paint-Shop-4-Software (Microsoft®, 1997) sowie der PhotoStudio-Software (ArcSoft®, 1999).

3.5.1. Auswahlkriterien

Auf Grund der großen Variationsbreite in der Morphologie der Kerne und der einzelnen Chromosomen mussten Auswahlkriterien festgelegt werden, die ein Kern, bzw. ein Chromosom mindestens erfüllen musste, um weiter ausgewertet zu werden.

Material und Methode

3.5.1.1. Form des Kerns

Davon ausgehend, dass ein dreidimensionaler Kern in etwa die Form einer Kugel hat, ist zu erwarten, dass ein solcher Kern, auf einem Objektträger fixiert, die zweidimensionale Form eines Kreises annimmt. Aus diesem Grund wurden nur Kerne ausgewertet, die mit einer bestimmten Variationsbreite der Definition „rund“ entsprachen.

Dazu wurden in jedem Kern zwei aufeinander senkrecht stehende Kerndurchmesser bestimmt und ein Mittelwert aus beiden errechnet.

Der Kern gilt als **nicht** rund, wenn die Summe aus Mittelwert plus 10% des Mittelwertes kleiner ist als der größere der gemessenen Kerndurchmesser.

3.5.1.2. Morphologie des Chromosoms

Damit ein Chromosom ausgewertet wurde, musste es im 11-Falschfarbmodus klar von seiner Umgebung, von anderen Falschfarbwolken und anderen Chromosomen abgrenzbar sein.

3.5.1.3. Darstellung des Chromosoms

Um ein Minimum an Auswertbarkeit zu garantieren, wurden nur Chromosomen einbezogen, bei denen eine vollständige Falschfarbabfolge im 11-Falschfarbmodus nachvollziehbar war.

3.5.2. Analyisierte Parameter

3.5.2.1. Fläche des Kerns

Um die Fläche eines Kern zu messen, wurde das Nativbild hintergrundbereinigt und um den Faktor 4 gezoomt. Mit Hilfe der ISIS-Software wurde der Kern umfahren und die Fläche bestimmt.

3.5.2.2. Lage des Chromosoms im Kern

Um zu sehen, ob sich im Verlauf der Interphase ein signifikanter Unterschied erkennen lässt, in welcher Position ein Chromosom im Kern liegt, wurde der Kern in Sektoren eingeteilt und die Chromosomenlage bestimmt.

Sektoreneinteilung:

- 1) peripher
- 2) peripher-intermediär
- 3) intermediär
- 4) intermediär-zentral
- 5) zentral
- 6) kernübergreifend

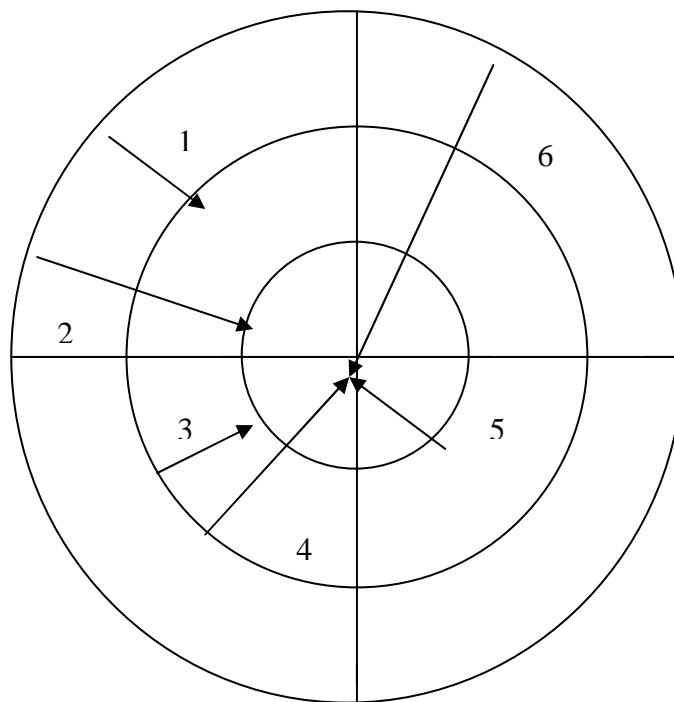


Abb. 3.3. Sektoreneinteilung des Zellkerns zur Lagebestimmung der Chromosomen im abgeflachten Interphasekern mit Angabe der verschiedenen Chromosomenanordnung (Pfeile 1 – 6).

3.5.2.3. Chromosomenlänge und Chromosomenform

Für das Chromosom 5 wurden sechs Falschfarbbanden (HANNES6) errechnet, so dass die Telomere des Chromosoms erkennbar waren und sich somit eine morphologische Achse des Chromosoms bestimmen und vermessen ließ.



Abb. 3.4. Chromosom 5 im 6-Falschfarbmodus

Ausmessung der morphologischen Achse des Chromosoms 5 von Telomer zu Telomer (dünne rote Linie). Das Chromosom bzw. dessen Mittellinie ist in der pinkfarbenen Bande abgeknickt bzw. abgewinkelt.

Anhand dieser morphologischen Achse wurde die Form des Chromosoms beschrieben (s. Abb. 3.5.). 1) gestreckt: Winkel $\alpha \geq 140^\circ$ (wird durch die beiden roten Linien gebildet; s. Abb. 3.4.); 2) einfach gebogen (gebogen: $140^\circ >$ Winkel $\alpha \geq 60^\circ$); 3) zweifach gebogen; 4) mehrfach gebogen; 5) einfach gefaltet (gefaltet: Winkel $\alpha < 60^\circ$); 6) zweifach gefaltet; 7) mehrfach gefaltet; 8) geschlängelt.

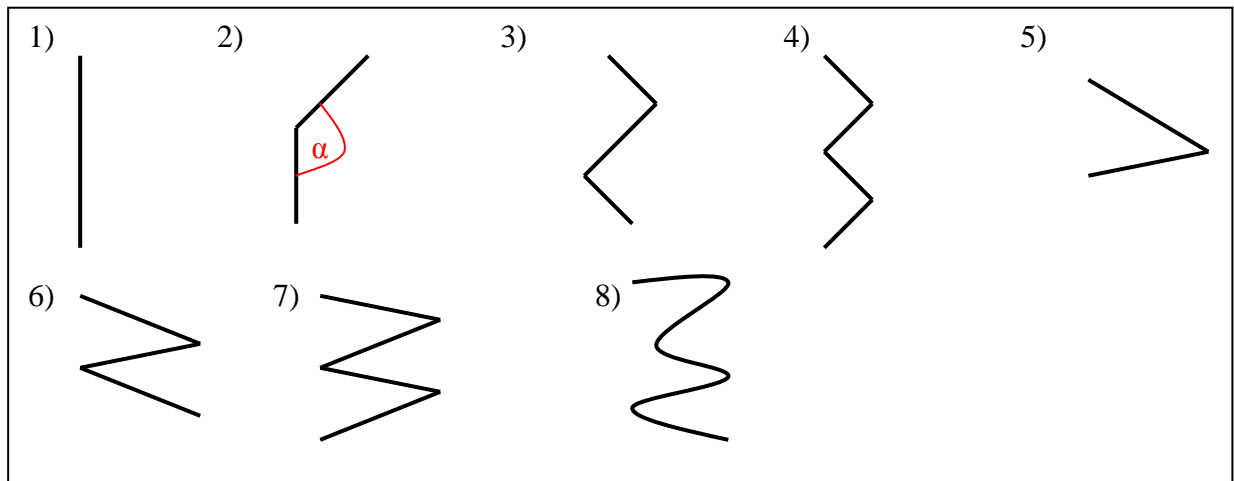


Abb. 3.5. Schematische Einteilungen der morphologischen chromosomalen Achsen

3.5.2.4. Chromosom im Zentromer geknickt?

In eigenen Vorversuchen fielen immer wieder im Zentromer geknickte Chromosomen auf. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Abknickung zellzyklusspezifisch ist.

Wurde nun in einem der Definition „rund“ entsprechenden Kern ein Chromosom gefunden, das o.g. Bedingungen erfüllte, wurde es erneut um den Faktor 4 gezoomt (insgesamt dann Faktor 16) und mit Hilfe der ISIS-Software ausgeschnitten.

3.5.2.5. Falschfarbachse 6

Des Weiteren wurde im selben 6-Falschfarbmodus eine Achse von Telomer zu Telomer gezogen, die durch die gedachten Mittelpunkte der einzelnen Falschfarbbanden führte.



Abb. 3.6. Chromosom 5 im 6-Falschfarbmodus
Ausmessung der Falschfarbachse des Chromosoms 5 von Telomer zu Telomer durch die Mittelpunkte der Falschfarbbanden (dünne rote Linie, vergleiche Abb. 3.4).

3.5.2.6. Falschfarbachse 11

Für das Nativchromosom wurde als nächstes 11 Falschfarben (HANNES11) errechnet und ebenfalls eine Achse durch die Mittelpunkte der Falschfarbbanden gelegt und ausgemessen.

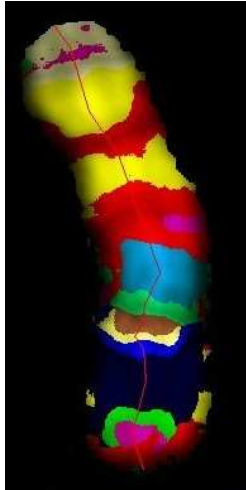


Abb. 3.7. Chromosom 5 im 11-Falschfarbmodus

Ausmessung der Falschfarbachse des Chromosoms 5 von Telomer zu Telomer durch die Mittelpunkte der Falschfarbbanden (dünne rote Linie).

3.5.2.7. Falschfarbachse 16

Dasselbe Verfahren wurde als nächstes auf dem 16-Falschfarbniveau durchgeführt.



Abb. 3.8. Chromosom 5 im 16-Falschfarbmodus

Ausmessung der Falschfarbachse des Chromosoms 5 von Telomer zu Telomer durch die Mittelpunkte der Falschfarbbanden (dünne rote Linie).

3.5.2.8. Chromosomenfläche

Ebenfalls im 6-Falschfarbmodus wurde die Gesamtfläche des Chromosoms mit Hilfe der ISIS-Software ausgemessen.



Abb. 3.9. Chromosom 5 im 6-Falschfarbmodus
Ausmessung der Chromosomenfläche. Die Fläche der Falschfarben des Chromosoms 5 ist mit einer dünnen roten Linie umrandet.

3.5.2.9. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen

Im 24-Falschfarbmodus wurde die Fläche zweier Banden (blau und pink) vermessen, die nach GTG-Bänderung anhand der chromosomalen Proportionen auf dem 400-Bandenniveau jeweils einer hellen (5q22), bzw. einer dunklen (5q23.1) Bande entsprechen. Beide Banden sind auf dem 400 Bandenniveau von vergleichbarer Größe (s. Abb. 3.10) und beinhalten eine vergleichbare Anzahl von Genen (5q22 44 Gene, 5q23.1 37 Gene; http://bioinfo2.weizmann.ac.il/cgi-bin/geneloc/display_map.pl). Hier muss jedoch gesagt werden, dass die Zuordnung von Genen bzw. DNA-Proben zu chromosomalen Banden nicht verlässlich ist bzw. vom Bandenniveau selbst abhängig ist (Lehrer et al., 2004).

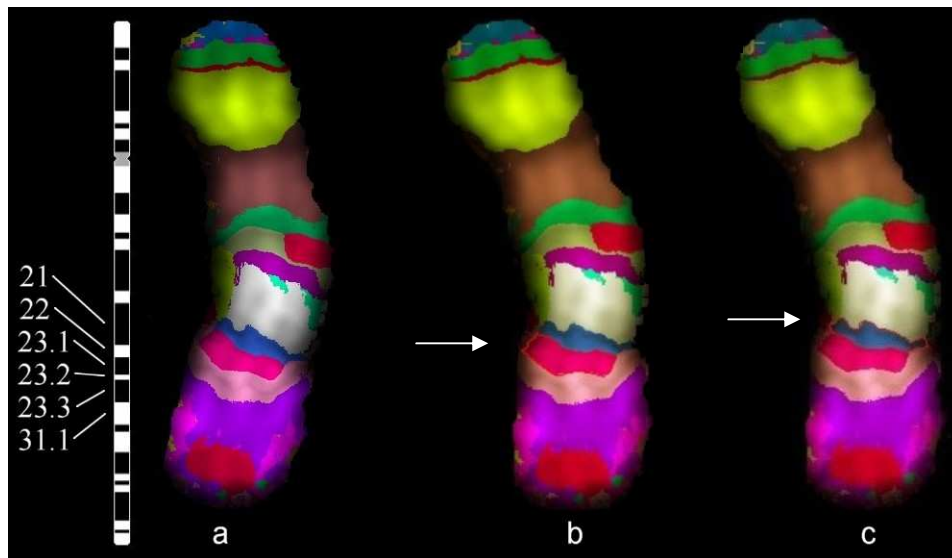


Abb. 3.10. Darstellung zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen

a) zeigt das Chromosom 5 im 24-Falschfarbmodus (H24) in Gegenüberstellung mit einem Ideogramm. In Darstellung b) ist dasselbe Chromosom 5 gezeigt. Der Pfeil kennzeichnet die Bande in pink, die bei Metaphasechromosomen der Bande 5q23.1 entspricht. In Darstellung c) kennzeichnet der Pfeil eine blaue Bande, die bei Metaphasechromosomen der Bande 5q22 entspricht. Diese beide Banden sind als Giemsa-dunkle und Giemsa-helle Banden auf dem 400 Banden Niveau (ISCN 2005) in etwa gleich groß und gleichzeitig durch das Chromosom 5-spezifische MCB Bandenmuster farblich voneinander getrennt darstellbar.

3.6. Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurden die einzelnen erhobenen Faktoren in „metrisch“ und „morphologisch“ unterschieden.

Untersucht wurden die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren sowie das Auftreten und die Art der Variation der Faktoren in den Interphasestadien.

Die Synchronisation der HeLa-Zellen erfolgte mittels zweier verschiedener Verfahren (siehe Material und Methode 3.2.). Hierdurch wurden zwei Gruppen von Zellsuspensionen (A1 bis F1 und A3 bis F3) hergestellt, die hinsichtlich der repräsentierten Interphasestadien, wie in Tab. 1 dargestellt, zusammengefasst wurden:

Tab. 1. Zuordnung der einzelnen Zellpräparationen zu den verschiedenen Interphasestadien und Angabe der Anzahl ausgewerteter Chromosomen

Interphasestadien	Zellsuspension	Anzahl der ausgewerteten Chromosomen
G1-Phase	A3	N=8
G1- bis frühe S-Phase	B3	N=3
frühe S-Phase	C3	N=4
frühe bis mittlere S-Phase	A1 + B1 + D3	N=19
mittlere S-Phase	C1 + E3	N=17
mittlere bis späte S-Phase	D1 + F3	N=9
späte S-Phase bis G2-Phase	E1	N=10
G2-Phase	F1	N=6

3.6.1. Metrische Faktoren

Untersuchte „metrische“ Faktoren waren:

Fläche des Kerns zu:

- Fläche des Chromosoms
- Länge der morphologischen Achse (absolut)
- Länge der 6-, 11- und 16-Falschfarbachsen (absolut)
- Fläche der blauen Bande im 24 Falschfarbmodus
- Fläche der pinken Bande im 24 Falschfarbmodus

Fläche des Chromosoms zu:

- Länge der morphologischen Achse (absolut)
- Länge der 6-, 11- und 16-Falschfarbachsen (absolut)
- Fläche der blauen Bande im 24-Falschfarbmodus
- Fläche der pinken Bande im 24-Falschfarbmodus

Länge der morphologischen Achse zu:

- Länge der 6-Falschfarbachse
- Länge der 11-Falschfarbachse

Länge der 16-Falschfarbachse

Fläche der blauen Bande zu Fläche der pinken Bande im 24-Falschfarbmodus.

Alle metrischen Merkmale wiesen eine Normalverteilung auf. Die Anpassung an das Normalverteilungsmodell wurde mittels Kolmogorov-Smirnov Test geprüft.

Zur Deskription der Ergebnisse wurde mittels Anova und Waller-Duncan Post-Hoc-Test der Zusammenhang zwischen den einzelnen metrischen Parametern und den Interphasestadien beschrieben.

Mittels einer multiplen Regressionsanalyse (Methode „Schrittweise Rückwärts“) wurde der Zusammenhang zwischen allen einbezogenen metrischen Faktoren und den Interphasestadien untersucht.

Bei Betrachtung aller metrischen Faktoren variiert das Verhältnis aus Kern- zu Chromosomenfläche als einziger Parameter in den Interphasestadien signifikant.

In einer anschließenden Einfaktoriellen ANOVA mit Waller-Duncan Post-Hoc-Test wurde bestimmt, zwischen welchen Interphasestadien der Faktor Kern- zu Chromosomenfläche variierte.

Alle Testentscheidungen wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ getroffen.

3.6.2. Morphologische Faktoren

Einteilung der „morphologischen“ Faktoren:

Chromosomenlage im Interphasekern

Chromosomenform

Knick im Zentromerbereich

Die Existenz eines Zusammenhangs zwischen den morphologischen Faktoren und den Interphasestadien wurde mittels Chi-Quadrat Test überprüft. Darüber hinaus wurden die Korrelationskoeffizienten (Spearman-Korrelationskoeffizient) für die Beziehungen der morphologischen Faktoren untereinander und für die Beziehungen der morphologischen Faktoren zu den Interphasestadien bestimmt.

Die Testentscheidungen für den Chi-Quadrat Test wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$, die für die Korrelationsanalyse mit $p < 0,01$ getroffen.

Material und Methode

Medium

500 ml RPMI1640 mit Glutamax-Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco®) mit 60 ml fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom AG), sowie 5 ml Penicillin (10 000 U) / Streptomycin (10 000 µg/ml) (Biochrom AG).

Sterile Gewebekulturflaschen für Suspensionskulturen mit schrägem Hals (Falcon®).

Trypsin / EDTA-Lösung (Biochrom AG)

Trypsin (0,05%) und EDTA-Lösung (0,02%) in PBS

Aqua dest.

Mit Seralpur DELTA (Seral®) gewonnenes Reinstwasser (entionisiert, organisch rein, partikelfrei), das zusätzlich autoklaviert wird.

Kaliumchlorid-Lösung (hypoton)

Kaliumchlorid (Merck®) - 0,56% in Aqua dest.

Fixativ

Eisessig (CH₃COOH) (Merck®) + Methanol (Merck®) = 1 + 3

20xSSC (Gibco®)

87,65 g Natriumchlorid (Roth®)

44,10 g Natriumcitrat-Dihydrat (Merck®)

ad 500 ml Aqua dest.

autoklavieren

2xSSC.

200 ml 20xSSC in 1 l Aqua dest.

pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

1xSSC

100 ml 20xSSC in 1 l Aqua dest.

pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

Material und Methode

0,1xSSC

10 ml 20xSSC in 1 l Aqua dest.
pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

4xSSCT

400 ml 20xSSC in 1 l Aqua dest.
0,05% Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigam®)
pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

1xPBS

PBS Dulbecco (9,55 g/l, Seromed®)
in Aqua dest.

NaOH 0,07 mol/l

ThyminR

1,21 mg 2-Desoxythymidin (p.A., Serva, 1 g) in 50 ml Hanks BSS lösen und steril filtrieren.

DAPI/Antifade

0,4% 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma, Stocklösung: 50 µg/ml), mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories) ansetzen und bei 4°C lagern.

Geräte

Brutschrank:

Heraeus, 37°C, 5% CO₂

Zentrifuge:

Biofuge 15

Zellkulturflaschen:

Material und Methode

25 cm²Falcon®-Zellkulturflasche, steril, gammabestrahlt, mit Schraubverschluss

Petrischalen:

Cellstar® (Greiner Labortechnik), 94 / 16 mm, Qualität TC

Objektträger:

Menzel-Superfrost®

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Insgesamt standen 700 Interphasekerne zur Verfügung, bei denen in der Übersichtsvergrößerung (100x) nach Hybridisierung mit dem MCB-Proben-Set für das menschliche Chromosom 5 spezifische Signale erkennbar waren. Diese Kerne wurden bei 1000x Vergrößerung nach dem Kriterium „rund“ oder „oval“ beurteilt, wobei die als „oval“ gekennzeichneten Kerne nicht in die weitere Auswertung aufgenommen wurden. Die 476 als „rund“ definierten Kerne verteilten sich über die verschiedenen Interphasestadien wie in Tab. 2. gezeigt. Diese 476 Kerne wurden mit dem 6-Falschfarbmodus daraufhin untersucht, ob auf diesem Fabbandenniveau ganze Chromosomen 5 darstellbar sind. Komplizierend kommt bei HeLa-Zellen hinzu, dass nicht nur zwei intakte Chromosomen 5 vorliegen, sondern zusätzlich ein Chromosom 5 mit einer Deletion des kurzen Arms und zwei Isochromosomen 5p und ein Chromosom 5, dessen langer Arm deletiert ist (siehe Abb. 4.5.).

Nach Einsatz dieses Auswahlkriteriums verblieben 73 Kerne mit insgesamt 76 Chromosomen 5 (siehe Tab. 2). In allen anderen Kernen fanden sich nicht näher analysierbare Überlagerungen, so dass eine Abgrenzung einzelner Chromosomen nicht ausreichend verlässlich erfolgen konnte.

Tab. 2. Übersicht der ausgewerteten Zellkerne mit Angabe der als „rund“ definierten Kerne und der auswertbaren Chromosomen

Zellsuspension	A1	B1	C1	D1	E1	F1	A3	B3	C3	D3	E3	F3	gesamt
ausgewertete Kerne	53	51	54	56	61	63	65	62	57	41	81	56	700
Kerne „rund“	36	36	49	30	46	36	54	27	52	27	57	23	476
ausgewertete Chromosomen	8	6	8	8	10	6	8	3	4	5	9	1	76

Die geringe Anzahl an auswertbaren Chromosomen ist darauf zurückzuführen, dass eine hohe Anzahl der Zellkerne und Chromosomen die Auswahlkriterien nicht erfüllten. Um eine Auswirkung der Zellkernform auf die Länge und Form der Chromosomen zu verhindern, wurden ausschließlich runde Zellkerne in die Auswertung aufgenommen.

Ergebnisse

Hinzu kommt, dass nur solche Chromosomen ausgewertet wurden, bei denen keine störenden Überlagerungen vorlagen und die eine ausreichende Differenzierung im 6-Falschfarbmodus zuließen (siehe Auswahlkriterien in Material und Methode 3.5.1.).

Die 76 auswertbaren Chromosomen wurden auf ihre Lage im Kern, ihre Form, ihre absolute Länge und ihre Gesamtfläche hin untersucht. Mittels computererrechneter Falschfarbbänderung wurden Chromosomenachsen im 6-, 11- und 16-Falschfarbmodus ermittelt sowie in einem 24-Falschfarbmodus die Flächen von zwei Banden vergleichend ausgemessen, die einer Giemsa-hellen bzw. -dunklen Bande auf Metaphaseebene nach GTG-Bänderung entsprechen.

4.1. Fläche des Kerns

Von den insgesamt 700 Kernen wurde 476 Kerne als „rund“ definiert und in die weitere Auswertung aufgenommen. Es wurde die Fläche der einzelnen Kerne bestimmt und

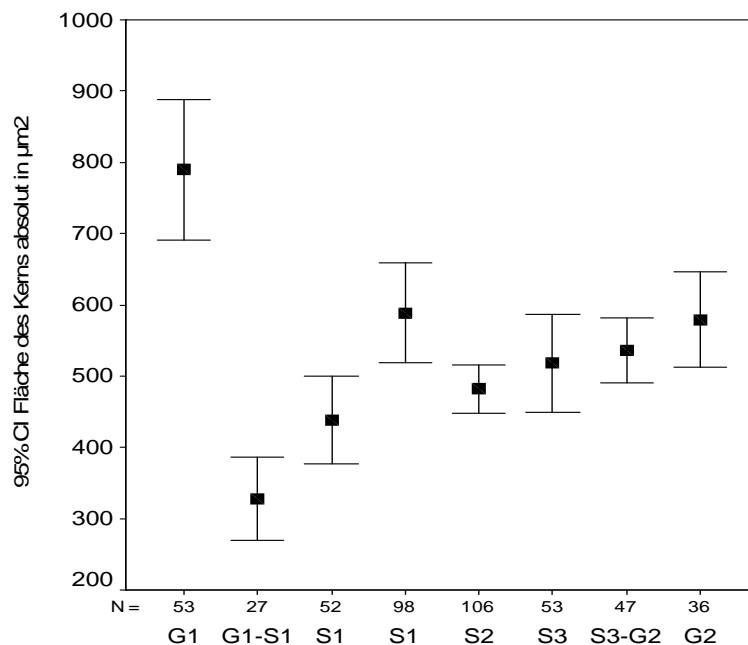


Abb. 4.1. Größe der Kernflächen in Abhängigkeit der Interphasestadien.

Ergebnisse

Die Kerngrößen variieren signifikant über die Stadien (Anova: $p < 0,001$). Wie in Abb. 4.1. gezeigt, weisen die Kerne in der G1-Phase eine signifikant größere Fläche auf. Ab der frühen S-Phase steigt die Kernfläche im weiteren Verlauf der Interphasestadien signifikant an.

4.2. Darstellung des Chromosoms 5 in HeLa-Zellen

Mit Hilfe des Multi-Color-Bandings konnte das Chromosom 5 in den verschiedenen Interphasestadien dargestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Chromosomen, hier beispielhaft das Chromosom 5, über den Verlauf der Interphase ihre Struktur erhalten und sich mit Hilfe des MCB eine korrekte Bandenabfolge, und damit auch eine innerchromosomale Integrität, darstellen lässt.

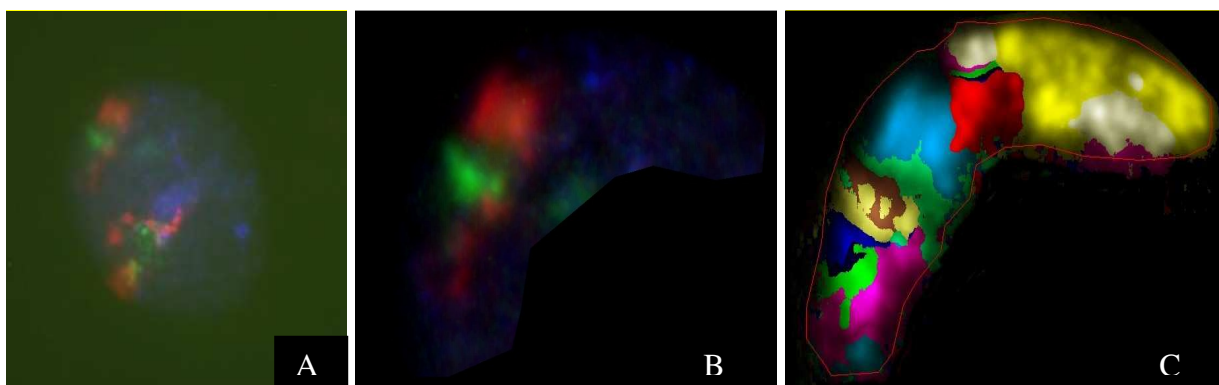


Abb. 4.2. Chromosom 5 in der frühen S-Phase einer HeLa-Zelle

A zeigt eine Nativaufnahme des Kerns 41 aus der HeLa-Zellsuspension A1, entsprechend der frühen S-Phase, nach Fluorochrommarkierung mit dem MCB-Proben-Set des Chromosoms 5. Es lassen sich voneinander getrennte „Farbwolken“ erkennen, durch die die DNA von Chromosom 5 repräsentiert wird. In B wurde eine Vergrößerung und Eingrenzung des oberen linken Bereichs durchgeführt, in dem eine Falschfarbwolke eines einzelnen Chromosoms 5 erkennbar ist. C zeigt dasselbe Chromosom 5 im 11-Falschfarbmodus. Die aus Metaphasechromosomen 5 bekannte Falschfarbbandenstruktur ist deutlich erkennbar. Eine Abknickung des Chromosoms in der Zentromerregion zwischen den Falschfarbbanden des p- und des q-Arms ist deutlich.

Wie hier an einem Kern aus der Zellsuspension A1 (der frühen S-Phase entsprechend) beispielhaft dargestellt werden kann, können DNA-Bereiche für Chromosom 5 getrennt voneinander sichtbar gemacht werden. Der Vergleich mit dem Falschfarbmodus eines

Ergebnisse

Metaphasechromosoms (siehe Abb. 4.5.) zeigt, dass die Falschfarbbandenstruktur nahezu identisch ist. Im 11-Falschfarbmodus ist die Struktur und die Form des Chromosoms 5 deutlich zu erkennen. Das Chromosom 5 weist eine Falschfarbbänderung auf, die es ermöglicht, alle Banden von Telomer zu Telomer nachzuvollziehen und es als Chromosom 5 zu identifizieren. Das Chromosom 5 lässt sich also in Bezug auf seine Ähnlichkeit zur DNA-vermittelten Bandenstruktur von Metaphasechromosomen auch in anderen menschlichen Geweben (nicht nur in Lymphozyten, s. Lemke et al., 2002), wie hier exemplarisch an HeLa-Zellen gezeigt, darstellen.

4.3. Darstellung der HeLa-Zellen während der verschiedenen Zellzyklusstadien

Zur Darstellung des Chromosoms 5 der HeLa-Zelle in den unterschiedlichen Stadien der Interphase wurden die HeLa-Zellkulturen synchronisiert. Wie im Abschnitt 3.2. beschrieben, wurden verschiedene Zellsuspensionen hergestellt, deren Zellen eine chronologische Abfolge der Interphasestadien repräsentieren.

Suspensionen mit Zellen der G1-Phase, G1- bis frühe S-Phase, frühe S-Phase, frühe bis mittlere S-Phase, mittlere S-Phase, mittlere bis späte S-Phase, späte S-Phase bis G2-Phase und G2-Phase wurden unterschieden und entsprechend aufgearbeitet.

Hybridisierungen mit dem MCB-Proben-Set des Chromosoms 5 ließen erkennen, dass die Struktur und die Form des Chromosoms 5 in den unterschiedlichen Interphasestadien ähnlich der von Metaphasechromosomen ist. Für die in Material und Methode aufgeführten zwölf verschiedenen Zellsuspensionen fanden sich jedoch zu wenig auswertbare Chromosomen. Aus diesem Grunde wurden die ausgewerteten Chromosomen entsprechend ihrer zeitlichen Aufarbeitung in acht Gruppen zusammengefasst (siehe in Abschnitt 3.6.)

Ein Beispiel für ein Chromosom 5 in der frühen S-Phase ist in Abb. 4.2. zu sehen. Abb. 4.3. zeigt ein Chromosom 5 in der frühen bis mittleren S-Phase, Abb. 4.4. zeigt es in der G2-Phase.

Hiermit ist gezeigt, dass in Bezug auf Falschfarbbandenabfolge die Struktur des Chromosoms 5 in der G1-, S-, und G2-Phase durchgehend mit dem in der Metaphase vergleichbar bzw. ähnlich ist.

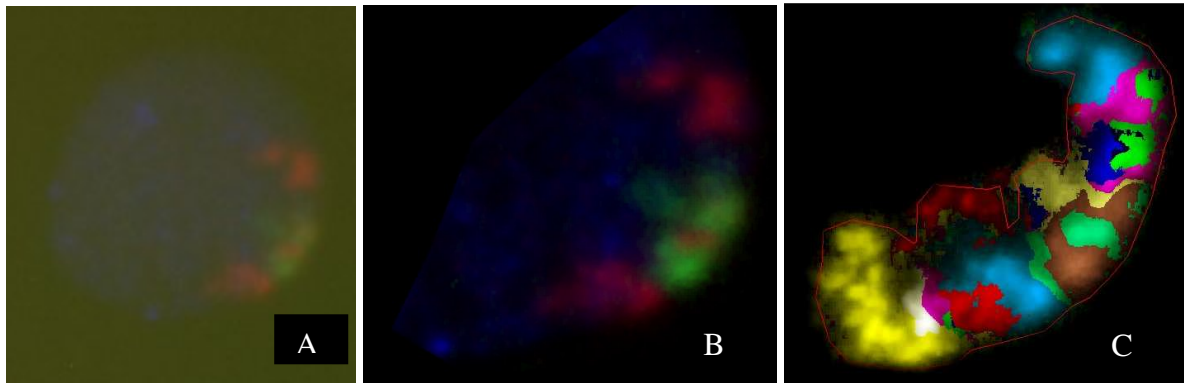


Abb. 4.3. Darstellung eines Chromosoms 5 bei HeLa-Zellen in der frühen bis mittleren S-Phase

A zeigt eine Nativaufnahme des Kerns 34 aus der HeLa-Zellsuspension E3 entsprechend der frühen bis mittleren S-Phase nach Fluorochrommarkierung mit dem MCB-Proben-Set des Chromosoms 5. Es lassen sich voneinander getrennte „Farbwolken“ erkennen, durch die die DNA von Chromosom 5 repräsentiert wird. In B wurde eine Vergrößerung und Eingrenzung des rechten Bereichs durchgeführt, in dem eine Falschfarbwolke eines einzelnen Chromosoms 5 erkennbar ist. C ist die Darstellung dieses Chromosoms 5 im 11-Falschfarbmodus. Die aus Metaphasechromosomen 5 bekannte Falschfarbbandenstruktur ist deutlich erkennbar.

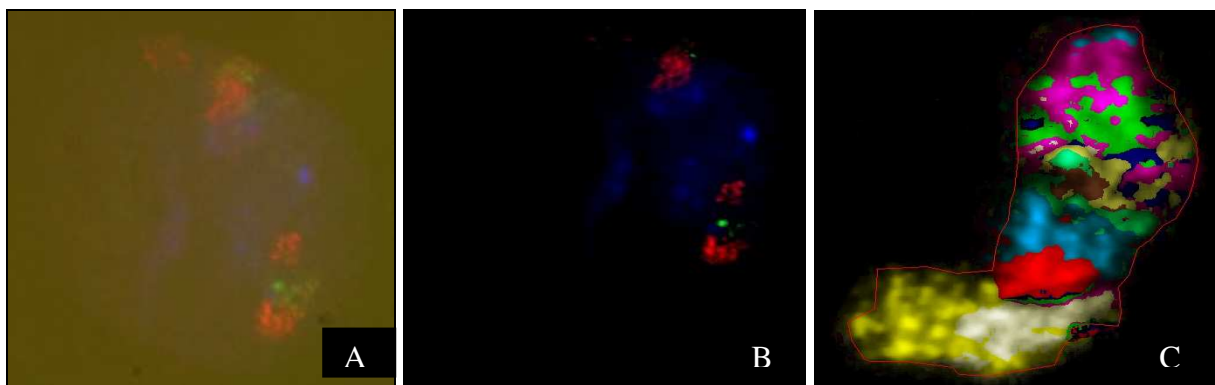


Abb. 4.4. Darstellung eines Chromosoms 5 bei HeLa-Zellen in der G2-Phase

A zeigt eine Nativaufnahme des Kerns 6 aus der HeLa-Zellsuspension F1 entsprechend der G2-Phase nach Fluorochrommarkierung mit dem MCB-Proben-Set des Chromosoms 5. Es lassen sich voneinander getrennte „Farbwolken“ erkennen, durch die die DNA von Chromosom 5 repräsentiert wird. In B wurde eine Vergrößerung und Eingrenzung des rechten Bereichs durchgeführt, in dem eine Falschfarbwolke eines einzelnen Chromosoms 5 erkennbar ist. C ist die Darstellung dieses Chromosoms 5 im 11-Falschfarbmodus. Die aus Metaphasechromosomen 5 bekannte Falschfarbbandenstruktur ist deutlich erkennbar.

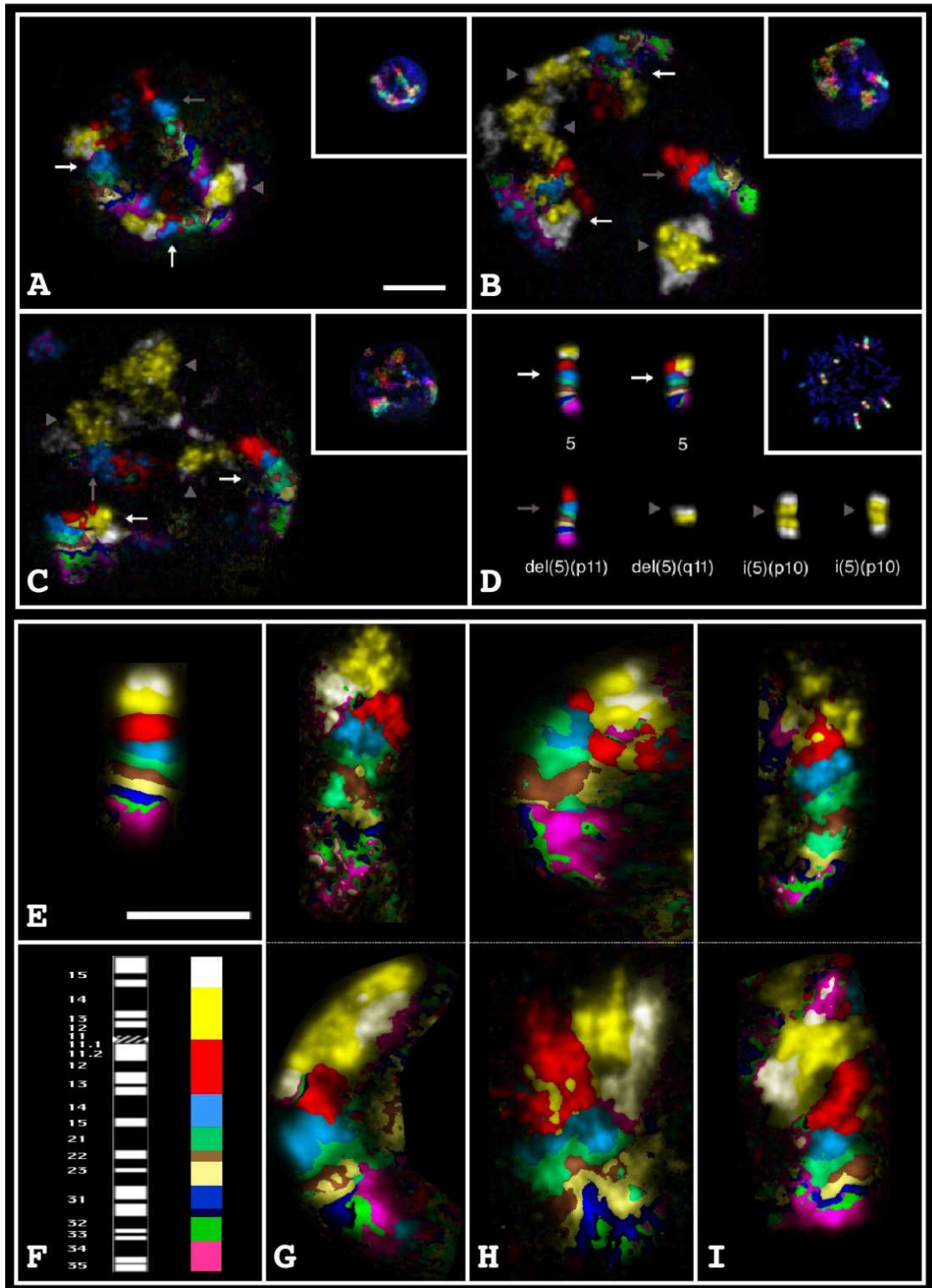


Abb. 4.5. Darstellung des Chromosoms 5 bei HeLa-Zellen über die Interphasestadien mit Darstellung der chromosomalen Aberrationen des Chromosoms 5

Multicolor-gebändertes menschliches Chromosom 5 in der G1-, S- und G2-Phase sowie in der Metaphase von HeLa-Zellen aus Lemke et al (2002). Die hellen Pfeile zeigen auf die normalen Chromosomen 5. Die grauen Pfeile zeigen auf die Chromosomen mit einer Deletion des kurzen Arms, del (5)(p11). Die grauen Dreiecke markieren die

Ergebnisse

Chromosomen, die eine Deletion des langen Arms aufweisen, del (5)(q11) und die Isochromosomen 5p, i(5)(p10). Der Balken in A entspricht 5 µm und bezieht sich auf die Bilder A bis D. Der Balken in E entspricht 10 µm und bezieht sich auf die Bilder E bis I. A zeigt das MCB-Muster eines Interphasekerns von HeLa-Zellen in der G1-Phase. Einige Chromosomen liegen zufällig eng beieinander, das Bandenmuster ist dem bei Metaphasechromosomen vergleichbar. Der gleiche Interphasekern ist bei niedriger Vergrößerung oben rechts gezeigt. Der Kern ist DAPI gefärbt (blau) und die verschiedenen Farben sind auf die Fluoreszenzsignale zurückzuführen, die mit den verschiedenen Filterkombinationen aufgenommen wurden. B zeigt einen Interphasekern, der in der S-Phase arretiert ist. In C ist ein Interphasekern aus der G2-Phase dargestellt. Die Chromosomen 5 in der S-Phase sind in ihrer Länge ähnlich denen in der G1-, und der G2-Phase, jedoch breiter. In allen Stadien des Zellzyklus ist das MCB-Muster von Chromosom 5 nahezu übereinstimmend. Alle Chromosomenaberrationen, die in der Metaphase sichtbar sind, sind auch in der G1-, S-, und G2-Phase erkennbar. D zeigt den aberranten Karyotyp der HeLa-Zelle bezüglich des Chromosoms 5. In E ist ein Metaphasechromosom 5 einer HeLa-Zelle dargestellt. Der Balken entspricht 10 µm. Das Ideogramm von Chromosom 5 und das korrespondierende Falschfarbmuster sind in F dargestellt. In G, H und I sind bei entsprechender Vergrößerung (siehe E) Interphasechromosomen in der G1-, S- und G2-Phase dargestellt.

4.4. Chromosom 5-spezifische Chromosomenaberrationen

Die Chromosom 5-spezifischen Chromosomenaberrationen bei den hier untersuchten HeLa-Zellen sind im Stadium der Metaphase in Abb. 4.5. D erkennbar. Neben zwei normalen Chromosomen 5 liegt bei einem Chromosom 5 eine Deletion des kurzen Arms vor (die gelbe und die weiße Bande fehlen, sie repräsentieren zusammen den p-Arm). Daneben fehlt bei einem Chromosom 5 der komplette q-Arm (5q-) und zwei weitere Chromosomen sind als Isochromosomen des p-Arms zu werten. Alle diese Chromosomenaberrationen sind auch in der G1-, S-, und G2-Phase erkennbar (siehe Abb. 4.5. A bis D).

4.5. Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern

Zur Ermittlung der Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern wurde davon ausgegangen, dass der Zellkern ursprünglich einer Kugel entsprochen hat und durch die Präparation zu einer Scheibe abgeflacht wurde. Zur näheren Beschreibung der Chromosomenlage innerhalb dieser Scheibe wurde diese in Sektoren eingeteilt (siehe

Ergebnisse

abschnitt 3.5.2.2.). Alle 76 untersuchten Chromosomen konnten in diese Untersuchung einbezogen werden. Es zeigte sich eine statistisch signifikante bevorzugte Lage des Chromosoms 5 peripher bzw. peripher-intermediär im Interphasekern (s. Tab. 3).

Tab. 3. Zellzykluspezifische Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen.

Lage	G1-						S3-				Gesamt							
	G1		S1		S1		S2		S3				G2					
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
peripher	4	50	1	33	2	50	7	37	5	29	1	11	6	60	1	17	27	36
peripher/intermediär	2	25	2	67	0	0	9	47	5	29	5	56	1	10	4	67	28	37
intermediär	0	0	0	0	0	0	2	11	5	29	3	33	3	30	1	17	14	18
intermediär/zentral	2	25	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
zentral	0	0	0	0	2	50	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	3	4
kernübergreifend	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	1	1

Chi²-Test: p=0,011

4.6. Chromosomenform

Die Zentromerregion ist bei Metaphasechromosomen leicht anhand einer Einschnürung zu erkennen. Beim Interphasechromosomen 5 hingegen lässt die Chromosomenform keine Rückschlüsse auf die Lage der Zentromerregion zu. Sie ist lediglich über die Abfolge der Falschfarbbanden in ihrer Lage zu differenzieren. Für diese Untersuchung standen alle 76 Chromosomen zur Verfügung. Mittels eines Spearman-Tests für Kategorien wurde die Korrelation zwischen der Chromosomenform und dem Vorliegen einer Abknickung im Zentromerbereich untersucht (siehe 3.5.2.3.). Bei einem Signifikantsniveau von $p < 0,01$ zeigte sich eine Korrelation zwischen der Chromosomenform (für einfach, zweifach und auch dreifach geknickte Chromosomen) und einem vorliegenden Knick im Zentromer.

Die Ergebnisse (s. Tab. 4) weisen darauf hin, dass eine Abknickung vorzugsweise zwischen den Falschfarbbanden erfolgt, die die Zentromerregion flankieren. Eine wie bei Metaphasechromosomen regelhaft gestreckte Form konnte bei den Interphasechromosomen nicht gesehen werden.

Ergebnisse

Tab. 4. Form des Chromosoms 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen

Chromosomenform	Knick im Zentromer			
	nein		ja	
	n	%	n	%
gestreckt	13	100		
einfach gebogen	12	100		
zweifach gebogen	2	100		
mehrfach gebogen	4	100		
einfach geknickt	9	30	21	70
zweifach geknickt	2	50	2	50
mehrfach geknickt	2	40	3	60
geschlängelt	6	100		

Chi²-Test: p=0,001

Eine signifikante Beziehung der Chromosomenform zu den verschiedenen Interphasestadien wurde nicht festgestellt.

4.7. Chromosomenlänge

Zur Erfassung der Chromosomenlänge im Interphasekern wurde anhand der Falschfarbbanden (6-Falschfarbmodus) eine virtuelle Achse von einem Telomer zum anderen gelegt und deren Länge als Maß für die Länge des Chromosoms gewertet. Über den gesamten Zellzyklus standen für diese Auswertung 76 Chromosomen zur Verfügung. Die ermittelten Chromosomenlängen wurden jeweils in Relation zur Fläche des gesamten Zellkerns gesetzt. Unter Berücksichtigung dieser Normierung zeigte sich bei der statistischen Auswertung keine signifikante Längenänderung der Chromosomen im Verlauf der Interphasestadien. Bei der Länge der Chromsomen in der G1-Phase fällt der höhere Mittelwert und die größere Variationsbreite auf.

Die Variation des mittels der Regressionsanalyse als signifikant erkannten Parameters, das Verhältnis aus Chromosomenlänge zu Kernfläche über die Interphasestadien, wird in Abb. 4.6. verdeutlicht.

Ergebnisse

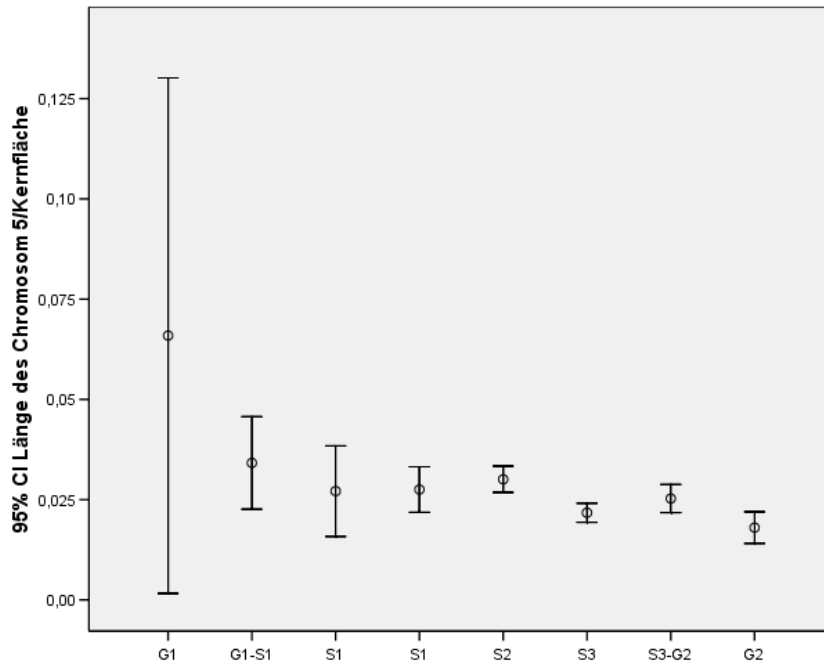


Abb. 4.6. Zellzyklusspezifische Relationen von Chromosomenlänge des Chromosoms 5 zur Interphasekernfläche bei HeLa-Zellen

Ein Vergleich der Einzelwerte führte zu keinen signifikanten Unterschieden in den aufeinanderfolgenden Phasen. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Änderung über die gesamten Interphasestadien (Anova: $p=0,014$).

Des weiteren wurde für jedes untersuchte Chromosom eine vergleichende Darstellung im 6-, 11- und 16-Falschfarbmodus durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Achse von Telomer zu Telomer durch die Mitte der einzelnen Falschfarbbanden gezogen (siehe Abb. 3.5., 3.6. und 3.7.). Die ermittelten Achsenlängen wurden jeweils in Relation zur Fläche des gesamten Zellkerns gesetzt.

Bezüglich der Länge der Falschfarbachse des Chromosoms 5 im 6-Falschfarbmodus ließ sich keine signifikante Änderung über die Interphasestadien darstellen (Anova: $p=0,226$). Auch im 11-, und 16-Falschfarbmodus zeigte sich keine signifikante Änderung der jeweiligen Falschfarbachsenlänge über den Verlauf der Interphase (11-Falschfarbmodus: Anova: $p=0,054$; 16-Falschfarbmodus: Anova: $p=0,131$). Bei der Länge der Chromosomen im 11-, und 16-Falschfarbmodus in der G1-Phase fällt der höhere Mittelwert und die größere Variationsbreite auf.

Ergebnisse

In den graphischen Darstellungen für die beiden Falschfarbmodi (siehe Abb. 4.7.) ist die Tendenz zu erkennen, dass die Längen der Falschfarbachsen eine Abnahme über den Verlauf der Interphase aufweisen.

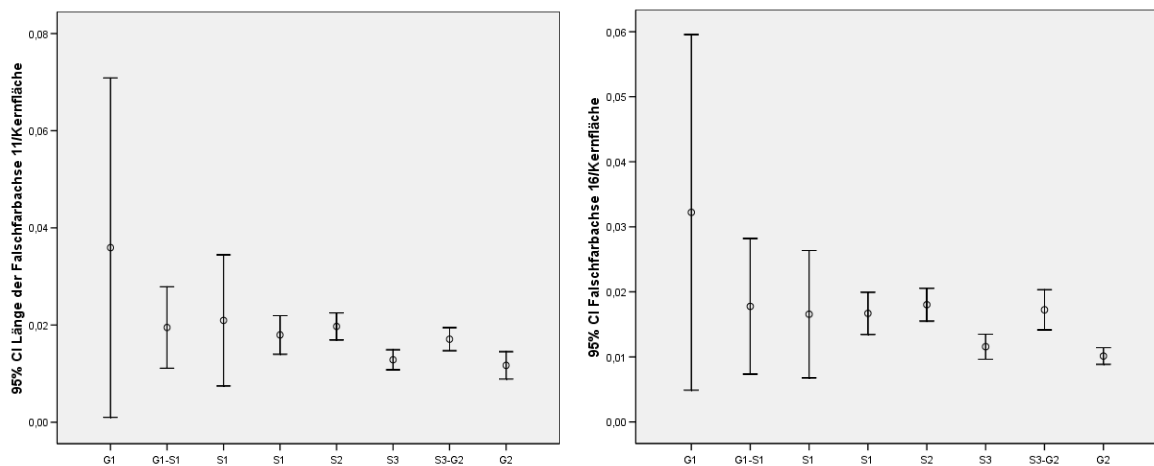


Abb. 4.7. Zellzyklusspezifische Relationen von Länge der Falschfarbachse von Chromosom 5 im 11- und 16-Falschfarbmodus zur Kernfläche bei HeLa-Zellen

4.8. Chromosomenfläche

Zur Berechnung der Fläche der einzelnen Interphasechromosomen 5 wurden die Chromosomen im 6-Falschfarbmodus dargestellt und mittels der ISIS-Software (siehe Abschnitt 3.5.2.8.) die Fläche gemessen. Insgesamt konnten alle 76 Chromosomen in die Auswertung einbezogen werden. Die ermittelte Chromosomenfläche wurde jeweils in Relation zur Fläche des gesamten Zellkerns gesetzt. Unter Berücksichtigung dieser Normierung zeigte sich bei der statistischen Auswertung eine signifikante Größenabnahme der Chromosomenfläche im Verlauf der Interphasestadien. Dieser Unterschied wurde v.a. innerhalb der S-Phase deutlich. Die Variation des mittels Regressionsanalyse als signifikant erkannten Parameters ($p < 0,001$), das Verhältnis aus Chromosomen- zu Kernfläche über die Interphasestadien wird in Abb. 4.8. verdeutlicht. Ein Vergleich der Einzelwerte führte zu keinen signifikanten Unterschieden in den aufeinanderfolgenden Phasen. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Änderung über die gesamten Interphasestadien.

Ergebnisse

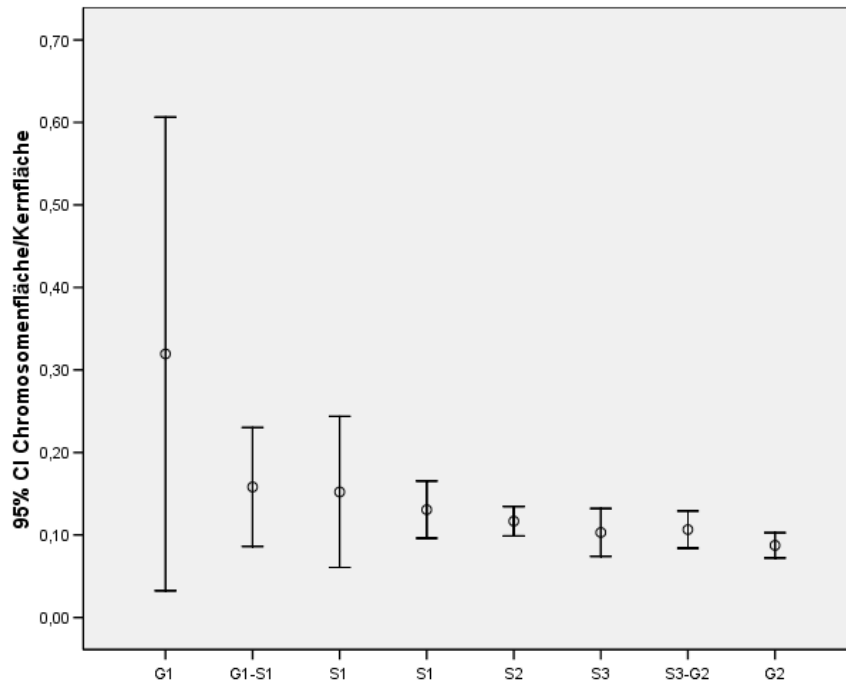


Abb. 4.8. Zellzykluspezifische Relationen von Chromosomen- zu Kernfläche von Chromosom 5 bei HeLa-Zellen

4.9. Vergleich der Flächen zweier Falschfarbbanden, die einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen

Entsprechend den Experimenten nach „chromosome stretching“ (Hliscs et al., 1997b) spalten sich Giemsa-dunkle Banden beim Dehnungsprozess auf und präsentieren Giemsa-helle Subbanden. Zur Klärung der Frage, ob sich auf DNA-Niveau Giemsa-helle Banden anhand der Fläche ihrer Falschfarben anders darstellen als die entsprechende Fläche von Giemsa-dunklen Banden, wurden zwei benachbarte Banden in ihrem Verhalten über den Zellzyklus miteinander verglichen. Als Giemsa-helle Bande wurde 5q22 (MCB-Falschfarbe blau im 24-Falschfarbmodus H24) ausgewählt, als Giemsa-dunkle Bande 5q23.1 (MCB-Falschfarbe pink im 24-Falschfarbmodus H24) und in ihren Flächen über den Zellzyklus vermessen.

Für die statistische Auswertung standen alle 76 Chromosomen zur Verfügung. Die beiden auf Giemsaniveau ähnlich großen Banden zeigten beim Größenvergleich der

Ergebnisse

Falschfarbflächen über die Interphasestadien keine signifikanten Änderungen (Giemsa-helle Bande: Anova: $p=0,344$; Giemsa-dunkle Bande: Anova: $p=0,233$).

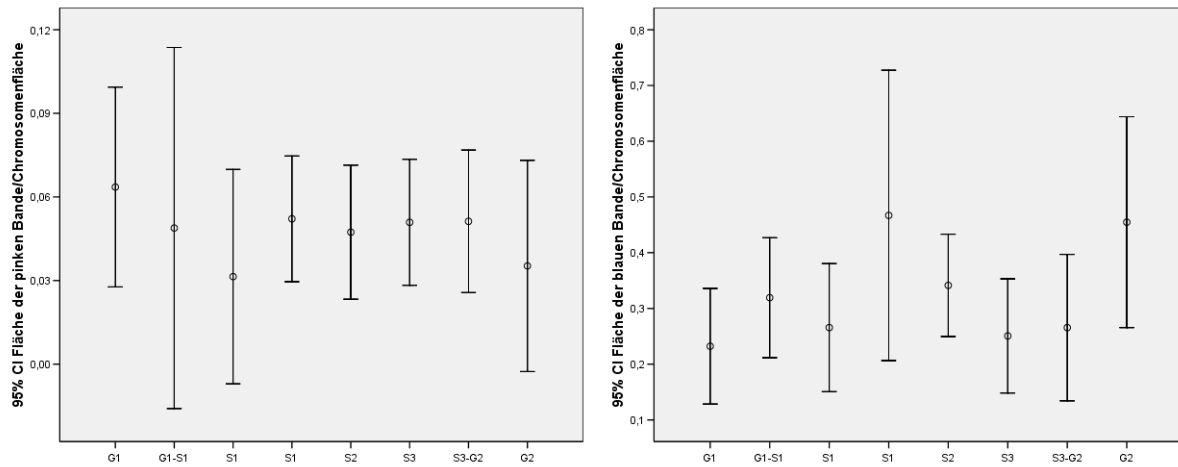


Abb. 4.9. Zellzykluspezifische Relationen der Flächen der Falschfarbbanden pink (5q23.1) und blau (5q22) zur Fläche des Chromosoms 5 bei HeLa-Zellen

5. Diskussion

Als Ausgangsmaterial stand mit 700 Zellkernen eine ausreichende Anzahl an Interphasekernen für die Auswertung zur Verfügung. Die scharf gefassten Auswahlkriterien für die Chromosomen 5 (siehe Abschnitt 3.5.1.) führten jedoch lediglich zu 76 auswertbaren Chromosomen, deren Analyse die Grundlage der hier beschriebenen Ergebnisse bildet. Als Erklärung für den geringen Anteil an auswertbaren Chromosomen können einerseits die Schärfe der Kriterien selbst und andererseits technische Gründe angeführt werden. Letztere stehen vermutlich mit der Hybridisierungseffizienz in Verbindung. In Vorversuchen (Ergebnisse hier nicht gezeigt) wurde ein anderes Chromosom 5-spezifisches Proben-Set für die Darstellung der MCB-Bandenmuster eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten dabei eine deutlich schlechtere Ausbeute an auswertbaren Chromosomen. Hieraus lässt sich schließen, dass das hier eingesetzte Chromosom 5-spezifische Proben-Set qualitativ deutlich besser ist und die Qualität der Hybridisierung auf Interphasechromosomen selbst, im Gegensatz zur Hybridisierung auf Metaphasechromosomen, einen anfälligen Parameter darstellt.

Als weitere Erklärung für die geringe Ausbeute können sterische Gründe angeführt werden. Die DNA in Metaphasechromosomen ist für die Proben-DNA beim Hybridisierungsprozess von allen Seiten zugänglich. Im Interphasekern jedoch liegen die Chromosomen nicht vereinzelt vor, sondern sind von DNA anderer Chromosomen umgeben. Hinzu kommt, dass die Hybridisierung mit Chromosomenregionenspezifischen Proben-Sets unter technischen Gesichtspunkten an Metaphasechromosomen etabliert und optimiert ist, an Interphasechromosomen bisher jedoch nicht. Unter sterischen Gesichtspunkten muss auch berücksichtigt werden, dass der präparationsbedingte Abflachungsprozess der Zellkerne zu einer Zerstörung chromosomaler Strukturen führen kann, mit dem Ergebnis der Artefaktbildung. Dies kann auch erklären, dass sich bei der Auswertung der 76 untersuchten Chromosomen nicht immer eine spezifische, nachvollziehbare Chromosomenform zeigte. Während der Abflachung des Kerns von einer Kugel zu einer Scheibe ist mit Stauchungen, Torsionen und Überlagerungen der Chromosomen zu rechnen.

Aus der Berechnung der Interphasekernflächen über den Verlauf des Zellzyklus ergab sich überraschend, dass in der G1-Phase die Kerne am größten waren (s. Abb. 4.1.).

Diskussion

Ihre Fläche nimmt am Übergang zur frühen S-Phase deutlich ab, um von dort im Verlauf der weiteren Interphasestadien wieder zuzunehmen. In der Literatur liegen zu diesem Phänomen keine Untersuchungen vor. Es liegt nahe anzunehmen, dass die hier vorgenommene Präparation zur zytogenetischen Untersuchung, bei der die Behandlung mit Fixativ eine zentrale Rolle spielt, die Ursache darstellt. Entsprechende Hinweise ergeben sich aus den Untersuchungen von Hliscs et al. (1997a). In seiner Arbeit konnte er zeigen, dass beim Trocknungsprozess der Zellsuspension auf dem OT ein Quellungsprozess der mitotischen Zellen erfolgt, der möglicherweise auch in abgewandelter Form den Interphasekern betrifft. Es könnte beispielsweise sein, dass in der G1-Phase zahlreiche Proteine im Interphasekern so modifiziert sind, dass sie nach der zytogenetischen Aufarbeitung besonders gut quellen (siehe auch Claussen et al., 2002) und damit auch die Chromosomen verlängern. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die hier beobachteten, sehr großen Interphasekerne in der G1-Phase auf einen methodisch bedingten Fehler zurückzuführen sind. Bei der Synchronisation wurde von einem Mitoseindex von ca. 95% ausgegangen. Damit sind ca. 5% der Kerne auf den Objektträgern nicht in der G1-Phase. Dies könnten vor allem tetraploide Kerne sein, von denen in der Routinezytogenetik bekannt ist, dass sie runder erscheinen. Sie könnten damit durch die Auswahlkriterien bevorzugt in der Auswertung Eingang gefunden haben. Über Untersuchungen auf Tetraploidie anhand der Anzahl der Interphasechromosomen 5 in den runden Zellen bestünde eine Möglichkeit der Differenzierung. Eine entsprechende Untersuchung wurde hier jedoch nicht vorgenommen und ist über die Analyse der MCB-Falschfarbentmuster auch wenig aussichtsreich, da die Zahl der eindeutig beurteilbaren Kerne zu gering wird. Entsprechendes gilt sowohl für die Chromosomenlänge (s. Abb. 4.6.), für die Länge der Falschfarbachsen im 11- und 16-Falschfarbmodus (s. Abb. 4.7.) als auch für die Fläche der Chromosomen (s. Abb. 4.8.).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich, entgegen der allgemeinen Lehrmeinung, Chromosomen in ihrer Form und Bandenstruktur auch im Interphasekern darstellen lassen. Dies war durch Lemke et al. (2002) bereits an Lymphozyten gezeigt worden. Teile der vorliegenden Arbeit sind in dieser Publikation enthalten. Durch die prinzipielle Bestätigung der Ergebnisse an einem zweiten Gewebe, hier an HeLa-Zellen, muss die bisherige Lehrmeinung, dass Chromosomen im Interphasekern keine definierbaren Strukturen erkennen lassen, grundlegend in Frage gestellt werden.

Diskussion

Exemplarisch konnte am Chromosom 5 der HeLa-Zellen gezeigt werden, dass nicht nur die Chromosomenstruktur allgemein erhalten bleibt, sondern sich auch eine sinnvolle Bandenabfolge innerhalb des Chromosoms abgrenzen lässt, die der von Metaphasechromosomen sehr ähnlich ist. Dennoch bestehen zwischen Interphasechromosomen und Metaphasechromosomen Unterschiede (siehe Abb. 4.5.). Die Falschfarbbanden von Interphasechromosomen erscheinen aufgelockerter und vielfach ineinander verlaufend. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Präparation der Zellen als Ursache für die Unterschiede eine wesentliche Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde von der Vorstellung ausgegangen, dass der Zellkern von HeLa-Zellen, entsprechend dem Zellkern von Lymphozyten, dreidimensional betrachtet einer Kugel entspricht. Präparationsbedingt kommt es während des Trocknungsvorgangs der auf einen Objektträger aufgetropften fixierten Zellsuspension zu einem charakteristischen Quellvorgang der Zellen mit anschließender Abflachung (Hliscs et al., 1997a; Claussen et al., 2002). Dabei wird aus dem ursprünglich kugeligen Zellkern eine flache Scheibe. Bei dieser Konfigurationsänderung des Zellkerns ist davon auszugehen, dass dadurch auch die Konfiguration der Chromosomen beeinflusst wird. Die dennoch erhalten gebliebenen Ähnlichkeiten der dargestellten Falschfarbbandenstrukturen zwischen Interphasechromosomen und Metaphasechromosomen weisen darauf hin, dass die Übereinstimmungen bei lebenden Zellen in dreidimensional erhaltenen Zellkernen noch deutlicher sein dürften.

Es ist allgemein bekannt, dass Lymphozyten im peripheren Blut in der G₀-Phase vorliegen. Es könnte somit die Möglichkeit bestehen, dass die Übereinstimmungen von Interphasechromosom und Metaphasechromosom nur auf die G₀-Phase beschränkt sind. Für die Klärung dieser Frage eignen sich Lymphozyten jedoch nicht, da deren Synchronisation erfahrungsgemäß möglich, aber nur wenig effizient ist. Diese Synchronisation kann zu allen Stadien des Zellzyklus bei HeLa-Zellen mit hoher Effizienz vorgenommen werden (Schmiady et Sperling, 1986). Die beiden hier eingesetzten Verfahren (N₂O-Überdruck-Block und Thymidin-Block, siehe Abschnitt 3.2.) führten zu einer Synchronisation von über 90% Effizienz (Sperling, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse zeigten (siehe Abb. 4.5.), dass die in der Metaphase bekannte Falschfarbabfolge zu allen Zeiten des Zellzyklus darstellbar ist. Interphasechromosomen sind somit Metaphasechromosomen sehr ähnlich. Für eine Beschreibung von Chromosomen im Interphasekern ist folglich der Terminus

Diskussion

„chromosome territory“ (Cremer et Cremer, 2001) zu allgemein. Er definiert, bzw. beschreibt lediglich einen Raum im Interphasekern und bezieht sich nicht direkt auf das jeweilige Chromosom und seine Struktur.

Mit dem Begriff „Chromosomen“, erstmals 1888 erwähnt durch Waldeyer, wird in der wissenschaftlichen Community das Metaphasechromosom verbunden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in der Zytogenetik des Menschen bei dem Begriff „Chromosom“ zwischen Interphase- und Metaphasechromosom unterschieden werden muss. Die Chromosomendarstellung in der Metaphase, und speziell hierbei mit Verfahren, die zu einer Abfolge von hellen und dunklen Banden führen (z.B. GTG-banding; Seabright, 1971), kann als Protein-vermittelt angesehen werden. Änderungen in der Proteinzusammensetzung der Chromosomen führen dazu, dass die Chromosomen in den in gleicher Weise aufgearbeiteten Interphasekernen nicht sichtbar sind. Wird jedoch, wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, eine DNA-vermittelte Bandendarstellung der Chromosomen gewählt, zeigen sich die Ähnlichkeiten zwischen Interphase- und Metaphasechromosomen.

Die verwendeten HeLa-Zellen zeigen Chromosomenmutationen des Chromosoms 5 (Abb. 4.5.). Die vorgelegten Ergebnisse lassen erkennen, dass diese Chromosomenanomalien im Detail nicht nur auf der Metaphase-Ebene, sondern auch in allen anderen Stadien des Zellzyklus darstellbar sind. Dies legt nahe, dass in Zukunft eine Chromosomenanalyse zur Erkennung von Strukturanomalien auch im Interphasekern möglich ist. Eine qualitative Verbesserung bei der Erkennung von Chromosomenanomalien im Interphasekern ist möglicherweise noch dann zu erzielen, wenn hierzu keine durch die herkömmliche zytogenetische Präparation abgeflachten Interphasekerne eingesetzt werden, sondern spezifisch solche, deren Struktur dreidimensional erhalten geblieben ist. Sollte eine verlässliche zytogenetische Diagnostik über diesen Weg an Interphasechromosomen möglich sein, könnte langfristig auf die zeitaufwendige Zellkultivierung zur Darstellung von Metaphasechromosomen verzichtet werden. Dies wäre von besonderer Bedeutung für die Darstellung und Analyse von Chromosomen in Tumorgewebe. Die Darstellung von Metaphasechromosomen bereitet hier vielfach Schwierigkeiten. Generell bestünde auch die Möglichkeit einer zytogenetischen Diagnostik bei Geweben, deren Teilungsaktivität bekanntermaßen sehr gering ist (z.B. Nervenzellen).

Diskussion

Die 76 zur Verfügung stehenden auswertbaren Chromosomen wurden auf ihre Lage im Interphasekern hin untersucht. Es konnte eine statistisch signifikant bevorzugte periphere und peripher intermediäre Chromosomenlage festgestellt werden (s. Tab. 3.). Lügen die Chromosomen 5 im dreidimensionalen Interphasekern regelhaft im Zentrum, würde sich auch nach dem durch die Präparation bedingten Abflachungsprozess eine zentrale Lage ergeben. Bei rand-, bzw. kernmembrannaher Lage der Chromosomen 5 im dreidimensionalen Zellkern können die Chromosomen 5 nach Abflachung in allen Bereichen des abgeflachten Zellkerns positioniert sein, dürften aber auch im Kernrandbereich nachweisbar sein. Da sich eine bevorzugt periphere und peripher intermediäre Chromosomenlage zeigte, kann auf Grund dieser Beobachtung festgestellt werden, dass die beiden intakten Chromosomen 5 der HeLa-Zellen im Verlauf der Interphase nicht ausschließlich im Zentrum des Zellkerns positioniert sind. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass größere Chromosomen, z.B. Chromosom 18, im Vergleich zu kleineren Chromosomen, z.B. Chromosom 19, sich bevorzugt in der Peripherie des Zellkerns befinden (Croft et al., 1999 und Cremer et al., 2003). Bei dem Unterschied zwischen den Chromosomen 18 und 19 in ihrer Lage im Zellkern wird jedoch der Genreichtum als Ursache angeführt. Diesen Unterschied unter funktionellen Gesichtspunkten als ursächlich aufzuführen ist naheliegend, wenn man in Rechnung stellt, dass das inaktive X-Chromosom als Barr-body bevorzugt am Zellkernrand lokalisiert ist.

Es wäre wünschenswert, wenn Interphasechromosomen in dreidimensional-erhaltenen Interphasekernen darstellbar wären. Hier ergeben sich jedoch unter technischen Gesichtspunkten Schwierigkeiten, sowohl bei der Präparation dreidimensional-erhaltener Zellkerne als auch bei der mikroskopischen Darstellung der chromosomalen Bandenstruktur nach Hybridisierung. Walter et al. (2006) diskutieren die technischen Möglichkeiten für die Darstellung von Interphasechromosomen detailliert.

Es fiel bei der Auswertung eine signifikant gehäufte Abknickung der Chromosomen 5 im Zentromerbereich auf. Dies ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen von Cremer et al. (1982), die ebenfalls auf eine V-förmige Anordnung der Chromosomen im Interphasekern hinweisen. Dies entspricht der Morphologie in der Anaphase (Rabl Orientierung), die bei rasch proliferierenden Zellen noch an den Interphasechromosomen nachweisbar ist. Chromosomen in der Metaphase zeigen hingegen vielfach eine zum Teil extrem gerade Ausrichtung. Wenn Chromosomen im

Diskussion

Interphasekern jedoch meist gebogen vorliegen, muss es einen Mechanismus geben, der die gerade Ausrichtung der Metaphasechromosomen erklären kann. Die Tatsache, dass isolierte Metaphasechromosomen noch über ein eigenes Potential verfügen, im Verlaufe der Chromosomenpräparation länger zu werden bzw. zu quellen (Claussen et al. 2002), lässt vermuten, dass sie hierbei erst gerade werden. Generell muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Auswahl der hier als auswertbar deklarierten Chromosomen selbst ein Problem darstellt. Es besteht die Möglichkeit, dass bei dieser Auswahl stark gebogene Chromosomen mit einer schwer erkennbaren Bandenabfolge bevorzugt nicht in die weitere Auswertung aufgenommen wurden. So betrachtet, müssen die hier als signifikant ermittelten Ergebnisse bezüglich der Chromosomenform relativiert werden.

Die herkömmliche Vorstellung zur Länge von Chromosomen im Interphasekern berücksichtigt die Beobachtungen, dass sogenannte "Prophasechromosomen" (Yunis, 1976) extrem lang sein können. Die Vermutung lag also nahe, dass die im Interphasekern nicht sichtbaren Chromosomen, z.B. in der mittleren und späten S-Phase, noch länger sind. In der Arbeit (Lemke et al., 2002; gleichberechtigter Erstautor Jan Claussen) konnte jedoch gezeigt werden, dass das Chromosom 5 während der Interphase in peripheren Lymphozyten im Mittel etwa gleichlang ist wie Metaphasechromosomen im 550- bzw. 600-Bandenstadium. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob in Bezug auf die Länge der Chromosomen 5 im Interphasekern bei HeLa-Zellen ein Unterschied zu Lymphozyten feststellbar ist. Die Länge des Interphasechromosoms 5 betrug bei Lymphozyten im Mittel $12\ \mu\text{m}$ (Lemke et al., 2002) und war damit ähnlich der Länge von Metaphasechromosomen im 600-Bandenstadium. Hinzu kommt die Frage, ob sich in den Stadien der Interphase eine dynamische Änderung der Chromosomenlänge feststellen lässt.

Im Verlauf der verschiedenen Interphasestadien ergab sich keine statistisch signifikante Längenänderung der Chromosomen 5. Die beobachteten Längen der Chromosomen in ihrer Relation zu den Kernflächen lassen über die Interphase den Schluss zu, dass, im Gegensatz zu früheren Erwartungen, eine völlige Entspiralisierung, die zu extrem langen Chromosomen führen würde, nicht vorliegt. Dies ist, auch im Hinblick auf die Chromosomen in der G1-, S- und G2-Phase, nachvollziehbar (siehe Abbildung 4.5. A-I). Die vorliegenden Untersuchungen stehen auch in einem scheinbaren Gegensatz zu den Beobachtungen von Lawrence et al. (1988), die zeigen konnten, dass die Distanz

Diskussion

zwischen zwei DNA-Proben im Interphasekern bis zum Faktor 10 zunimmt. Der sich daraus ergebende Rückschluss auf eine Längenzunahme der Chromosomen beim Übergang von der Metaphase in die Interphase um den Faktor 10 kann, unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse, nur über eine Kondensation und Dekondensation der Chromosomen erklärt werden, die sich im wesentlichen auf die Breite der Chromosomen auswirkt (siehe hierzu auch Weise et al., 2002).

Chromosomenlängen wie bei Prophasechromosomen, bei Yunis (1976) erstmals beschrieben, fehlten in der vorliegenden Untersuchung. Entsprechend lange Chromosomen konnten auch von Lemke et al. (2002) in Lymphozyten nicht nachgewiesen werden. Sie lassen sich, wie von Claussen et al. (2002) dargelegt, nur als präparationsbedingte Artefakte erklären, für die das komplexe Zusammenspiel von Protonierung durch die Essigsäure als Bestandteil des Fixativs und Hydratisierung durch Luftfeuchtigkeit verantwortlich ist. Die signifikant größere Kernfläche in der G1-Phase steht in einem gewissen Gegensatz zur hier gemachten Beobachtung, dass die Länge der Chromosomen über die gesamte Interphase relativ gleich bleibt. Möglicherweise sind die Chromosomen in der G1-Phase dennoch länger als in den übrigen Interphasestadien. Dieser Unterschied ist jedoch durch die geringe Anzahl der analysierbaren Chromosomen (n=76) hier nicht darstellbar.

Die Längenmessung der chromosomalen Falschfarbachsen im 6-, 11- und 16-Falschfarbmodus ergab keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Interphasestadien. Es wäre jedoch im 11- und 16-Falschfarbmodus zumindest ein Trend zu einer Längenzunahme über die S- und G2-Phase zu erwarten gewesen, da die jeweiligen Falschfarbenachsen der Interphasechromosomen eine „ZickZack“-Linie beschreiben, die so bei Metaphasechromosomen nicht vorliegt.

Trimborn et al. (2004) beschreiben zwei Kinder mit klinischen Auffälligkeiten, bei denen die Chromosomenanalyse, nach Standardpräparation, durchgehend verkürzte Chromosomen zeigen. Hinzu kommt, dass vielfach mitotische Zellen vorliegen, die vorzeitig kondensierte Chromosomen präsentieren. Nach den Vorstellungen von Claussen et al. (2002) und Claussen (2005) kann dieses Phänomen der vorzeitigen Chromosomenkondensation nach dem Konzept der chromosomenregion-spezifischen Proteinquellung erklärt werden. Demnach ist zu vermuten, dass die kurzen Chromosomen bei diesen beiden Patienten auf Veränderungen chromosomaler Proteinstrukturen (Veränderungen im Histoncode; Jenuwein et Allis, 2001) zurückzuführen sind. Die so veränderten Proteine sind während des

Diskussion

Präparationsvorganges zum Zeitpunkt der späten S-, und G2-Phase weniger leicht dehnbar. Als Konsequenz erscheinen sie verkürzt. Um die Richtigkeit dieser Vermutung experimentell nachzuweisen, könnten Versuche zum präparationsbedingten Quellungsverhalten von Einzelchromosomen, wie von Claussen et al. (2002) beschrieben, vorgenommen werden.

Im Verlauf der S-Phase kommt es zu einer Verdopplung der DNA. Dies legt den Schluss nahe, dass es damit zu einer Volumenzunahme des Chromosoms im dreidimensionalen Zellkern kommt. Im Rahmen des präparationsbedingten Abflachungsprozesses der Interphasekerne dürfte sich das vergrößerte Volumen der einzelnen Chromosomen als Flächenzunahme darstellen lassen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Fläche der Chromosom 5-spezifischen Falschfarben vermessen. Bei den hier verwendeten HeLa-Zellen konnte beobachtet werden, dass die Größe der Zellkerne stark variiert. Um die Auswirkungen dieses Phänomens auf die Beurteilung der Chromosomenfläche zu berücksichtigen, wurden die gemessenen Chromosomen 5-spezifischen Falschfarbflächen in Relation zur Gesamtfläche des dazugehörigen Zellkerns gesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich eine signifikante Größenabnahme der Chromosomenfläche über die Interphasestadien nachweisen lässt. Die Unterschiede sind jedoch von Messpunkt zu Messpunkt nicht signifikant. Es ergibt sich somit eine Schwierigkeit in der Interpretation zwischen der als gesichert anzusehenden Zunahme der DNA-Menge im Verlauf der S-Phase und der hier beobachteten Flächenabnahme, die zur Zeit nicht ausreichend erklärt werden kann. Ein Grund könnte in Zellzyklus-spezifischen Unterschieden der Dreidimensionalität der abgeflachten Kerne bzw. Chromosomen auf den Objektträgern liegen.

Volpi et al. haben 2000 am Beispiel von Chromosom 6 gezeigt, dass die DNA von Genen, die transkribiert werden, von der DNA des Chromosoms, von dem sie stammen, weit entfernt sein können. Dies lässt den Schluss zu, dass unter dreidimensionalen Gesichtspunkten aktiv gelesene Gene „ausloopen“. Folglich sollte die entsprechende Falschfarbbande etwas vergrößert sein. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis von Holmquist (1992) von Bedeutung, dass bei Metaphasechromosomen die Giemsa-hellen Banden genreicher sind und sich darin auch die „house keeping genes“ befinden, die „tissue specific genes“ hingegen in den genärmeren Giemsa-dunklen Banden.

Diskussion

Der Frage nachgehend, ob sich im Interphasekern aus Giemsa-hellen Banden ein bevorzugtes „ausloopen“ von Genen in Form der Vergrößerung deren Falschfarbfläche nachweisen lässt, wurden vergleichend die Flächen von zwei Falschfarbbanden, die bei Metaphasechromosomen einer Giemsa-hellen und einer Giemsa-dunklen Bande entsprechen, über den Verlauf der Interphasestadien vermessen. Die Ergebnisse führten jedoch zu keinen statisch signifikanten Unterschieden. Dies könnte einerseits auf die Möglichkeit zurückgeführt werden, dass bei HeLa-Zellen Gene in Giemsa-hellen Banden im Vergleich zu Giemsa-dunklen Banden nicht bevorzugt transkribiert werden. Andererseits können technische Gründe, vor allen Dingen im Bereich der Effizienz der Hybridisierung als Ursache in Frage kommen. So ist denkbar, dass die DNA einzelner „ausloopender“ Gene durch die DNA des bandenspezifischen Proben-Sets nicht ausreichend anfärbbar ist.

6. Zusammenfassung

Nach herkömmlicher Vorstellung werden die Unterschiede in der Länge der Chromosomen im Verlauf des Zellzyklus durch einen entsprechenden Chromosomenzyklus erklärt. Zweifel an diesem Konzept der Chromosomenkondensation und -dekondensation haben zu Experimenten an Lymphozyten geführt, die zeigen, dass das Chromosom 5 in der G₀-Phase im Interphasekern eine ähnliche DNA-vermittelte Bänderung zeigt wie das entsprechende Metaphasechromosom. In der vorliegenden Arbeit wurden HeLa-Zellen synchronisiert und mit dem gleichen Proben-Set für die Darstellung des Chromosoms 5 untersucht. Es wurde die Fläche der Interphasekerne mit auswertbaren Chromosomen gemessen (I) und analysiert, ob sich (II) das Chromosom 5 auch im Interphasekern eines anderen Gewebes molekularzytogenetisch ähnlich darstellen lässt, (III) wenn ja, ob dies auch für alle Phasen des Zellzyklus gilt und ob (IV) Chromosomenmutationen an diesen Interphasechromosomen erkennbar sind. Auf der Basis der Ergebnisse wurde (V) untersucht, ob die Chromosomen 5 sich bevorzugt in einer spezifischen Zellkernregion darstellen lassen. Es wurde (VI) untersucht, ob die Chromosomen 5 in den Interphasestadien eine bestimmte Form aufweisen und sich (VII) in ihrer Länge phasenspezifisch ändern. Des Weiteren wurde auf zellzyklusspezifische Änderungen der Fläche des gesamten Chromosoms 5 (VIII) und der von zwei benachbarten Chromosomenbanden auf 5q untersucht, die sich auf Metaphaseebene als eine Giemsa-helle und eine Giemsa-dunkle Bande darstellen (IX).

Für die molekularzytogenetischen Untersuchungen standen an synchronisierten HeLa-Zellen insgesamt 700 Zellkerne zur Verfügung, von denen 73 Kerne mit insgesamt 76 Chromosomen die Auswahlkriterien erfüllten und in die Untersuchungen aufgenommen werden konnten. Die Auswahlkriterien betrafen die Form des Zellkerns, die Abgrenzbarkeit der einzelnen Chromosomen voneinander und ein Minimum der Darstellbarkeit des jeweiligen Chromosoms auf dem DNA-spezifischen Falschfarbbandeniveau.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Fläche der Kerne in der G₁-Phase am größten ist, dies könnte jedoch auf einem methodischen Fehler beruhen. Das Chromosom 5 lässt sich in HeLa-Zellen in allen Phasen des Zellzyklus darstellen. Es wurde festgestellt, dass auch in den Interphasestadien sich die von Metaphasechromosomen bekannten

Zusammenfassung

Aberrationen des Chromosoms 5 bei HeLa-Zellen nachweisen lassen. Es fanden sich Hinweise für eine bevorzugt periphere bzw. peripher intermediäre Lage des Chromosoms 5 im Interphasekern. Eine ausschließlich zentrale Lage des Chromosoms 5 im dreidimensionalen Interphasekern erscheint ausgeschlossen. Durch die aus Metaphasechromosomen bekannte Falschfarbbandenabfolge konnte bei Interphasechromosomen eine ähnliche Chromosomenmorphologie festgestellt werden. Eine aus Metaphasechromosomen bekannte gestreckte Chromosomenform lag jedoch in der Regel nicht vor. Abknickungen der Chromosomen fanden sich bevorzugt zwischen den Falschfarbbanden, die die Zentromerregion flankieren und so die Anaphaseanordnung widerspiegelte. Über den Verlauf der Interphase konnte keine signifikante Änderung der Fläche der Chromosomen nachgewiesen werden. Eine interphasespezifische Veränderung der Falschfarbbanden, die in Metaphasechromosomen einer Giemsa-hellen und Giemsa-dunklen Bande entsprechen, konnte im Sinne einer Zu- oder Abnahme der Fläche nicht festgestellt werden.

Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass Chromosomen als solche zu allen Zeiten des Zellzyklus auf der DNA-Ebene metaphasechromosomen-ähnlich geformt und strukturiert sind. Sie können allgemein als Interphasechromosomen angesprochen werden. Als Konsequenz ergibt sich, dass das zur Zeit noch allgemeingültige Konzept der Chromosomenkondensation und -dekondensation kritisch hinterfragt werden muss.

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

Chevret E, Volpi EV, Sheer D: Mini review: Form and function in the human interphase chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 90:13-21 (2000)

Chudoba I, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G: High resolution multicolor-banding: a new technique of refined FISH analysis of human Chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84:156-160 (1999)

Claussen U, Mazur A, Rubtsov N: Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* 84:156-160 (1994)

Claussen U, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt U-W, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T: Demistifying chromosome preparation and the implications of the concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98:136-146 (2002)

Claussen U: Chromosomics. *Cytogenet Genome Res* 111:101-106 (2005)

Comings DE: The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus. *Am J Hum Genet* 20:440-460 (1968)

Cremer T, Cremer C: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev Genet* 2:292-301 (2001)

Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke E-K, Sperling K, Teuber V, Zorn C: Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Hum Genet* 60:46-56 (1982)

Cremer M, Kuepper K, Wagler B, Wizelman L, v.Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T: Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor nuclei. *J Cell Biol* 162(5): 809-820 (2003)

Literaturverzeichnis

Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA: Differences in the localisation and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145:1119-1131 (1999)

Dietzel S, Jauch A, Kienle D, Qu G, Holtgreve-Grz H, Eils R, Munkel C, Bittner M, Meltzer PS, Trent JM, Cremer T: Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei. *Chrom Res* 6:25-33 (1998)

Gall G, Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 63:378-381 (1969)

Guacci V, Hogan E, Koshland D: Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* 125:517-530 (1994)

Heller A, Rubtsov N, Kytola S, Karamysheva TV, Sablina OV, Degtyareva MM, Starke H, Metzke H, Claussen U, Liehr T: Highly complex karyotypic changes in acute myelogenous leukemia: a case report. *Int J Oncol* 23(1):139-143 (2003)

Hilts E, Mühlig P, Claussen U: The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76:167-171 (1997a)

Hilts E, Mühlig P, Claussen U: The nature of G-bands analysed by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 79:162-166 (1997b)

Holmquist GP: Chromosome bands, their chromatin features and their functional features. *Am J Hum Genet* 51:17-37 (1992)

Holmquist GP, Motara MA: The magic of cytogenetic technology. In Obe G and Basler A (ed): *Cytogenetics*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987

ISCN 2005, Shaffer LG, Tommerup N (ed); Karger, Basel, 2005

Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080 (2001)

Literaturverzeichnis

John HL, Birnstiel ML, Jones KW: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:912-913 (1969)

Johnson RT, Rao PN: Mammalian cell fusion. II. Induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:171-172 (1970)

Koshland D, Strunnikov A: Mitotic chromosome condensation, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305-333 (1996)

Kuechler A, Mueller CR, Liehr T, Claussen U: Detection of microdeletions in the short arm of the X-chromosome by chromosome stretching. *Cytogenet Cell Genet* 95:12-16 (2001)

Lawrence JB, Viinave CA, Singer RH: Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 52:51-61 (1988)

Lehrer H, Weise A, Michel S, Starke H, Mrasek K, Heller A, Kuechler A, Claussen U, Liehr T: The hierarchically organized splitting of chromosome bands into sub-bands analyzed by multicolor banding (MCB). *Cytogenet Genome Res* 105: 25-28 (2004)

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt U-W, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U: The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71:1051-1059 (2002)

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC: Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80:224-234 (1988)

Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U: Microdissection based high resolution multicolor banding of all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med* 9:335-339 (2002a)

Literaturverzeichnis

Liehr T, Heller A, Starke H, Claussen U: FISH banding methods: applications in research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2:217-225 (2002b)

Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Rapp AK: Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10(1):20-27 (1989)

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc natl Acad Sci USA* 83:2934-2938 (1986)

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *Int J Mol Biol* 113(1):237-251 (1977)

Saiki R-K, Gelfand DH, Stoffel G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U: Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection. *Am J Med* 53:203-218 (1986)

Saracoglu K, Brown J, Kearney L, Uhrig S, Azofeifa J, Fauth C, Speicher MR, Eils R: New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry* 44:7-15 (2001)

Schmiady H, Sperling K: Length of human prematurely condensed chromosomes during G0 and G1 phase. *Exp Cell Res* 134:461-465 (1986)

Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273:494-497 (1996)

Seabright M: a rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. II:971-972 (1971)

Literaturverzeichnis

Speicher MR, Ballard SG, Ward DS: Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genet* 12:368-375 (1996)

Sperling K: Cell cycle and chromosome cycle: morphological and functional aspects. In: Premature chromosome condensation, Rao PN, Johnson RT, Sperling K (ed), *Cell Biology*, Academic Press, New York London (1982)

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13:718-725 (1992)

Thompson MW, McInnes RR, Willard HF: *Genetics in Medicine*, Fifth Edition. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, Page 36 (1991)

Trimborn M, Bell SM, Felix C, Rashid Y, Jafri H, Griffiths PD, Neumann LM, Krebs A, Reis A, Sperling K, Neitzel H, Jackson AP: Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am J Hum Genet* 75(2):261-266 (2004)

Volpi EV, Chevret E, Jones T, Vatcheva R, Williamson J, Beck S, Campell RD, Goldsworthy M, Powis SH, Ragoussis J, Trowsdale J, Sheer D: Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 113:1565-1576 (2000)

Waldeyer W: Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32:1-22 (1888)

Walter J, Joffe B, Bolzer A, Albiez H, Benedetti PA, Mueller S, Speicher MR, Cremer T, Cremer M: Towards many colors in FISH on 3D-preserved interphase nuclei. *Cytogenet Gen Res* 114:367-378 (2006)

Literaturverzeichnis

Weise A, Starke H, Heller A, Claussen U, Liehr T: Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: A multicolor banding analysis. *Int J Mol Med* 9: 359-361 (2002)

Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T: Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) – a comprehensive one-Step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res* 103:34-39 (2003)

Yunis JJ: High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268-1270 (1976)

Yunis JJ: Mid-prophase human chromosomes: the attainment of 2000 bands. *Hum Genet* 56:293-298 (1981)

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Sperling für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu können, die Hilfe bei der Synchronisation der HeLa-Zellen und die stete Diskussionsbereitschaft sowie Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. U. Claussen danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut mit den MCB-Proben-Sets experimentieren zu dürfen.

Frau PD Dr. rer. nat. K. Kromeyer-Hauschild danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Frau Antje Gerlach, Frau Monika Ziegler und Frau Dr. Anita Heller bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Sie haben mir wesentlich bei der Erlernung der molekularzytogenetischen Techniken geholfen.

Meiner Frau Dr. med. Mareike Claussen danke ich besonders für die stete Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld.

Erklärung

Ich, Jan Claussen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Die Struktur des Chromosoms 5 im Interphasekern von HeLa-Zellen

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

20.04.2008

Jan Claussen

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eigene Publikationen

Lemke J, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Mühlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt U-W, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U: The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71:1051-1059 (2002)

Claussen, J, Claussen, N, Claussen, U: *Humangenetik Script I for medical and biological students*. Selbstverlag, Jena (1998)

Poster und Vorträge

(veröffentlicht)

Claussen, U, Lemke, J, Michel, S, Chudoba, I, Mühlig, P, Westermann, M, Claussen, J, Löffler, Ch, Rubtsov, N, Grummt, U-W: The concept of chromosome condensation and decondensation during mitosis has to be reassessed. *Med Genet* 1: 163A (1999)

Claussen, U, Lemke, J, Michel, S, Chudoba, I, Mühlig, P, Westermann, M, Claussen, J, Rubtsov, N, Grummt, U-W: The concept of chromosome condensation and decondensation during mitosis has to be replaced by the concept of chromosome regions specific swelling. *Cytogenet Cell Genet* 85: 34A (1999)

Claussen, J, Sperling, K, Lemke, J, Chudoba, I, Liehr, T, Claussen, U: Multicolor banding (MCB) pattern of human interphase chromosomes. *Medgen* 12: AS9 (2000)

Claussen, U, Sperling, K, Claussen, J, Lemke, J, Chudoba, I, Liehr, T: The multicolor banding (MCB) pattern of human chromosomes in interphase nuclei. *Europ J Hum Genet* 8, Suppl 1: 89A (2000)

Claussen, U, Lemke, J, Michel, S, Chudoba, I, Mühlig, P, Westermann, M, Claussen, J, Rubtsov, N, Grummt, U-W: The concept of chromosome condensation and decondensation during mitosis has to be reassessed. *Cell Mol Biol* 46: 37A, (2000)

Claussen, U, Lemke, J, Claussen, J, Chudoba, I, Trifonov, V, Rubtsov, N, Starke, H, Heller, A, Sperling, K, Liehr, T: Chromosomes in interphase are similar to metaphase chromosomes. *Eur J Hum Genet* 9, Suppl 1: A 144 (2001)

Claussen, U, Lemke, J, Claussen, J, Michel, S, Heller, A, Stakre, H, Trifonov, W, Rubtsov, N, Sperling, K, Liehr, T: Chromosomal bands in interphase nuclei. *Chrom. Res.* 9 suppl.1: A4 (2001)