

# 3D-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Zellkernarchitektur

## Hintergrund und Entwicklung

Die Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik (FISH) in den 1980er Jahren [45] hat der zytogenetischen Diagnostik einen nachhaltigen Impuls gegeben und eröffnete einen Weg zur Kartierung von DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen [25].

Darüber hinaus eröffnete FISH auch einen Zugang für Untersuchungen der dreidimensionalen Anordnung von Chromatin im Zellkern und leistet seitdem einen wesentlichen Beitrag zur Analyse epigenetischer Mechanismen der Genregulation. Die Epigenetik umfasst zum einen die interagierenden Ebenen der DNA-Methylierung, der Histonvarianten und -modifikationen sowie einer Reihe weiterer „chromatin remodeling“-Faktoren. Darüber steht, in einem komplexen und in vieler Hinsicht noch nicht verstandenen Zusammenspiel, als oberste Ebene die der 3D-Anordnung von Chromatin im Zellkern und der funktionellen Zellkernarchitektur insgesamt. Beides, Epigenetik und Zellkernarchitektur, kann man heute unter dem Begriff „Epigenomics“ zusammenfassen.

Die Frage, ob es eine zelltypspezifische Anordnung von Chromatin gibt, wurde bereits von Carl Rabl [33] in einer Veröffentlichung von 1885 gestellt, in welcher er für Zellen von Salamandern eine heute als Rabl-Orientierung bekannte Chromosomenanordnung beschrieb. 1909 prägte Theodor Boveri [3] den Begriff Chromosomenterritorien. Er ging – natürlich ohne über direkte Beweise zu verfügen –

davon aus, dass die Chromosomen auch während der Interphase eine individuelle Struktur behalten und distinkte Bereiche im Zellkern einnehmen. Die darauffolgenden Jahrzehnte waren eher von einer gewissen Gleichgültigkeit diesem Thema gegenüber geprägt. Das lag zum Einen an der verbreiteten Annahme, dass aufwändige Untersuchungen zur Frage spezifischer höherer Anordnungsprinzipien des Chromatins im Zellkern zu keinen prinzipiell neuen oder in funktioneller Hinsicht weiterführenden Erkenntnissen führen. Zum anderen ermöglichten erst die FISH-Technik und die Verfügbarkeit kartierter DNA-Sonden Untersuchungen zum direkten Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen und deren Anordnung im Zellkern [6, 7].

1987 schlug einer der Autoren (T. Cremer gemeinsam mit Patricia Emmerich und Peter Lichter) experimentelle Strategien zur Analyse der Zellkernarchitektur vor, mit denen durch vergleichende Untersuchungen an unterschiedlich differenzierten Zelltypen eines Organismus und durch entsprechende Untersuchungen an verschiedenen Spezies funktionelle nicht-zufällige zelltyp- oder spezies-spezifische Muster der Chromatinanordnung identifiziert werden könnten [8]. Die damals und teilweise auch heute noch offenen Fragen betrafen:

1. spezifische Anheftungsorte von Chromosomen an der Kernhülle, an den Nukleoli und weiteren Kernstrukturen („nuclear landmarks“),

2. eine spezifische Orientierung und Faltungsstruktur individueller Chromosomen im Interphasekern,
3. gerichtete Chromatinbewegungen während des Zellzyklus und während der postmitotischen Differenzierung,
4. die räumliche Anordnung transkriptionell reprimierter und hoch exprimierter Gene und
5. die relative Anordnung homologer und nichthomologer Chromosomen im Zellkern zueinander.

Mit Einführung der FISH, der Möglichkeit zur Darstellung spezifischer DNA-Segmente und der Entwicklung der konfokalen Mikroskopie zur Aufnahme von lichtoptischen Serienschritten in hoher Auflösung waren die Voraussetzungen gegeben, diese Fragestellungen mit einer adäquaten Technologie zu bearbeiten.

## Methodik, Potenzial und Limitierung der 3D-FISH

Die FISH an dreidimensional konservierten Zellkernen (3D-FISH) stellt hohe Ansprüche an die Qualität der Hybridisierungseffizienz und setzt optimal markierte DNA-Sonden voraus. Im Übrigen unterscheidet sie sich im Prinzip von einer üblichen Hybridisierung (2D-FISH) auf Metaphasechromosomen bzw. Interphasekernen nur darin, dass die dreidimensionale Struktur des Zellkerns möglichst weitgehend erhalten bleiben sollte. Die übliche Methanol-Eisessig-Fixierung von Metaphasechromosomen und Interphasekernen mit vorausgehender hypotoner

Behandlung und anschließender Lufttrocknung ist zwar zur effizienten Generierung von Hybridisierungssignalen sehr geeignet, führt aber auch zu einer massiven Abflachung und damit zu einem Verlust der Dreidimensionalität der Zellkernmorphologie sowie zu erheblichen Veränderungen der Chromatinstruktur [19]. Präparate für die 3D-FISH sollten daher grundsätzlich mit Paraformaldehyd fixiert werden, und eine Austrocknung der Präparate sollte zu jedem Zeitpunkt vermieden werden. Um eine effiziente Penetration von DNA-Sonden in einen Zellkern mit erhaltener 3D-Morphologie zu ermöglichen, müssen das Zytoplasma und die Kernmembran permeabilisiert werden. Eine effiziente Permeabilisierung von Gewebeschnitten mit ganzen Zellkernen (und damit einer Dicke  $>20 \mu\text{m}$ ) bedarf je nach Gewebe noch zusätzlicher Vorbehandlungsschritte. Für diese Techniken stehen heute erprobte Protokolle zur Verfügung [13, 29, 39].

Mit chromosomenspezifischen DNA-Sonden („chromosome painting probes“), den über DNA-Sequenz-Datenbanken genomweit erhältlichen „large-insert“-Klonen, aber auch mit den nur einige kb umfassenden Inserts von Plasmiden lassen sich beinahe unerschöpfliche Sondenkombinationen generieren. Mit Vielfarben-FISH können zudem simultan ganze Chromosomen und beliebige DNA-Abschnitte von spezifischen DNA-Segmenten differenziell visualisiert und für komplexe Untersuchungen zur Zellkernarchitektur eingesetzt werden. Die gleichzeitige Darstellung von DNA-Zielsequenzen zusammen mit Zellkernproteinen mittels Immundetektion erweitert das Spektrum solcher Fragestellungen (so genannte 3D-Immuno-FISH). Dazu gehören etwa Proteine der Kernlamina und der Nukleoli, Kernproteine („nuclear bodies“ oder „transcription factories“) oder spezifische Histonmodifikationen. Die Technik der 3D-Immuno-FISH ist allerdings methodisch anspruchsvoll, da hier zwei von den methodischen Erfordernissen her gegenläufige Ziele in einem experimentellen Ansatz kombiniert werden müssen: FISH erfordert für eine effiziente Hybridisierung die Entfernung von Proteinen, Immundetektion eine möglichst gute Erhal-

tung der für die Antikörperbindung wesentlichen Epitope.

3D-FISH-Analysen erfordern Mikroskopietechniken mit der Möglichkeit zur Aufnahme lichtoptischer Serienschritte, deren anschließende Prozessierung (Bildfilterung, Intensitätsnormalisierung, Schwellenwertsetzung eines Fluoreszenzsignals, evtl. Dekonvolution) und 3D-Bildrekonstruktion. Üblicherweise wird hierfür die konfokale Mikroskopie eingesetzt, aber auch andere Mikroskopsysteme, wie etwa Weitfeldepifluoreszenzmikroskope mit motorisiertem Z-Tisch und anschließender Dekonvolution der Bilder können benutzt werden (zur Übersicht s. [46]). Das im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie für eine 3D-Analyse weniger geeignete Verfahren der Weitfeldepifluoreszenzmikroskopie mit anschließender Dekonvolution der Aufnahmen erlaubt bei Verfügbarkeit eines entsprechenden Filtersets die simultane differenzielle Darstellung von mehr als 24 Zielsequenzen etwa nach kombinatorischer Markierung mit 5 oder mehr Fluorochromen [41]. Mittels konfokaler Mikroskopie ist die simultane Erfassung derzeit auf maximal 6 spektral separierbare Farbkanäle beschränkt [46].

Mit Hilfe quantitativer 3D-Auswertungsverfahren können Fragestellungen der Anordnung wie etwa die räumliche Assoziation von Zielsequenzen sowie deren radiale Verteilung in Hinblick auf eine bevorzugte Lokalisation am Kernrand oder im Kerninneren, Abstands- und Winkelmessungen, Form und Orientierung im Kern quantitativ bestimmt werden (zur Übersicht der methodischen Anforderungen s. [35]). Die Automatisierung solcher Prozesse erhöht den Bilddurchsatz und erleichtert eine Auswertung, die von subjektiven Einflüssen des Bearbeiters weitgehend frei ist.

Wegen der für FISH grundsätzlich notwendigen Hitzedenaturierung sind 3D-FISH-Untersuchungen nur an fixiertem Zellmaterial möglich, Versuche, Hybridisierungen an lebenden Zellen ohne Hitzedenaturierung mit Hilfe einer Triplehelikalen Formation zu erreichen, wurden zwar unternommen, haben aber unseres Wissens bislang nicht zu reproduzierbaren Protokollen geführt.

Neben der Hitzedenaturierung beeinträchtigt die für eine effiziente 3D-FISH meist notwendige Vorbehandlung der Zellen mit HCl die Integrität der intakten Zellkernstruktur. Vergleichende Untersuchungen der Chromatinarchitektur und Kernmorphologie an ein und derselben Zelle unter Lebendzellbeobachtung, nach Paraformaldehydfixierung und nach 3D-FISH zeigten einen hohen Erhaltungsgrad der topografischen Beziehungen von Chromatindomänen bis zum Größenbereich von etwa 1 Mb (entspricht einer Größenausdehnung von etwa 300 nm). Unterhalb dieser Größenordnung zerstört insbesondere die Hitzedenaturierung Feinheiten der Chromatinultrastruktur, wie anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte [38]. Die 3D-FISH-Technik scheint uns daher nicht geeignet, Aussagen zur Ultrastruktur des Chromatins unterhalb dieser Größenordnung zu machen.

## Grundprinzipien der Zellkernarchitektur

Für eine Darstellung des heutigen Kenntnisstands zu den Fragen einer funktionalen Zellkernarchitektur und aktuelle Kontroversen zur 3D-Organisation verweisen wir auf Übersichtsarbeiten [12, 15, 22, 26, 27, 28, 44].

Im Folgenden sollen einige wesentliche Erkenntnisse zur Zellkernarchitektur skizziert werden, die mittels 3D-FISH in den letzten Jahren erhalten wurden.

## Territoriale Organisation der Chromosomen im Interphasekern

In den späten 1980er Jahren gelang es erstmals, mittels FISH individuelle Chromosomen als weitgehend voneinander abgrenzbare, unregelmäßig geformte Strukturen im Interphasekern nachzuweisen (■ **Abb. 1**; [9, 24]). Die territoriale Organisation von Chromosomen in Interphasezellkernen ist heute anerkannt und der von Theodor Boveri [3] eingeführte Begriff der Chromosomenterritorien („chromosome territories“, CT) hat sich allgemein durchgesetzt. Die Frage, ob benachbarte CT klar voneinander abgegrenzt sind oder ob sich ihre Chromatinfibern zumindest in den Randbereichen teilwei-

se durchdringen („intermingling“) wird derzeit kontrovers diskutiert [1, 4, 12].

### Lokale Gendichte und nichtzufällige radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern

Viele Untersuchungen belegen eine nicht-zufällige radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern. Für diese scheint die Gendichte innerhalb eines DNA-Abschnitts von etwa 2–10 Mb ein entscheidender Parameter zu sein: Für eine Reihe von normalen Zelltypen und Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass sich genreiches Chromatin bevorzugt im Inneren des Zellkerns befindet, genarmes Material dagegen in der Kernperipherie. Diese Beobachtung ergab sich zunächst aus vergleichenden Untersuchungen der nukleären Position von Chromosomenterritorien mit unterschiedlicher Gendichte, beispielsweise der Territorien der menschlichen Chromosomen 18 (mit 5,3 Genen/Mb eines der genärmsten Chromosomen) und 19 (mit 25 Genen/Mb das genreichste menschliche Chromosom) (■ **Abb. 2A**; [10, 11, 14]). In späteren Untersuchungen wurden definierte DNA-Segmente unterschiedlicher Gendichte innerhalb bestimmter Chromosomen analysiert. Dabei konnte die gendichteabhängige radiale Anordnung von Chromatin auch auf subchromosomaler Ebene bestätigt werden (■ **Abb. 2B**; [21, 30]).

Die transkriptionelle Aktivität dagegen scheint nach unseren Beobachtungen für die globale radiale Anordnung von Chromatin im Zellkern nicht bestimmend zu sein. So konnte für einzelne hochexprimierte Genloci wie etwa den  $\beta$ -Globin-Locus in erythroblastoiden Zellen [5] oder den *NAP1L1*-Locus in Fibroblasten [21] durchaus eine periphere Position gezeigt werden. Der globale Einfluss der transkriptionellen Aktivität auf die 3D-Position im Zellkern wird von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert [16]. Ein Problem solcher Korrelationsanalysen ist, dass eine hohe Gendichte in einem Bereich über mehrere Megabasen häufig auch mit einer erhöhten Expressionsaktivität dieses Abschnitts verbunden ist und eine Trennung dieser Parameter, etwa durch die Bestimmung der zelltypspezifischen Expressionsaktivität

der durch FISH dargestellten DNA-Segmente, häufig nicht berücksichtigt wird. Ein bestimmender Einfluss der Gendichte – unabhängig von der transkriptionellen Aktivität – auf die globale Chromatinanordnung schließt jedoch die auch experimentell untermauerte Möglichkeit nicht aus, dass spezifische Gene im aktiven und inaktiven Zustand Positionsveränderungen vom Kerninneren zum Kernrand und umgekehrt einnehmen (Übersicht s. [22]). Dass auch die präferenzielle Anordnung von genreichem Chromatin in der Zellkernmitte bzw. von genarmem Material in der Kernperipherie keine absolute Notwendigkeit für die Funktion einer Zelle darstellt, zeigen unsere Befunde an Retinazellen von nachtaktiven Säugetieren, bei denen wir eine invertierte Anordnung beobachten: Hier hängt diese ungewöhnliche Anordnung des stärker kompaktierten, transkriptionell reprimierten Chromatins in der Kernmitte und dem dekontensierten transkriptionell aktiven Chromatin am Kernrand vermutlich mit einer besseren Fokussierung von einfallendem Licht auf der Retina zusammen [40].

### Hohe Variabilität der Anordnung spezifischer Chromosomenterritorien zueinander

Eine quantitative Analyse der relativen 3D-Positionen aller Chromosomen zueinander („side-by-side arrangement“) innerhalb eines Zellkerns wurde bislang nur an menschlichen Fibroblasten durchgeführt. Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Michael Speicher (damals LMU München, jetzt Universität Graz) wurden die 3D-Koordinaten der Intensitätsschwerpunkte aller 24 Chromosomen nach differenzieller kombinatorischer Markierung und 3D-FISH bestimmt (■ **Abb. 1**; [2]). Die quantitative Analyse ergab eine hohe Variabilität der Nachbarschaftsbeziehungen untereinander.

Diese an kultivierten zyklierenden Zellen gemachte Beobachtung schließt natürlich das Vorkommen nichtzufälliger Nachbarschaften in anderen Zelltypen nicht aus. Es wäre wünschenswert, entsprechende Daten auch von Stammzellen, terminal differenzierten Zellen und ihren Vorläuferzellen zu erhalten. Spezifische

## Zusammenfassung · Abstract

medgen 2008 · 20:379–385  
DOI 10.1007/s11825-008-0132-9  
© Springer Medizin Verlag 2008

M. Cremer · S. Müller · I. Solovei · T. Cremer  
**3D-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Zellkernarchitektur**

### Zusammenfassung

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an dreidimensional konservierten Zellkernen (3D-FISH) ist eine effiziente Methode für Untersuchungen zur 3D-Anordnung von Chromatin im Zellkern. Die Zellkernarchitektur stellt eine Ebene epigenetischer Mechanismen der Genregulation dar. 3D-FISH-Untersuchungen belegten eine große Variabilität in den Nachbarschaftsbeziehungen individueller Chromosomenterritorien im Zellkern. Im Gegensatz hierzu konnte eine distinkte radiale, von der Gendichte abhängige Anordnung von Chromatin gezeigt werden, die evolutionär hochkonserviert ist. Genreiches Material ist bevorzugt in der Kernmitte, genarmes in der Kernperipherie angeordnet. Die Frage einer räumlichen Assoziation kotranskriptionell exprimierter Gene (so genannte „expression hubs“) wird derzeit kontrovers diskutiert.

### Schlüsselwörter

3D-FISH · Zellkernarchitektur · Epigenetik · Chromatinanordnung · Konfokale Mikroskopie

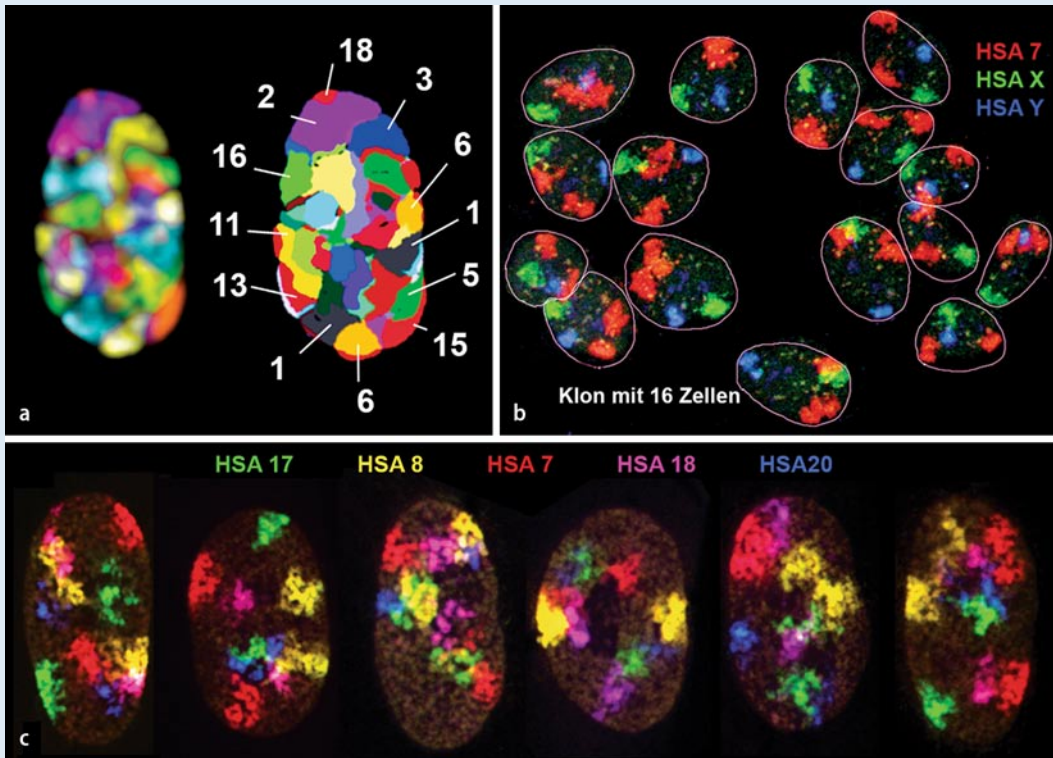
### 3D fluorescent in situ hybridization and nuclear architecture

### Abstract

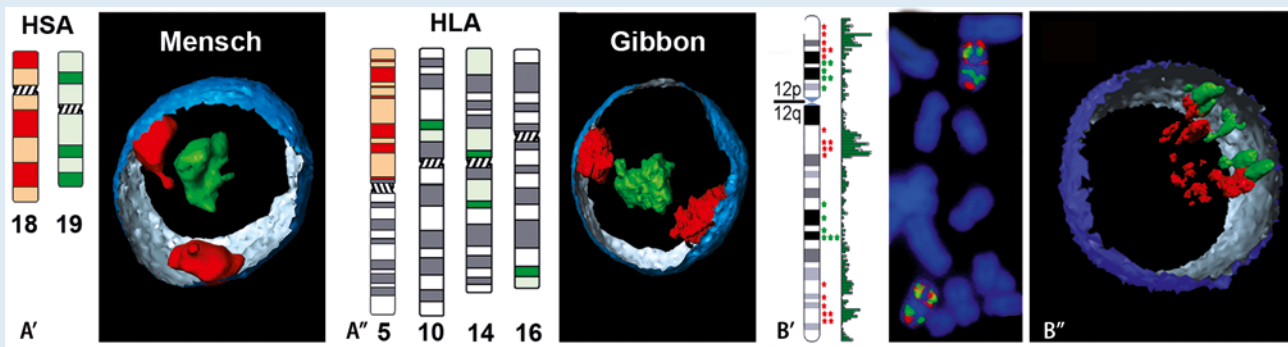
Fluorescent in situ hybridization on three-dimensionally preserved nuclei (3D-FISH) is an efficient method of analyzing higher-order arrangements of chromatin, which constitutes the highest level of epigenetic gene regulation. 3D-FISH analyses have disclosed a high variability with regard to the side-by-side arrangements of chromosome territories. In contrast, a distinct radial positioning of chromatin correlating to local gene density has been shown for a large number of cell types and has been maintained over a long period during evolution. The issue of a spatial association of cotranscriptionally expressed genes, such as the formation of “expression hubs”, is currently a matter of controversial discussion.

### Keywords

3D-FISH · Nuclear architecture · Epigenome · Chromatin arrangement · Confocal microscopy



**Abb. 1** ▲ **a** Menschlicher Fibroblastenkern mit simultaner Darstellung aller 24 Chromosomen, *linker Kern* Falschfarbendarstellung eines lichtoptischen Schnitts nach Dekonvolution, *rechts* derselbe Kern nach automatischer Klassifizierung der Farben. (Mod. nach [2]), **b** 16-Zell-Klon einer DLD-1-Zelllinie nach 3D-FISH der Territorien #7 (rot), X (grün), Y (blau) mit großer Variabilität der relativen Position der CT in den aus einer gemeinsamen Ursprungszelle hervorgegangenen Kernen, **c** 3D-Projektion von lichtoptischen konfokalen Serienschnitten von 6 menschlichen Fibroblastenkernen nach 3D-FISH mit simultaner Visualisierung der variabel geformten Territorien der Chromosomen #7, #8, #17, #18, #19, vor Fixierung 5-minütige Inkubation in hyperosmolarem Medium (570 mOsm) zur Induktion einer Hyperkondensation des Chromatins und damit auch Erweiterung des weitgehend DNA-freien Interchromatinraums [“interchromatin (IC) space“]. (Nach [1]). Dadurch strukturiertere Erscheinung der hybridisierten Territorien (vgl. **b**)



**Abb. 2** ▲ **A'** Idiogramm der menschlichen Chromosomen 18 und 19 und partielle 3D-Rekonstruktion eines menschlichen Lymphozytenkerns (*blau* Außenseite, *grau* Innenseite) mit CT 18 am Kernrand (*rot*) und CT 19 im Kernzentrum (*grün*), Territorien aufgrund zentraler Lage beider Chromosomen nicht getrennt darstellbar, **A''** Idiogramm der Gibbonchromosomen (*Hyllobates lar*) HLA5, 10, 14 und 16, mit den orthologen Sequenzen der menschlichen Chromosomen 18 (*rot*) und HSA19 (*grün*), Verteilung von Chromosom-19-homologem Material in 4 Segmenten auf 3 verschiedenen Chromosomen, *rechts* partielle 3D-Rekonstruktion eines Gibbonlymphozytenkerns, 3D-Position von Chromosom-18- und -19-orthologem Material im Gibbonkern der beim Menschen trotz der erheblichen chromosomalen Umbauten zwischen beiden Spezies verblüffend ähnlich. (Mod. nach [43]). **B'** Idiogramm des menschlichen Chromosoms 12 mit der Lokalisation von BAC-Klonen (\*), Bereiche *rot* hoher, *grün* niedriger Gendichte repräsentierend (daneben Profil der Genverteilung entlang Chromosom 12), und Metaphasechromosomen nach FISH der differenziell markierten BAC-Pools, **B''**, partielle 3D-Rekonstruktion eines menschlichen Lymphozytenkerns (*blau*) nach 3D-FISH mit denselben BAC-Pools, polare Anordnung der gendichten Segmente (*rot*) in der Kernmitte und der genarmen (*grün*) an der Kernperipherie. (Mod. nach [21])



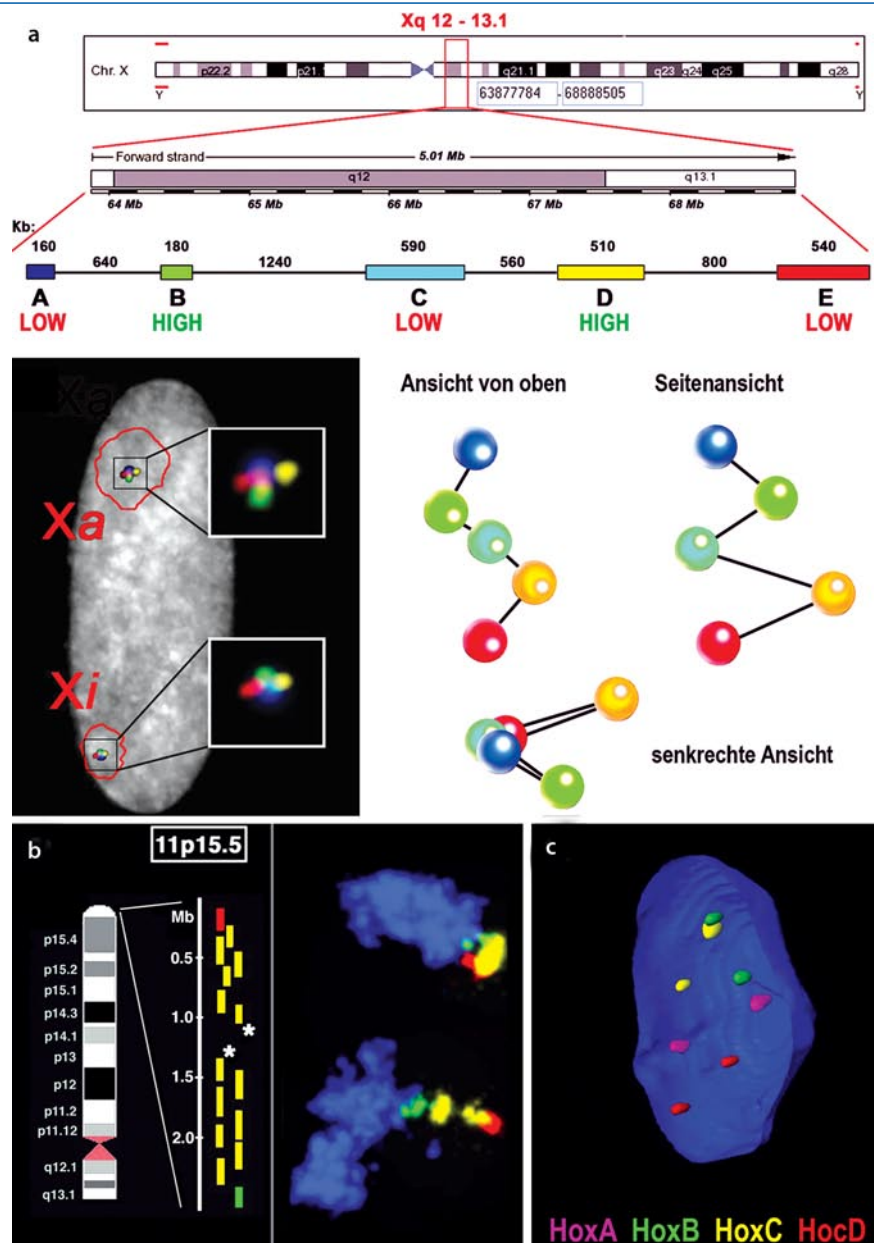
Nachbarschaften bestimmter Territorien könnten eine (Teil)erklärung dafür liefern, warum in manchen Tumoren spezifische Translokationen bevorzugt auftreten, wie beim Burkitt-Lymphom, dem in der Mehrzahl der Fälle eine Translokation t(8;14) zugrunde liegt. Für einige Zelltypen wurde in der Tat eine bevorzugte Assoziation einzelner Chromosomen beschrieben, die Datenlage hierzu ist insgesamt jedoch eher als weich zu bezeichnen [34].

### Hohe Plastizität der Faltungsstruktur von Chromosomenterritorien im Interphasekern

Die segmentale Anordnung von gen dichtem und genarmem Chromatin entlang eines Metaphasechromosoms wird in eine polare gen dichteabhängige radiale Anordnung von gen dichtem und genarmem Material innerhalb eines Chromosomenterritoriums transferiert. Dies spricht für eine hohe Plastizität von Chromatin in der Interphase im Vergleich zum Metaphasechromosom (Abb. 2B). Unterschiedliche Faltungsstrukturen und Konfigurationen konnten auch für definierte DNA-Segmente über eine Länge von einigen Megabasen mittels vielfarbig markierter BAC-Kontigs gezeigt werden (Abb. 3a). Bereiche hoher Gen dichte (und transkriptioneller Aktivität) zeigen häufiger extendierte Strukturen an der Oberfläche eines Chromosomenterritoriums als genarme Regionen gleicher physikalischer Länge. Präferenziale 3D-Konformationen für definierte Chromatinsegmente wurden kürzlich von uns beschrieben [18]. Eine strenge Regelmäßigkeit in der Faltungsstruktur für ein definiertes Chromatinsegment besteht nach unserem derzeitigen Wissen jedoch nicht (Abb. 3b; [1, 20, 21, 36]).

### Räumliche Assoziation von spezifischen Genen („gene kissing“)

Aktuell diskutiert wird die Frage, inwieweit Gene von demselben (*cis*) oder verschiedenen Chromosomen (*trans*) bei kotranskriptioneller Aktivierung Positionsveränderungen zeigen, um in einer der insgesamt etwa 200–400 „transcription factories“ eine räumliche Assoziation ein-



**Abb. 3** **a,b** Vielfarben-3D-FISH, **a** auf weiblichem Fibroblastenkern von 5 BAC-Sonden aus einer etwa 5 Mb großen Region von Xq12–13 mit hoher bzw. niedriger Expression, *oben* Schema der chromosomalen Position der verwendeten Sonden, *links* 3D-Projektion eines hybridisierten Zellkerns, *rechts* Rekonstruktion einer 3D-Konfiguration, ermittelt aus den medianen Abständen der Intensitätsschwerpunkte der einzelnen BAC-Sonden (Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Illner und B. Joffe), **b** extrem genreiche 2,3-Mb-Region von 11p15.5, *links* schematische Darstellung der verwendeten BAC-Sonden in 3 Farben, *rechts* 3D-Projektion von 2 CT 11 (*blau*) und der 11p15.5-Klone in den entsprechenden Farben, relativ kompakte Struktur der durch den BAC-Contig dargestellte Region im oberen CT, im unteren CT stärkere Dekondensation. (Mod. nach [1]). **c** 4 differenziell markierte HOX-Gene (A–D) im Kern eines frühen embryonalen Stadiums der Maus, nur zwischen einem Allel von HOX-B und HOX-C, „gene kissing“ erkennbar. (Mod. nach [23])

zugehen. Für die Annahme eines solchen „gene kissing“ sprechen einige aktuelle Publikationen (Übersicht s. [22]). Bei den durch (3D)-FISH erhobenen Daten ist bemerkenswert, dass eine Kolo-kalisation der adressierten Loci in der Regel in <30% der untersuchten Kerne gefunden wurde

(z. B. CTCF-vermittelte Assoziation von den auf verschiedenen Chromosomen liegenden Loci IgF2/H19 und Wsb1/Nfi) und dass davon meist nur ein Paar kolo-kalisierender Allele gefunden wurde. Diese Heterogenität wurde sogar in Fällen beobachtet, in denen nur Allele berücksich-

tigt wurden, deren Expressionsaktivität mittels simultaner RNA-FISH nachgewiesen wurde [42]. Diese Beobachtungen sprechen für die Annahme von probabilistischen Chromatininteraktionen. In einer eigenen Untersuchung zur Frage der Kolokalisation von 4 verschiedenen kotranskriptionell exprimierten *HOX*-Genen in embryonalem Gewebe der Maus konnten wir keine überdurchschnittlich häufige Assoziation dieser Loci beobachten (■ **Abb. 3c**; [23]).

### Evolutionäre Konservierung höherer Ordnungsstrukturen der Chromatinanordnung

Befunde einer nichtzufälligen radialen Anordnung von Chromatin konnten an einer Vielzahl phylogenetisch weit entfernter Spezies bestätigt werden, unabhängig von großen Unterschieden der Karyotypen zwischen diesen Spezies (■ **Abb. 2A**“; [31, 43]). Interessanterweise scheinen evolutionäre Inversionen in stärkerem Maß Veränderungen der Positionierung im Zellkern zur Folge zu haben als Translokationen, was neue Argumente für eine geometrische Beschränkung („geometrical constraint“) innerhalb eines Chromosomenterritoriums liefert [18]. Derzeit untersuchen wir (S. Müller und Florian Grasser) die dreidimensionale Anordnung von ultrakonservierten Sequenzen, die *cis*-regulatorische Elemente beinhalten und fanden beim Vergleich von Maus und Huhn eine verblüffend hohe Konservierung der 3D-Position dieser Sequenzen in beiden Spezies, was für eine funktionelle Relevanz der dreidimensionalen Chromatinstruktur spricht [17].

### Ausblick

Der derzeitige Stand der Forschung weist auf einen wichtigen Einfluss höherer Ordnungsstrukturen von Chromatin für eine zelltypspezifische Genregulation hin. Inwieweit die Analyse höherer Ordnungsstrukturen auch für diagnostische Zwecke relevant ist, ist heute noch nicht absehbar. Ein tieferes Verständnis der mechanistischen und funktionellen Implikationen der verschiedenen Ebenen in den Epigenomen von somatischen Zellen erfordert

die Kombination zellbiologischer, molekularzytogenetischer und molekularbiologischer Ansätze. Eine für Untersuchungen zur Zellkernarchitektur höchst interessante neue molekularbiologische Methode ist die kürzlich beschriebene 4C-Technik („chromosome conformation capture-on-chip“ [37] bzw. „circular chromosome conformation capture“ [47]). Mit dieser Methode können genomweit Sequenzen mit einer überzufällig häufigen räumlichen Assoziation zu einem bestimmten Referenzlocus im Kern identifiziert werden. Die Festlegung eines Schwellenwerts, der eine überzufällige Häufung definiert, ist dabei ebenso wenig trivial wie die Technik selbst und möglicherweise eine Ursache für die sehr unterschiedliche Häufigkeit der von den verschiedenen Arbeitsgruppen gefundenen Assoziationen. Die 4C-Methode beruht auf einer Rezirkularisation (Ligation) von DNA-Fragmenten nach Crosslinking des Chromatins durch *p*-Formaldehyd, Amplifikation zirkularisierter DNA-Fragmente mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) und anschließender Identifizierung der PCR-Produkte mittels hoch auflösender Mikroarrayanalyse (Übersicht s. [32]). Der territorialen Organisation von Chromosomen entsprechend betrifft erwartungsgemäß die große Mehrzahl der durch 4C gefundenen Assoziationen *cis*-Interaktionen innerhalb eines Bereichs von <10 Mb. Interessanterweise wurden darüber hinaus, insbesondere von Zhao et al. [47], abhängig vom Zelltyp eine Vielzahl von spezifischen *cis*-Interaktionen über Distanzen >20 Mb sowie spezifische Assoziationen in *trans* gefunden. Diese Assoziationen sind nicht ohne weiteres mit der von uns postulierten hohen Variabilität der chromosomalen Nachbarschaften und einer begrenzten Mobilität von Chromatin vereinbar. Es wird deshalb spannend, die mittels 4C gefundenen Assoziationen, die auf der Mittelung einer großen Anzahl von Zellen (>10 Mio.) beruhen, mit den entsprechenden 3D-Distanzmessungen nach FISH zu vergleichen, die eine Verteilung von Distanzen in *einzelnen* individuellen Zellen ermöglichen. Die mikroskopische Analyse von Einzelzellen ist somit nach wie vor ein großes Potenzial der FISH-Technik.

### Korrespondenzadresse

**Dr. M. Cremer**

Anthropologie und Humangenetik, Biozentrum, Ludwigs-Maximilians-Universität München, Großhadernerstraße 2, 82152 München  
Marion.Cremer@lrz.uni-muenchen.de

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

### Literatur

1. Albiez H, Cremer M, Tiberi C et al. (2006) Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res* 14: 707–733
2. Bolzer A, Kreth G, Solovei I et al. (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3: e157
3. Boveri T (1909) Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* 3: 181–268
4. Branco MR, Pombo A (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol* 4: e138
5. Brown JM, Leach J, Reittie JE et al. (2006) Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J Cell Biol* 172: 177–187
6. Cremer T, Cremer C (2006) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem* 50: 161–176
7. Cremer T, Cremer C (2006) Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem* 50: 223–272
8. Cremer T, Emmerich P, Lichter P (1987) Gibt es eine zelltypspezifische Anordnung des Chromatins in Säugerzellkernen? Argumente von Ungläubigen, Agnostikern und Gäubigen. *Ann Univ Sarav Med [Suppl]* 7: 67–71
9. Cremer T, Lichter P, Borden J et al. (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet* 80: 235–246
10. Cremer M, Hase J von, Volm T et al. (2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* 9: 541–567
11. Cremer M, Kupper K, Wagler B et al. (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162: 809–820
12. Cremer T, Cremer M, Dietzel S et al. (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18: 307–316
13. Cremer M, Müller S, Köhler D et al. (2007) Cell preparation and multicolor FISH in 3D preserved cultured mammalian cells. *CSH Protocols* doi:10.1101/pdb.prot4723
14. Croft JA, Bridger JM, Boyle S et al. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145: 1119–1131

15. Foster HA, Bridger JM (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Genome organisation and nuclear architecture. Chromosoma* 114: 212–229
16. Goetze S, Mateos-Langerak J, Gierman HJ et al. (2007) The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol Cell Biol* 27: 4475–4487
17. Grasser F, Witt V, Lanctot C et al. (2007) Nuclear topology of trans-dev genes and flanking ultra-conserved non-coding sequence clusters in mouse and chicken development. *Chromosome Res* 15: 67
18. Grasser F, Neusser M, Fiegler H et al. (2008) Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei. *J Cell Sci* 121: 1876–1886
19. Hepperger C, Otten S, Hase J von et al. (2007) Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments. *Chromosoma* 116: 117–133
20. Jhunjhunwala S, Zelm MC van, Peak MM et al. (2008) The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* 133: 265–279
21. Kupper K, Kolbl A, Biener D et al. (2007) Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116: 285–306
22. Lanctot C, Cheutin T, Cremer M et al. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* 8: 104–115
23. Lanctot C, Kaspar C, Cremer T (2007) Positioning of the mouse *Hox* gene clusters in the nuclei of developing embryos and differentiating embryoid bodies. *Exp Cell Res* 313: 1449–1459
24. Lichter P, Cremer T, Borden J et al. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224–234
25. Lichter P, Tang CJ, Call K et al. (1990) High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247: 64–69
26. Mateos-Langerak J, Goetze S, Leonhardt H et al. (2007) Nuclear architecture: is it important for genome function and can we prove it? *J Cell Biochem* 102: 1067–1075
27. Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E (2007) Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* 17: 80–90
28. Misteli T (2007) Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128: 787–800
29. Müller S, Neusser M, Köhler D et al. (2007) Preparation of complex DNA probe sets for 3D FISH with up to six different fluorochromes. *CSH Protocols* doi:10.1101/pdb.prot4730
30. Murmann AE, Gao J, Encinosa M et al. (2005) Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus. *Exp Cell Res* 311: 14–26
31. Neusser M, Schubel V, Koch A et al. (2007) Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates. *Chromosoma* 116: 307–320
32. Ohlsson R, Gondor A (2007) The 4C technique: the ‚Rosetta stone‘ for genome biology in 3D? *Curr Opin Cell Biol* 19: 321–325
33. Rabl C (1885) Über Zelltheilung. *Morph Jb* 10: 214–330
34. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ et al. (2003) Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34: 287–291
35. Ronneberger O, Baddeley D, Scheipl F et al. (2008) Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls. *Chromosome Res* 16: 523–562
36. Shopland LS, Lynch CR, Peterson KA et al. (2006) Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol* 174: 27–38
37. Simonis M, Klous P, Splinter E et al. (2006) Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat Genet* 38: 1348–1354
38. Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L et al. (2002) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* 276: 10–23
39. Solovei I, Grasser F, Lanctot C (2007) FISH on histological sections. *CSH Protocols* doi:10.1101/pdb.prot4729
40. Solovei I, Lanctot C, Kösem S et al. (2007b) Adaptive evolution of nuclear architecture: unique organization of rod photoreceptor cell nuclei in nocturnal mammals. *Chromosome Res* 15: 12–13
41. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368–375
42. Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T et al. (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435: 637–645
43. Tanabe H, Muller S, Neusser M et al. (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4424–4429
44. Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI (2008) Nuclear functions in space and time: gene expression in a dynamic, constrained environment. *FEBS Lett* 582: 1960–1970
45. Ploeg M van der (2000) Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *Eur J Histochem* 44: 7–42
46. Walter J, Joffe B, Bolzer A et al. (2006) Towards many colors in FISH on 3D-preserved interphase nuclei. *Cytogenet Genome Res* 114: 367–378
47. Zhao Z, Tavosoidana G, Sjolinder M et al. (2006) Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 38: 1341–1347

## Neues Modell, um Nierenerkrankheiten besser zu verstehen

Viele Nierenerkrankungen wie Zystenniere, Nierenfibrose oder das Nierenzellkarzinom sind charakterisiert durch eine Überproduktion oder durch den Ausfall charakteristischer Proteine in den Nierenzellen. Heidelberger Wissenschaftler entwickelten nun ein Tiermodell, um die Entstehung schwerer Nierenerkrankungen besser zu untersuchen.

Die Forscher fügten in das Erbgut von Mäusen ein genetisches Schaltelement ein, über das die Produktion krankheitstypischer Proteine ausschließlich im Nierengewebe an- oder abgeschaltet werden kann. Ausgelöst wird dieser Schalter einfach durch den Zusatz des Antibiotikums Tetracyclin im Futter der Tiere.

Um zu prüfen, ob sich die Entstehung von Nierenerkrankungen an den genveränderten Tieren untersuchen lässt, wurde im Nierengewebe der Mäuse die Produktion von c-Myc aktiviert. Bei zahlreichen Tumoren ist ein erhöhter Spiegel dieses Transkriptionsfaktors beschrieben. Bereits kurze Zeit nach Aktivierung des c-Myc-Gens entwickelten die Tiere Zysten, die zum Versagen der Organe führten. Bei einigen Mäusen entdeckten die Pathologen auch Nierenzellkarzinome. Als Reaktion auf die Überexpression eines anderen Signalmoleküls entwickelten die Mäuse Nierenfibrosen.

Bislang scheiterten Untersuchungen der Krankheitsentstehung an genveränderten Tieren häufig daran, dass die zu untersuchenden Proteine bereits im Mäuseembryo überproduziert werden. Dadurch kommt es oft zu schweren Missbildungen der Tiere, die sinnvolle Aussagen unmöglich machen. Besonders vorteilhaft an diesem Modell ist es, dass die krankheitstypischen Proteine in der Niere zu jedem beliebigen Zeitpunkt an- oder abgeschaltet werden können. Die Ergebnisse wurden nun in „Nature medicine“ publiziert (Traykova-Brauch M., Schönig K., Greiner O. et al (2008) An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nature medicine*, PubMed ahead of print

Quelle: Deutsches Krebsforschungszentrum, [www.dkfz.de](http://www.dkfz.de)