

Genspezifische Koppelung
der Interleukin 8-Transkription
mit der Zellgröße
im Interleukin-1 Signalweg

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
des Fachbereichs Medizin

Vorgelegt von
Axhausen, Franziska Maria Ursula
aus Henstedt-Ulzburg

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-
Universität Gießen,
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht
Gutachter: Prof. Dr. Hagen Huttner, PhD

Tag der Disputation: 11.03.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Bedeutung von Epithelien und Zytokinen für die Immunreaktion.....	1
1.2	Bei der Entstehung von Neoplasien wirkt der Entzündungsmediator IL-1 ambivalent	2
1.3	Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren durch IL-1	2
1.3.1	Rezeptornahe und zytoplasmatische Signalkaskade.....	2
1.3.2	Aktivierung von <i>nuclear factor-κB</i> (NF- κ B).....	3
1.3.3	Aktivierung von <i>activator protein 1</i> (AP-1)	3
1.4	Wirkung induzierter Transkriptionsfaktoren im Zellkern.....	4
1.4.1	Organisation des Zellkerns und Regulation seiner Größe	4
1.4.2	Organisation der DNA	7
1.4.3	Lokale Wirkung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern	8
1.4.4	Globale Regulation der Chromatinorganisation im Zusammenhang mit Transkription	10
1.4.4.1	Radiale Position der CTs und kleinerer Chromatinabschnitte	10
1.4.4.2	Positionen einzelner Geneloci im nukleären Raum zueinander	12
1.4.4.3	Gene repositioning in malignen Tumoren als möglicher Ansatzpunkt für die Diagnosestellung	13
1.5	Regulation von Genpositionen und Kerngrößen im IL-1-Signalweg	13
1.6	Fragestellung dieser Arbeit und Vorgehensweise	14
2	Material.....	15
2.1	Verbrauchsmaterial.....	15
2.2	Geräte	15
2.3	Chemikalien, Lösungsmittel, Gebrauchsfertige Reagenzien, Materialien und Kits.....	15
2.4	Antikörper.....	16
2.5	RNA-FISH Sonden	16
2.6	Medien und Zusätze	17
2.7	humane Telomerase Immortalisierte Retinale Pigmentierte Epithelzellen Typ 1 (hTERT-RPE-1).....	17
3	Methoden	17
3.1	Zellkultur.....	17
3.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen	17
3.1.2	Aussaat von Zellen.....	18
3.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	18
3.1.4	Behandlung der Zellen mit Leptomycin B	18
3.1.5	Behandlung der Zellen mit IL-1	18
3.2	Zellbiologische Techniken	18
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz	18
3.2.2	RNA-Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	19
3.2.3	Immuno-RNA-FISH	20
3.3	Computergestützte Analyse der Immunfluoreszenz- und RNA-FISH-Experimente mit Icy Bioimaging Software.....	20
3.3.1	Definition der Zellgrenzen	20
3.3.2	Definition der Zellkerngrenzen	21
3.3.3	Erfassung der mRNA-Menge pro Zelle und Kern.....	23
3.3.4	Erfassung der prä-mRNA-Signale und Berechnung intranukleärer Distanzen.....	24
3.3.5	Erfassung der Kolokalisationen von prä-mRNA und mRNA	27
3.3.6	Berechnungen zusätzlicher Parameter.....	28
3.4	Computergestützte Analyse der 3D RNA-FISH Experimente mit der LASX-Software von Leica	29
3.5	Statistische Auswertung mittel Graph Pad Prism Software	35
4	Ergebnisse	37
4.1	Validierung der Methodik zur Messung von Kerngrößen.....	37
4.2	Änderungen der Zellmorphologie und des Zellkernes als Reaktion auf den Entzündungsreiz IL-1 α	39

4.3	Reaktion von hTERT-RPE-1 Zellen auf IL-1 α	44
4.3.1	Translokation von p65 in den Zellkern.....	44
4.3.2	Untersuchung aktiver Transkriptionsorte in Interleukin-stimulierten hTERT-RPE1-Zellen.....	45
4.3.3	mRNA-Expression auf Einzelzellebene	50
4.4	Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivität und dem Vorkommen aktiver Transkriptionsstellen.....	52
4.5	Räumliche Regulation von aktiven Transkriptionsorten für die IL-1-Zielgene <i>IL8</i> , <i>CXCL2</i> und <i>IL6</i>	55
4.5.1	Radiale Position von aktiven Transkriptionsorten.....	55
4.5.2	Interalleliche Distanzen zwischen Transkriptionsorten in Zellen mit biallelischer Genexpression	59
4.5.3	Interchromosomale Distanzen zwischen Transkriptionsorten auf den Chromosomen 7 und 4	62
4.6	Phänotyp von Zelle und Zellkern im Zusammenhang mit der Reaktion der einzelnen Zellen auf IL-1 α	63
4.6.1	Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit dem Ausmaß der p65 Translokation in den Zellkern	63
4.6.2	Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität der Zelle	65
4.6.3	Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Anzahl der aktiven Gene in einer Zelle	72
4.6.4	Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Position aktiver Gene im Zellkern	73
4.7	Validierung der gewonnenen Erkenntnisse in 2D Immuno-RNA-FISH und 3D RNA-FISH.....	74
4.7.1	Validierung der Ergebnisse mittels 2D Immuno-RNA-FISH.....	74
4.7.2	Validierung der Ergebnisse mittels 3D RNA-FISH	80
5	Diskussion.....	89
5.1	Heterogene Regulation der Kern- und Zellgröße durch einen Entzündungsreiz	89
5.2	Die Transkription von Chemokin- und Interleukingenen ist durch IL-1 schnell und stark induzierbar	91
5.3	<i>Gene repositioning</i> nach einem Entzündungsreiz	93
5.3.1	Fehlende zeitabhängige Änderung der radialen Position von durch IL-1 aktivierte Genloci	93
5.3.2	Fehlende Änderung interchromosomaler Distanzen von IL-1-aktivierten Genloci	94
5.3.3	Möglichkeiten zur Optimierung der Untersuchung radialer Positionen und interchromosomaler Distanzen auf Einzelzellebene 95	
5.4	Die IL-1-induzierte Transkription von <i>IL8</i> und <i>IL6</i> in isogenen hTERT-RPE-1 Zellen ist heterogen	96
5.5	Koppelung von Zellgröße und IL-1-induzierter mRNA-Transkription	98
6	Zusammenfassung	101
7	Summary	101
8	Abkürzungsverzeichnis	102
9	Abbildungsverzeichnis	103
10	Tabellenverzeichnis.....	104
11	Literaturverzeichnis	104
12	Anhang	115
12.1	hTERT-RPE1-Zellen Phänotyp nach IL-1 Behandlung ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung	115
12.2	Validierung der Auswertungsparameter für die mRNA-Menge pro Zelle in der 2D RNA-FISH	116
12.3	Darstellung der Häufigkeitsverteilung intranukleärer Distanzen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung	117
12.4	Die Kerngröße, Zellgröße und das K-/Z-Verhältnis der Gesamtpopulation erfasst anhand Hoechst in RNA-FISH.....	118
12.5	<i>CXCL2</i> mRNA-Menge und die Kernfläche gemessen in Immuno-RNA-FISH	119
12.6	Herleitung der Fluoreszenzgrenzen Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen in 3D RNA-FISH	120
12.7	Quantifizierung aktiver Genloci für <i>IL8</i> und <i>IL6</i> in 3D RNA-FISH	120
12.8	Untersuchung der Distanzen aktiver Genloci zueinander und zum Kernzentrum im dreidimensionalen Raum	121
12.9	Übersicht über die Ergebnisse der Messung der Kerngröße mittels verschiedener Methoden.....	122
13	Publikationsverzeichnis	123
14	Ehrenwörtliche Erklärung	124
15	Danksagung	125
16	Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Epithelien und Zytokinen für die Immunreaktion

Der menschliche Organismus ist vielen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die zu Zellschäden führen können. Das Immunsystem hat die Funktion, solche Noxen zu erkennen, ihre Ausbreitung durch die Auslösung einer Entzündungsreaktion zu verhindern und einen Heilungsprozess zu koordinieren. Eine Entzündung involviert fast immer die Migration von zellulären Bestandteilen des Immunsystems aus dem Blut zum Ort der Noxe. Dabei spielen auch lokale nicht-Immunzellen eine wichtige Rolle. Da Epithelzellen die Oberflächen und Grenzen der meisten Organe bilden, haben sie häufig als erstes Kontakt zu potenziell schädlichen Umwelteinflüssen. Auf verschiedene Stimuli hin synthetisieren und sezernieren Epithelzellen eine Reihe unterschiedlicher Zytokine. Diese beeinflussen als Mediatorproteine die Genexpression des umliegenden Gewebes, der sezernierenden Zelle selbst und von ortsständigen (zum Beispiel (z.B.) gewebsspezifischen Makrophagen) und infiltrierenden Immunzellen (z.B. Granulozyten, Leukozyten), und können auf diese Weise eine Entzündungsreaktion einleiten und verstärken bzw. modulieren können (Nowarski et al. 2017).

Zytokine sind Polypeptide, welche anhand ihrer Funktion und der Art ihrer Rezeptoren in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Drei dieser Gruppen sind für die Immunreaktion von besonderer Bedeutung: Interferone, wie zum Beispiel Interferon β (INF β), sind vor allem an der Regulation der Immunabwehr von Virusinfektionen und an der Apoptose beteiligt und wirken wachstumshemmend. Chemokine, wie zum Beispiel Interleukin 8 (IL8) und *C-X-C motif ligand 2* (CXCL2) vermitteln unter anderem die Chemotaxis von Immunzellen zum Entzündungsort (Hughes und Nibbs 2018). Interleukine, zu der auch die Familie der Interleukine 1 (IL-1) gehört, regulieren die Immunabwehr insgesamt, aber auch die Hämatopoese und die Apoptose (Biochemie und Pathobiochemie 2006). Die 11 Proteine der Interleukin 1-Familie sind endogene Alarmmediatoren, die die Integrität von Barrieren und die Gesundheit der Zellen überwachen (Boraschi et al. 2018). Als erstes wurden die Mitglieder der Interleukin 1-Familie Interleukin 1 alpha (IL-1 α) und Interleukin 1 beta (IL-1 β) entdeckt. IL-1 α und IL-1 β unterscheiden sich vor allem im Expressionsmuster und der Sekretionsart:

Die Expression von IL-1 α erfolgt in mesenchymalen Zellen konstitutiv und in myeloiden Zellen nach Induktion durch verschiedene Stimuli. Die Vorstufe von IL-1 α ist bereits in der Lage den IL-1-Rezeptor zu aktivieren. Sie liegt in mesenchymalen Zellen intrazellulär vor, wird bei einer Zellnekrose freigesetzt und wirkt dann als DAMP (Mantovani et al. 2019). Weiterhin kommt IL-1 α membranständig vor und wirkt juxta- und autokrin. (Weber et al. 2010; Boraschi et al. 2018).

IL-1 β wird hauptsächlich von myeloiden Zellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, in Folge einer Bindung von *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) oder *damage or danger associated molecular patterns* (DAMPs) an *pattern recognition receptors* aus einer inaktiven Vorstufe gebildet und freigesetzt (Mantovani et al. 2019), und wirkt parakrin und systemisch (Weber et al. 2010).

IL-1 α und IL-1 β vermitteln durch die Bindung an den ubiquitär vorhandenen IL-1-Rezeptor im Allgemeinen eine weitgehend vergleichbare biologische Wirkung. Diese besteht in der Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade, an deren Ende die Änderung der Transkription von mehreren hundert Genen steht. Zu diesen gehören die Gene *IL1 α* und *IL1 β* selbst, sowie die Chemokingene *IL8* und *CXCL2* und das Interleukin 6 codierende Gen (Weber et al. 2010). Durch die Änderung des Transkriptoms der Zellen kommt es zu einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, was gemeinsam mit einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen zu einer Invasion von Immunzellen im Bereich der Noxe kommt. Die Aktivierung der Cyclooxygenase 2, der Phospholipase A2 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase führen zu Fieber und Vasodilatation. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Differenzierung myeloider Progenitorzellen im Knochenmark, zur Stimulation von T-Zellen und zur Induktion der Differenzierung von T-Helfer-17-Zellen (Dinarello 2009; Mantovani et al. 2019; Garlanda und Mantovani 2021).

Eine besondere Herausforderung für das Immunsystem ist die exakte Regulation der Immunantwort auf einen Stimulus, um eine potentielle Noxe ausreichend zu eliminieren ohne dabei das umliegende Gewebe zu schädigen (Nowarski et al. 2017). Im Sinne dieser Regulation ist die Genexpression proinflammatorischer Gene in unstimulierten Zellen balanciert oder reprimiert, und kann auf einen Stimulus hin in sehr kurzer Zeit stark induziert werden. Für dieses Expressionsmuster sorgen zwei Mechanismen: auf der einen Seite die Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren und auf der anderen Seite die Modulierung der Chromatinstruktur durch genregulierende Elemente (Bhatt und Ghosh 2014). Wie diese beiden Mechanismen zu einer Reaktion auf den Stimulus IL-1 führen, wird in den Kapiteln 1.3. und 1.4. modellhaft skizziert. Zusätzlich begrenzen zahlreiche negative *feedback loops* die Entzündungsreaktion (Weber et al. 2010).

1.2 Bei der Entstehung von Neoplasien wirkt der Entzündungsmediator IL-1 ambivalent

Eine Fehlregulation des IL-1-*signalings* kann zur Entstehung von Krankheiten wie neurodegenerativen Erkrankungen, Atherosklerose, Autoimmunerkrankungen oder Malignomen beitragen (Mantovani et al. 2019). In der Pathogenese von Malignomen spielt Interleukin 1 eine ambivalente Rolle (Malik und Kanneganti 2018). Einerseits wirkt Interleukin 1 anti-onkogen, da das Zytokin zur Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen in die Tumorumgebung führt. Auch trägt IL-1 zur Migration von tumorantigenpräsentierenden Zellen in die Lymphknoten bei, wo eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunreaktion gegen die Tumorzellen ausgelöst wird (Malik und Kanneganti 2018). Andererseits zeigt die Aktivierung des IL-1-Signalwegs pro-onkogene Folgen: zum Beispiel erhöht das Zytokin die Myelopoese (Pietras et al. 2016) und die Akkumulation von *tumor associated macrophages* und *myeloid derived suppressor cells* in der Tumormikroumgebung (Lechner et al. 2011). Diese Zellen unterdrücken gemeinsam mit regulierenden T-Zellen die Aktivierung der anti-onkogen wirkenden Immunzellen und tragen zu Angiogenese und Metastasierung bei (Malik und Kanneganti 2018). Des Weiteren erhöht IL-1 die Expression von Genen, die mit Stammzeleigenschaften einhergehen und deren Aktivierung zur Entwicklung von Tumorzellen und zur Epithelial-Mesenchymalen-Transition beiträgt (Li et al. 2012; Malik und Kanneganti 2018). An Endothelzellen bewirkt IL-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen (Mantovani et al. 1992), was ebenfalls die Angiogenese und Metastasierung erhöht (Mantovani et al. 2018). Besonders ist, dass IL-1 α und IL-1 β aufgrund ihrer unterschiedlicher Expressionsmuster und Sekretionsarten im Tumorgewebe unterschiedliche Wirkungen zu erzielen scheinen: während membranständiges IL-1 α immunstimulatorisch wirkt, scheint sezerniertes IL-1 β in der Tumormikroumgebung proentzündlich zu wirken und die Onkogenese, sowie die Invasivität und die Suppression des Immunsystems zu erhöhen (Mansouri et al. 2022).

Das bessere Verständnis des Einflusses von Entzündungsmediatoren auf die Karzinogenese ist ein wichtiger Schritt zur Entwicklung von Ansatzpunkten für eine zielgerichtete Krebstherapie. Eine selektive Stimulation der anti-onkogen wirkenden Aspekte des IL-1 Signalwegs bei gleichzeitiger Inhibition antagonistisch wirkender Effekte könnte maßgeblich zur Etablierung einer effizienten und nebenwirkungsarmen Therapie beitragen. Hierin besteht ein Ziel der Untersuchung der Feinregulation des IL-1-Signalwegs (Mantovani et al. 2019).

1.3 Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren durch IL-1

Der IL-1-Signalweg lässt sich grob in 3 Schritte gliedern: ersten die Aktivierung induzierbarer Transkriptionsfaktoren über eine zytosplasmatische Signalkaskade nach Bindung von IL-1 an spezifische Rezeptoren (modellhaft dargestellt in Abb. 1). Zweitens die Wirkung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern mit transkriptioneller Aktivierung der Zielgene. Drittens die Translation der IL-1-Zielproteine (Priester et al. 2022). Die genauere Beschreibung der bisherigen Erkenntnisse über den IL-1-Signalweg erfolgt in diesem Kapitel und in Kapitel 1.4.

1.3.1 Rezeptornahe und zytoplasmatische Signalkaskade

IL-1 α und IL-1 β binden beide an den extrazellulären Anteil des *IL1-receptor type 1* (IL-1-R1) (Bird et al. 1988). Die Rezeptorbindung führt zu einer Konformationsänderung des IL-1-R1, welche die Bindung des akzessorischen Proteins *IL1-receptor type 3* (IL-1-R3) an IL-1-R1 ermöglicht (Wesche et al. 1997a; Vigers et al. 1997). Auf diese Weise werden die intrazellulären Toll- und IL-1-*like* (TIR)-Domänen von IL-1-R1 und IL-1-R3 aneinander angenähert, was wiederum die Bindung von *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) an den Rezeptorkomplex erlaubt (Wesche et al. 1997b). MyD88-Oligomere dienen als Adapterproteine, welche die Gruppe der *IL-1-receptor-associated kinases* (IRAKs) rekrutieren. Dabei wird vermutet, dass zunächst mehrere IRAK-4 Moleküle über sogenannte *death domains* an rezeptorgebundenes MyD88 binden, und als Adapterproteine die Oligomerisierung von IRAK-1 und -2 an den Rezeptorkomplex ermöglichen (Lin et al. 2010; Motshwene et al. 2009). Eine durch Oligomerisierung von IRAK-4 ausgelöste Autophosphorylierung von IRAK-4 führt zur enzymatischen Aktivierung von IRAK-4 (Ferrao et al. 2014; Cushing et al. 2014). Daraufhin phosphorylieren aktivierte IRAK-4 IRAK-1 und -2 und leiten damit deren vollständige enzymatische Aktivierung ein (Burns et al. 2000; Li et al. 2002). Die Phosphorylierung von IRAK-1 und -2 führt zur Destabilisierung des entstandenen Rezeptorkomplexes, woraufhin aktivierte IRAK-1 und -2-Oligomere aus dem Komplex dissoziieren (Boraschi et al. 2018).

Aktivierte IRAK-1 beziehungsweise (bzw.) -2-Oligomere rekrutieren die E3-Ubiquitin-Ligase *tumor necrosis factor-associated factor 6* (TRAF-6) (Ye et al. 2002), sodass sich TRAF-6-Oligomere bilden (Yin et al. 2009). Die Oligomerisierung von TRAF-6 erhöht dessen Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Baud et al. 1999), was für die anschließende Aktivierung der *transforming growth factor-beta* (TGF β)-*activated kinase 1* (TAK-1) eine wichtige Rolle spielt.

TAK-1 gehört zur Familie der *mitogen activated protein kinase kinase kinases* (MAP-KKKs). In ruhenden Zellen ist TAK-1 im Zytosol an die *TAK-1-binding proteins 1, 2 und 3* (TAB-1, TAB-2 und TAB-3) gebunden und inaktiv (Cheung et al. 2004). Oligomerisiertes TRAF-6 fügt Lysin-63-gebundene Ubiquitinketten an TAB-2 und TAB-3 an (Kanayama et al. 2004), was zu einer Konformationsänderung von TAB-2 und

TAB-3 führt, wonach die Autophosphorylierung von TAK-1 möglich wird (Xia et al. 2009). TAK-1 dient als Integrator verschiedener Signalwege und leitet den nächsten Schritt des IL-1-Signalwegs, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor-κB* (NF-κB) und *activator protein 1* (AP-1), ein (Hirata et al. 2017; Weber et al. 2010). Die Phosphorylierung von TAK-1 ist ein zentraler Schritt im IL-1-Signalweg, da dessen Aktivierung für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 obligat ist (Jurida et al. 2015; Sato et al. 2005).

1.3.2 Aktivierung von *nuclear factor-κB* (NF-κB)

Als nächster Schritt im IL-1-Signalweg erfolgt die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie. Diese spielen eine zentrale Rolle in der Vermittlung proinflammatorischer Reaktionen. Die Familie des *nuclear factor-κB* (NF-κB) ist eine der ze besteht aus den fünf Proteinen: p65 (RelA), p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), c-Rel und RelB. Diese Proteine bilden Hetero- und Homodimere und wirken als Transkriptionsfaktoren (Hayden und Ghosh 2004). Alle Mitglieder der NF-κB-Familie besitzen eine N-terminale *Rel homology domain* (RHD), welche ihre Dimerisierung sowie die sequenzspezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an die nukleäre Desoxyribonukleinsäure (DNA) vermittelt (Hayden und Ghosh 2004). Die RHD enthält weiterhin eine *nuclear localization sequence* (NLS), durch die NF-κB-Dimere in den Zellkern translozieren können (Hayden und Ghosh 2004). p65, c-Rel und RelB enthalten *transactivation domains*, welche die Transkription aktivieren. p50 und p52 hingegen enthalten solche Domänen nicht und scheinen als Bindungspartner für p65, c-Rel und RelB zu dienen oder in Form von Homodimeren repressiv auf die Transkription zu wirken (Hayden und Ghosh 2004). Es konnte gezeigt werden, dass auf der einen Seite eine gewisse Redundanz zwischen den verschiedenen Proteinen besteht, sie auf der anderen Seite aber auch spezifische Funktionen erfüllen (Häcker und Karin 2006).

Das häufigste NF-κB-Dimer setzt sich aus p65 und p50 zusammen (Mitchell et al. 2016). Die Aktivierung von NF-κB kann stimulusabhängig über einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Weg erfolgen. IL-1 aktiviert den kanonischen Weg, welcher hier beschrieben werden soll (Mitchell et al. 2016). In ruhenden Zellen sind die meisten p65:p50-Dimere an den *inhibitor of nuclear factor κB* (IκB) gebunden. IκB maskiert die NLS von p65 und hält die Dimere dadurch im Zytoplasma (Hayden und Ghosh 2004).

Der wichtigste Schritt für die kanonische Aktivierung der NF-κB-Proteine ist die Phosphorylierung von IκB durch den *IκB kinase* (IKK)-Komplex (Traenckner et al. 1995). Diese führt zur Lysin-48-Polyubiquitinierung und dem anschließenden proteasomalen Abbau von IκB (Chen et al. 1995; Karin und Ben-Neriah 2000). Der IKK-Komplex besteht aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK-1 und IKK-2, sowie der regulatorischen Untereinheit NF-κB *essential modifier* (NEMO) (Karin und Ben-Neriah 2000). Im kanonischen Weg erfolgt die Aktivierung des IKK-Komplexes durch NEMO: NEMO bindet über Methionin-1-gebundene Ubiquitinketten an die Lysin-63-gebundenen Ubiquitinketten von TAB-2 oder TAB-3. Dies führt zur Annäherung des IKK-Komplexes an TAK-1, sodass die Phosphorylierung von IKK durch TAK-1 erleichtert wird. Nach dieser Phosphorylierung phosphorylieren sich die IKK selbst, erreichen damit ihre vollständige katalytische Aktivität und phosphorylieren IκB (Zhang et al. 2014).

Sobald IκB abgebaut wurde, können die p65:p50-Dimere in den Zellkern translozieren und an sogenannte κB-sites der DNA binden, wo sie als Transkriptionsfaktoren wirken (Bhatt und Ghosh 2014). Die typischen κB-sites weisen die Sequenz 5'-GGGAATTTCC-3' auf (Hu et al. 2010).

1.3.3 Aktivierung von *activator protein 1* (AP-1)

Weiterhin führt die Aktivierung von TAK-1 über die Aktivierung von *mitogen activated protein kinases* (MAPK)-Signalwegen zur Aktivierung des sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors *activator protein 1* (AP-1). Bei AP-1 handelt es sich um Homo- oder Heterodimere, welche sich aus Proteinen der Jun-Familie (v-Jun, c-Jun, JunB, JunD), der Fos-Familie (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), der Maf-Familie (c-Maf, MafB, MafA, MafG,F,K) und der *activating transcription factor*- (ATF-)Familie (ATF2-7, ATF3/LRF1, B-ATF1-3, JDP1,2) zusammensetzen (Hess et al. 2004). Die Aktivierung von AP-1 erfolgt über MAPK-Kaskaden: Es konnte gezeigt werden, dass die aktivierte MAP-KKK TAK-1 die *mitogen activated kinases* (MKK) MKK4, MKK7, MKK3 und MKK6 aktiviert (Widmann et al. 1999). MKK4 und MKK7 aktivieren c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) (Tournier et al. 2001), die wiederum die Proteine c-Jun und ATF-2 phosphorylieren (Dérjard et al. 1994; Gupta et al. 1995). MKK3, MKK4 und MKK6 aktivieren p38-MAPK (Cuenda et al. 1996; Winzen et al. 1999) welche ebenfalls ATF-2 phosphorylieren (Morton et al. 2004) und außerdem die mRNA-Stabilisierung regulieren (Winzen et al. 1999). Die Phosphorylierung der AP-1-Proteine führt unter anderem zur Induktion der Transkription der AP-1-Proteine selbst, zur Minderung ihres Abbaus und zur Verstärkung ihrer Transkription aktivierenden Wirkung (Karin 1995).

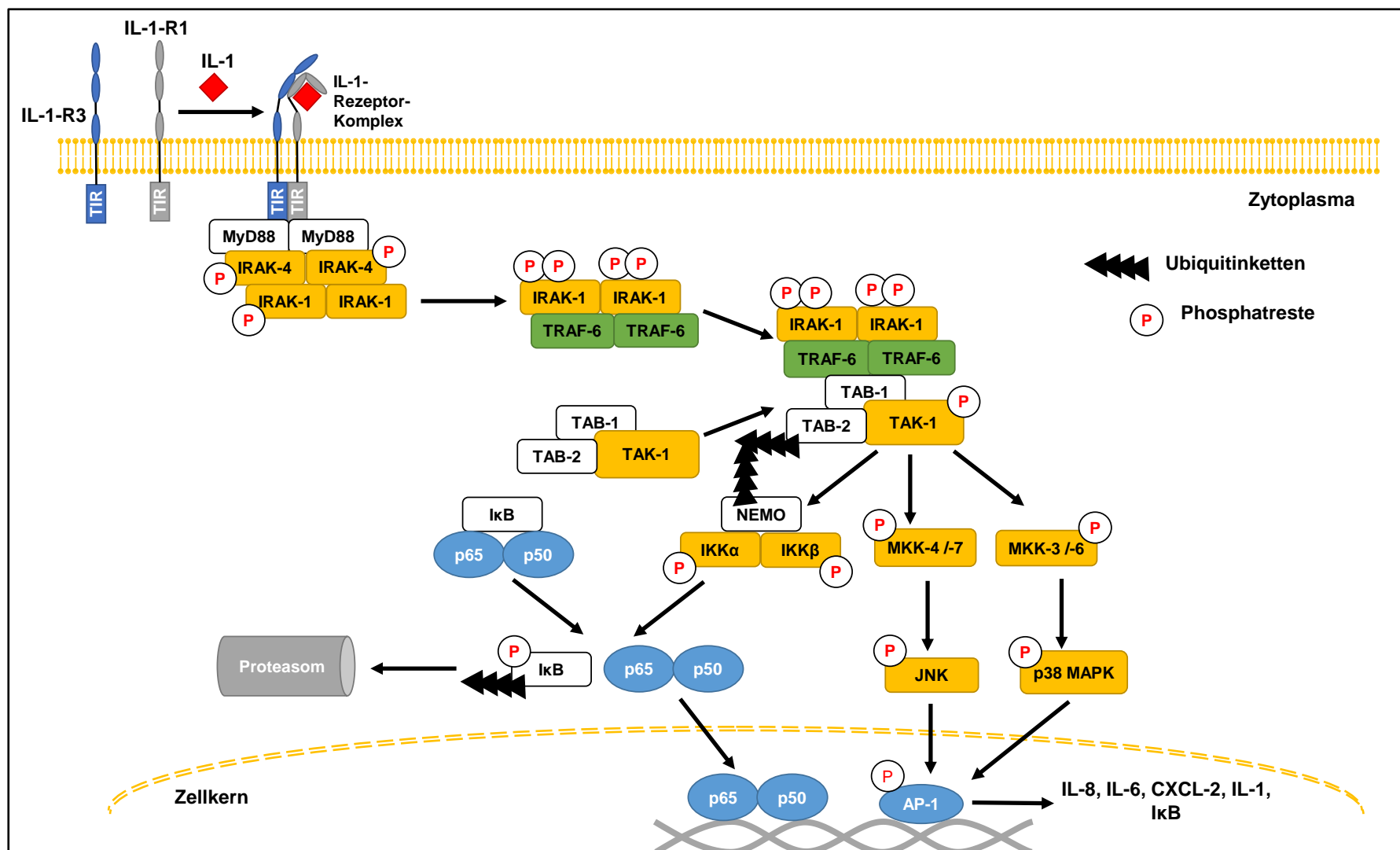


Abbildung 1: Schematische Darstellung wichtiger Regulationsschritte des IL-1-Signalweges.

Die Bindung von IL-1 α oder IL-1 β an den IL-1-R1 führt zur Rekrutierung von IL-1-R3 und damit zur Bildung des IL-1-Rezeptorkomplexes. Die einander angenäherten TIR-Domänen von IL-1-R1 und IL-1-R3 bilden die Grundlage für die Oligomerisierung verschiedener Proteinkinasen: MyD88, IRAK 1, 2 und 4. Diese werden durch Autophosphorylierung und gegenseitige Phosphorylierung aktiviert und lösen sich dadurch vom IL-1-Rezeptorkomplex. Die aktivierten IRAK rekrutieren die Ubiquitinligase TRAF6, welche die Aktivierung von der MAP-KKK TAK-1 initiiert. Die aktivierte TAK-1 führt über die Aktivierung weiterer Kinasen zum proteasomalen Abbau von I κ B, welches im basalen Zustand die Translokation der p65:p50-Dimere in den Zellkern verhindert. Nach dem Abbau von I κ B können die p65:p50-Dimere in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren wirken. Weiterhin führt TAK-1 über MAPK-Kaskaden zur Phosphorylierung von Proteinen der AP-1-Familie. Dies erhöht die Menge der AP-1-Proteine im Zellkern und verstärkt ihre protranskriptionelle Wirkung. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren bewirken intranukleär eine Steigerung der mRNA-Synthese von IL-1-Zielgenen. Die Abbildung wurde selbst erstellt und modifiziert nach Boraschi et al., 2018.

1.4 Wirkung induzierter Transkriptionsfaktoren im Zellkern

Die Transkriptionsfaktoren der AP-1- und NF- κ B-Familien binden an spezifische Stellen der genomischen DNA, in der Regel in offenen Chromatinbereichen, und regulieren dort die Transkription ihrer Zielgene (Mayr-Buro et al. 2019). Auch intranukleär wird die Wirkung der beiden induzierbaren Transkriptionsfaktoren durch verschiedene Mechanismen auf lokaler und globaler Ebene reguliert (Bacher et al. 2021). Dies wird in den Kapiteln 1.4.3 und 1.4.4 ausgeführt. Da hierbei die Organisation des Genoms eine große Rolle spielt, soll in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2 zunächst auf den Aufbau des Zellkerns und die Organisation der DNA im Zellkern eingegangen werden.

1.4.1 Organisation des Zellkerns und Regulation seiner Größe

Der Zellkern enthält die Desoxyribonukleinsäure (DNA), welche die Erbinformation codiert. Zellkerne sind normalerweise sphärisch oder ellipsoid geformt (Vukovic et al. 2016) und nehmen im Durchschnitt 8 – 10 % des Zellvolumens ein (Deolal et al. 2021). Der Zellkern wird vom Zytoplasma durch die Kernhülle abgegrenzt, welche aus einer inneren und einer äußeren Lipidmembran besteht. Die äußere Kernmembran geht kontinuierlich in das endoplasmatische Retikulum über (Rothballer und Kutay 2012). An einigen Stellen fusionieren äußere und innere Kernmembran miteinander. Hier kommt es durch ringförmige Ansammlungen von je circa 30 Kernporenproteinen, sogenannten Nucleoporinen, zu Kernporenkomplexen. Die Kernporenkomplexe ermöglichen den gezielten nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen und messenger Ribonukleinsäure (mRNA): Moleküle bis zu einer Größe von 40 Kilodalton können frei durch die Kernporen diffundieren. Größere Moleküle müssen aktiv importiert oder exportiert werden. Dafür binden Transportrezeptoren spezifische Sequenzen in den zu transportierenden Proteinen. Importine erkennen *nuclear localization sequences* (NLS) in Proteinen und vermitteln danach den Import, Exportine erkennen *nuclear export sequences* (NES) und vermitteln daraufhin den Proteinexport (Hoelz et al. 2011). Die Kernhülle wird von sogenannten *Linker of nukleoskeleton and cytoskeleton* (LINC) durchspannt, welche Interaktionen zwischen dem Zytoskelett und dem Nukleoskelett vermitteln (Rothballer und Kutay 2012). Der inneren Kernmembran liegt die Kernlamina an, welche aus einem Netzwerk aus Laminintermediärfilamenten besteht. In Wirbeltieren gibt es 4 Lamin-Isoformen: Lamin A und C, Lamin B1 und Lamin

B2. Die Kernlamina reguliert gemeinsam mit anderen Faktoren die Organisation des Chromatins, bindet Transkriptionsfaktoren an die Kernhülle, ist mit LINC-Komplexen assoziiert und trägt zur mechanischen Stabilität des Zellkerns bei (Dittmer und Misteli 2011). Im Zellkern befinden sich weiterhin verschiedene subnukleäre Organellen, sogenannte *nuclear bodies*, die den intranukleären Raum kompartimentieren. Auf diese Weise entstehen Bereiche, in denen sich Reaktionspartner konzentrieren, sodass biologische Reaktionen effizient ablaufen können. Beispiele für *nuclear bodies* sind der Nukleolus, in dem unter anderem ribosomale RNA synthetisiert und zu Ribosomen zusammengesetzt wird, oder *nuclear speckles*, in denen Transkriptions-, Splicing- und RNA-Prozessierungsfaktoren akkumulieren (Quinodoz et al. 2018; Mao et al. 2011). Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus des Zellkerns.

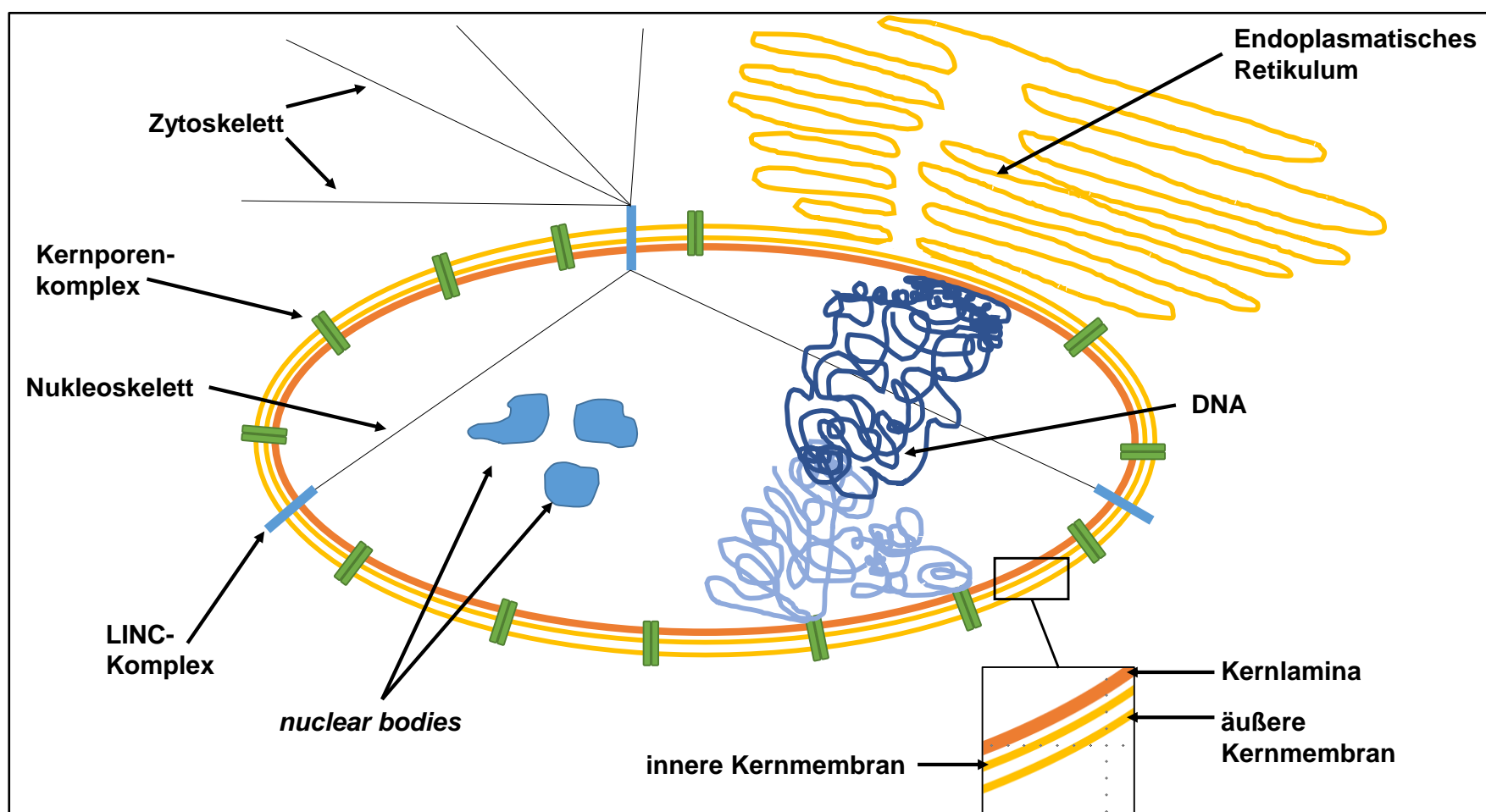


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Zellkerns.

Der humane Zellkern wird durch eine Doppellipidmembran zum Zytosol hin begrenzt. Die äußere Kernmembran geht in das endoplasmatische Retikulum über. An die innere Kernmembran grenzt im Zellkern die Kernlamina aus Laminintermediärfilamenten. Die Kernhülle wird von LINC-Komplexen durchspannt, welche Zytoskelett und Nukleoskelett miteinander verbinden. An einigen Stellen gehen äußere und innere Kernmembran ineinander über. Hier kommt es durch die Ansammlung von Nukleoporinen zu Kernporenkomplexen, die den nukleozytoplasmatischen Transport vermitteln. Im Zellkern befinden sich neben der DNA, viele Transkriptions-, Splicing-, und RNA-Prozessierungsfaktoren. Diese Faktoren akkumulieren in *nuclear speckles*, welche ein Beispiel für *nuclear bodies* darstellen. Weitere bekannte *nuclear bodies* sind Nukleoli, in denen die ribosomale RNA-Synthese stattfindet. Die Abbildung wurde selbst erstellt und modifiziert nach (Cantwell und Dey 2021).

Die genaue Regulation der Form und Größe des humanen Zellkerns ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Cantwell und Dey 2021).

Im Gegensatz zu früheren Vermutungen scheint die DNA-Menge (Ploidie, Genomgröße) die Kerngröße nur indirekt zu beeinflussen (Neumann und Nurse 2007). Stattdessen wird angenommen, dass die Größe der zum Zellkern gehörenden Zelle ausschlaggebender für die Kerngröße ist, da in Hefezellen gezeigt wurde, dass Änderungen der DNA-Menge zu keiner Änderung von Kern- und Zellgröße führten (Neumann und Nurse 2007) und sich die Kerngröße proportional zur Zellgröße veränderte (Jorgensen et al. 2007; Neumann und Nurse 2007). Dabei scheint das Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma in gesunden, eukaryonten Zellen zelltypspezifisch konstant gehalten zu werden (Huber und Gerace 2007; Neumann und Nurse 2007; Cantwell und Nurse 2019b). Die Zellgröße von Zellen mehrzelliger Organismen ist das Ergebnis der differenzierten Regulation von zellulärem Wachstum (Änderung der Zellmasse), Zellproliferation (Zellteilung) und Zellüberleben. Ein Teil dieser Prozesse ist genetisch determiniert, während ein anderer Teil durch extrinsische Faktoren beeinflusst wird. Zu den extrinsischen Einflussfaktoren gehören das Angebot von Nährstoffen (z.B. Glukose, Aminosäuren, Sauerstoff), mechanische Einflüsse, mitogene Faktoren und Wachstumsfaktoren (z.B. *insulin like growth factor*). Nicht-proliferierende Zellen behalten ihre ungefähre Größe bei, wohingegen die Zellgröße proliferierender Zellen eng mit dem Zellzyklus koordiniert ist (Lloyd 2013; Rhind 2021). Im Verlauf der Interphase proliferierender Zellen vergrößern sich sowohl das Volumen des Zytoplasmas als auch das Volumen des Zellkerns in ähnlichem Maße (Cantwell und Nurse 2019b; Maeshima et al. 2010). Der Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung des (erstaunlich konstanten) Verhältnisses von Kern- und Zytoplasma ursächlich ist, ist bisher nicht vollständig verstanden. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die durchschnittliche Zellgröße, gemessen am Durchmesser, verschiedener Zelltypen.

Zelltyp	Durchschnittlicher Durchmesser
Bakterien	1-10 µm
Erythrozyten	7,5 µm
Hepatozyten	20-30 µm
Epithelzellen	20-40 µm
Humane Oozyte	100 µm
Glatte Muskelzellen	0,05 – 0,2 mm
Froschei	1 mm
Quergestreifte Muskelfaser	Bis mehrere cm
Nervenzelle	Bis über 1m

Tabelle 1: Übersicht über die durchschnittliche Zellgröße verschiedener Zelltypen gemessen an ihrem Durchmesser.

Selbst erstellt und modifiziert nach (Boenigk 2021; Buselmaier und Haussig 2018)

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Kerngröße und auf die Aufrechterhaltung eines konstanten Kern- / Zytoplasmaverhältnisses (K-/Z-Verhältnis) scheint der nukleozytoplasmatische Transport zu sein: Neumann und Nurse konnten zeigen, dass die Menge des die einzelnen Zellkerne umgebenden, Zytoplasmas die Kerngröße beeinflusst (Neumann und Nurse 2007). Anhand von unterschiedlich großen Krallenfrosch-Eiern wurde weiterhin gezeigt, dass Importin α und *nuclear transport factor 2*, welche den Import verschiedener Proteine vermitteln, die Kerngröße an die Zellgröße anpassen (Levy und Heald 2010; Brownlee und Heald 2019). Ferner wurde beobachtet, dass der *knockdown* des Nukleoporins ELYS in humanen MCF10AT1k.cl2-Zellen zu einer Abnahme der Kernporen und zu einer Verringerung der Größe humaner Zellkerne führte, wohingegen die Überexpression von ELYS das Gegenteil bewirkte. Am ehesten wurde die Veränderung des nukleären Imports als Ursache für diese Änderung der Kerngröße in Betracht gezogen. Passend hierzu führte eine Verringerung des nukleären Exports durch *knockdown* oder Hemmung des Exportproteins Exportin 1 zu größeren Zellkernen mit verändertem Kern-Zytoplasma-Verhältnis (Jevtić et al. 2019). Ein genomweites *Screening* an Hefezellen zeigte ebenfalls, dass der *knockout* von Proteinen, die den nukleozytoplasmatischen Transport regulieren (u.a. *mRNA export factor* RAE1) zu größeren Zellkernen führte (Kume et al. 2017). Es wird angenommen, dass die intranukleäre Akkumulation größerer Molekülmengen eher mit einer Änderung der Kerngröße verbunden ist, als die Störung des Transports eines spezifischen Faktors (Kume et al. 2017; Cantwell und Dey 2021; Berry et al. 2022).

Weiterhin konnte in genomischen Screenings an Hefezellen und humanen Mamma-Karzinomzellen für einige an der Regulation der Chromatinorganisation (u.a. Komponenten von *chromatin remodelling complexes*, Histonchaperone), der Transkription (u.a. Komponenten von Histonacetylasen) und der mRNA-Prozessierung (Komponenten des Spleißosoms) beteiligte Proteine ein Einfluss auf das Kern-/Zytoplasma-Verhältnis nachgewiesen werden (Kume et al. 2017; Cantwell und Nurse 2019a; Jevtić et al. 2019; Chen et al. 2019). Der genaue Zusammenhang zwischen der Regulation der Transkription, der mRNA-Prozessierung und der Kerngröße ist bisher noch unklar, jedoch wird aktuell ein Modell vorgeschlagen, nachdem die intranukleäre Akkumulation von Proteinen und mRNA, entweder durch verminderten Export oder durch die gestörte Prozessierung von mRNA zu vergrößerten Zellkernen führen könnte (Kume et al. 2017; Cantwell und Nurse 2019a).

Ferner gibt es Hinweise, die für eine Verbindung zwischen dem Grad der Verdichtung des Chromatins und der Größe von Zellkernen sprechen: In *Tetrahymena*, embryonischen Stammzellen von Mäusen und Hela-Zellen wurde gezeigt, dass eine Reduktion der Verdichtung des Chromatins durch den *knockout* von Histonproteinen und Kondensin-Untereinheiten mit größeren Zellkernen assoziiert war (Shen et al. 1995; Fazio und Panning 2010; George et al. 2014). In Embryonen von Krallenfröschen wiederum zeigte sich eine Assoziation zwischen der stärkeren Verdichtung des Chromatins und größeren Kernvolumina (Chen et al. 2019).

Auch die Veränderung im Stoffwechsel von Komponenten der Kernhülle scheint einen Einfluss auf die Kerngröße zu haben: So hatte der *knockout* von Proteinen des Lipidstoffwechsels und von Komponenten der LINC-Komplexe in Hefezellen aberrante Zellkernvolumina mit verändertem Kern-/Zytoplasma-Verhältnis zur Folge (Kume et al. 2017; Cantwell und Nurse 2019a). Weiterhin beeinflussten aberrante intranukleäre Lamin-Konzentrationen die Kerngröße (Jevtić et al. 2015). Ebenfalls wurde gezeigt, dass der Metabolismus der Komponenten

des endoplasmatischen Retikulums, aus denen am Ende der Mitose die neue äußere Kernmembran entsteht, für die Kerngröße eine Rolle spielt (Christodoulou et al. 2016; Cantwell und Dey 2021).

In einem kürzlich durch Deviri und Safran publizierten Modell wird das Kernvolumen als Ergebnis physikalischer Kräfte betrachtet, die entweder von außen oder von innen auf die Kernhülle einwirken. Bei diesen Kräften handele es sich um den osmotischen Druck ausgehend vom Chromatin und den Ionen, die die negative Netto-Ladung des Chromatins ausgleichen, den elastischen Kräften des Zytoskeletts, dem osmotischen Druck, der von Molekülen (Proteinen und RNA) ausgeht, welche durch aktiven nukleozytoplasmatischen Transport entweder präferentiell im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert sind, und der Oberflächenspannung der Kernhülle. Bei einer Dysbalance der osmotischen Drücke in Kern und Zytoplasma würde Flüssigkeit durch die Kernporen in den Zellkern einströmen, welche eine Vergrößerung des Zellkerns bewirke, bis eine Balance zwischen den osmotischen Drücken beider Kompartimente hergestellt wäre. Da die präferentiell entweder im Zellkern oder Zytoplasma lokalisierten Moleküle besonders leicht zu einer Dysbalance der osmotischen Drücke führen würden, würden diese für die Definition des Kernvolumens eine besonders wichtige Rolle spielen. Dieses Modell würde auch die beschriebene Konstanz des Kern-/Zytoplasma-Verhältnisses und den beschriebenen Einfluss von Änderungen im nukleozytoplasmatischen Transport, sowie der Transkription und Translation erklären (Deviri und Safran 2022).

Veränderungen der Kerngröße wurden bisher bei verschiedenen genetischen Erkrankungen, Alterungsprozessen und Tumoren gefunden (Cantwell und Dey 2021). So ist beispielsweise das Kern-Zytoplasma-Verhältnis in vielen malignen Zellen zugunsten eines größeren Zellkerns verschoben (Jevic und Levy 2014). Diese Beobachtung wird in der Pathologie als Malignitätskriterium verwendet (Jevic und Levy 2014) und ist bei einigen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (ABDALLA et al. 2012). Die Mechanismen hinter diesem Zusammenhang, sowie die Antwort auf die Frage, ob die erhöhte Kerngröße und aberrante Kernform die Ursache oder Folge der malignen Entartung ist, sind bislang jedoch ungeklärt (Cantwell und Dey 2021). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Zellkerne mit aberranter Größe in Zellen auftreten, welche Tumorzellen umgeben (Chai und Brown 2009; Slaughter et al. 1953). Dies führte zu der Vermutung, dass sich Änderungen der Kerngröße in einem frühen Stadium der Karzinogenese ereignen (Cantwell und Dey 2021). Ein Zusammenhang zwischen der Größe von Zellkernen und Entzündung beziehungsweise der Wirkung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 wurde bisher nicht untersucht.

1.4.2 Organisation der DNA

Bei der menschlichen DNA handelt es sich um ein Polymer aus Nukleinsäuren mit einer Länge von circa 3.200 Megabasenpaaren. Würde die DNA einer Zelle als einzelnes lineares Molekül vorliegen, wäre sie circa 1,8 Meter (m) lang (Heinrich et al. 2022). Um in Zellkernen von einem durchschnittlichen Durchmesser von 10 Mikrometer (μm) Platz zu finden, liegt die DNA in stark kondensierter Form vor, wofür sie an Proteine gebunden ist. Der Komplex aus DNA und Proteinen wird als Chromatin bezeichnet (Dekker und Misteli 2015). Die menschliche DNA verteilt sich auf 46 Chromosomen, welche in der Mitose durch ihre starke Kondensation leicht voneinander abgegrenzt werden können (Heinrich et al. 2022). Während der Interphase befinden sich die Chromosomen in sogenannten *chromosome territories* (CT) (Cremer und Cremer 2010). Die CT werden weiterhin in Bereiche eingeteilt, in denen das Chromatin aufgelockert ist (Euchromatin, A-Kompartimente) und Bereiche, in denen das Chromatin dichter ist (Heterochromatin, B-Kompartimente). Das Chromatin innerhalb eines Kompartiments weist eine erhöhte Interaktionswahrscheinlichkeit auf (Lieberman-Aiden et al. 2009). Chromatin wechselt dynamisch zwischen Euchromatin und Heterochromatin. Euchromatin ist dabei mit einer höheren transkriptionellen Aktivität assoziiert (van Steensel und Furlong 2019). Die Gliederung des Chromatins in A- und B-Kompartimente ist ein erstes Beispiel dafür, dass funktionell ähnliche Chromatinabschnitte in räumlicher Nähe zueinander vorliegen (van Steensel und Furlong 2019).

Innerhalb der A-/B-Kompartimente gibt es 100 Kilobasenpaare bis 1 Megabasenpaar große Bereiche, innerhalb derer besonders viele intrachromosomale Interaktionen (auch bezeichnet als Interaktionen in *cis*) nachgewiesen wurden und die deutlich weniger Interaktionen mit Genabschnitten außerhalb eines Bereiches zeigten. Diese Bereiche werden als *topologically associated domains* (TADs) bezeichnet (Dixon et al. 2012). Innerhalb der TADs kommt es wiederum zur Ausbildung von DNA-Schleifen, die 25 Kilobasenpaare bis 940 Kilobasenpaare umfassen und wahrscheinlich die TADs weiter unterteilen. Diese DNA-Schleifen werden als *insulated neighborhoods*, sub-TADs, *loop-domains* oder *CTCF contact domains* bezeichnet. Sowohl die TADs als auch die *insulated neighborhoods* weisen an ihren Grenzen besonders viele Bindestellen für den *CCCTC-binding factor* (CTCF) auf, welcher gemeinsam mit Cohesin für die dynamische Ausbildung der DNA-Schleifen verantwortlich ist (Hnisz et al. 2016). Die Chromatinschleifen ermöglichen, dass eigentlich entfernte Chromatinabschnitte in räumliche Nähe zueinander gelangen, sodass eine Interaktion möglich wird. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung spezifischer Enhancer-Promoter-Kontakte erhöht und die der Bildung potentiell schädlicher Interaktionen verringert (Hnisz et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass 90 % der Enhancer-Promoter-Interaktionen in humanen epithelialen Stammzellen innerhalb von

insulated neighborhoods stattfinden (Hnisz et al. 2016) und dass die Stärke der Expression von Genen innerhalb derselben TAD während der Zelldifferenzierung miteinander korrelierte (Nora et al. 2012). Diese Beobachtungen werden als Hinweise dafür aufgefasst, dass TADs und *insulated neighborhoods* die Genexpression beeinflussen (Nora et al. 2012; Hnisz et al. 2016).

Die kleinste organisatorische Einheit des Chromatins sind die Nucleosomen, welche einen aus acht Histonproteinen gebildeten Nucleosomkern enthalten, um den je etwa 150 Basenpaare der DNA gewickelt sind (Heinrich et al. 2022). Die Wechselwirkung zwischen den Histonen und der DNA ist sehr stark, sodass die Histone im kondensierten Zustand eine sterische Barriere bilden, die verhindert, dass das Chromatin für die Bindung der RNA-Polymerase Typ II zugänglich ist (Bhatt und Ghosh 2014).

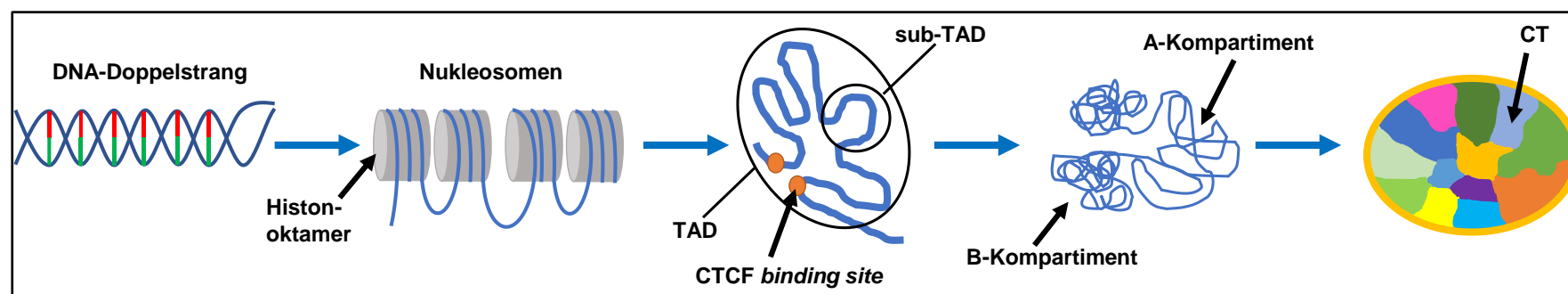


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Chromatinorganisation im Zellkern.

Die DNA ist ein doppelsträngiges Polymer aus Ribonukleinsäuren, welche mit Proteinen assoziiert als Chromatin bezeichnet wird. Das Chromatin ist um Histonoktamere gewickelt, wodurch die Nucleosomen entstehen. Weiterhin kommt es CTCF-vermittelt zur Ausbildung von Chromatinschleifen, die als *insulated neighborhoods* oder sub-TADs bezeichnet werden. Diese bilden wiederum größere Schleifen, die *topologically associated domains* (TADs), innerhalb derer sich die meisten intrachromosomalen Chromatininteraktionen ereignen. Mehrere unterschiedliche TADs bilden A- und B-Kompartimente, in denen stärker und schwächer kondensiertes Chromatin clusteriert. Die letzte Ebene der Chromatinorganisation sind die *chromosome territories* (CTs), die den Bereich bezeichnen, den ein einzelnes Chromosom im Interphasekern einnimmt. Die Abbildung wurde selbst erstellt und modifiziert nach (Finn und Misteli 2019; Mohanta et al. 2021)

1.4.3 Lokale Wirkung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern

Die Translokation von NF- κ B in den Zellkern trägt wesentlich zur Initiation der Transkription von IL-1-Zielgenen an ihren Promotersequenzen bei, indem sie zur lokalen Regulation der Chromatinzugänglichkeit und zur Rekrutierung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren, Mediatoren und Kofaktoren führt (Priester et al. 2022; Weiterer et al. 2020; Bacher et al. 2021). Die Initiation der Transkription eines Gens beginnt mit der Bindung allgemeiner und sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktoren an die Promotersequenz innerhalb des Gens. Promotersequenzen setzen sich aus einem proximalen und einem zentralen Abschnitt zusammen. Im proximalen Abschnitt binden unter anderem sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B, AP-1) an definierte Chromatinsequenzen (z.B. κ B binding sites) und im zentralen Promoterabschnitt binden allgemeine Transkriptionsfaktoren (z.B. *transcriptionfactor* IID (TFIID)) an konservierte DNA-Abschnitte (z.B. die *TATA box*) (Bhatt und Ghosh 2014). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren ist von der Zugänglichkeit der DNA abhängig, welche durch die Kondensation der DNA im Nucleosom verringert wird. Proinflammatorische Stimuli führen sowohl NF- κ B-abhängig als auch NF- κ B-unabhängig zu einem Umbau der Nucleosomen und damit zu einer erhöhten Zugänglichkeit des Chromatins an IL-1-Zielgenen (Weiterer et al. 2020; Diermeier et al. 2014; Jurida et al. 2015).

Der Umbau der Nucleosomen wird auf der einen Seite durch posttranslationale Modifikationen an den Histonproteinen und auf der anderen Seite durch *chromatin remodelling complexes* vermittelt (Bacher et al. 2021). Durch die posttranslationalen Modifikationen kann sich die Ladung der Histone ändern, was eine Änderung der Histon-DNA- und Histon-Histon-Interaktion zur Folge haben kann. Weiterhin führen posttranslationale Modifikationen an Histonen zur Entstehung von Erkennungsstellen für *chromatin remodelling complexes*. Häufige posttranslationale Veränderungen an Histonen sind die Acetylierung bzw. Deacetylierung und die Methylierung von Lysinresten, welche teilweise konservierte und teilweise kontextabhängige Folgen haben. So geht die Histonacetylierung typischerweise mit der transkriptionellen Aktivierung einer Chromatinregion einher (Venkatesh und Workman 2015). Bei *chromatin remodelling complexes* handelt es sich um Enzyme, die entweder ebenfalls über posttranslationale Modifikationen der Histone oder über ATP-abhängige Hydrolyse der Histon-DNA-Verbindungen die Chromatinstruktur verändern (Tyagi et al. 2016).

Die konzertierte Aktion der sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 wurde am Gen des Chemokins Interleukin 8 (*IL8*) beschrieben: In unstimulierten Zellen wird die Initiation der Transkription am *IL8*-Promoter durch verschiedene Mechanismen gehemmt. Erstens durch die Bindung von *NF- κ B-repressing factor* (NRF) an das negativ regulierende Element (NRE) der Promotersequenz, welches teilweise mit der κ B-binding site überlappt (Nourbakhsh et al. 2001). Zweitens durch die Bindung von *octamer 1* (OCT-1) an die *octamer*-Bindestelle am komplementären DNA-Strang gegenüber der Bindestelle für *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP) (Wu et al. 1997). Drittens durch die Deacetylierung der Histonproteine im Bereich des Promoters (Ashburner et al. 2001).

Im Rahmen des *IL-1-signaling*s translozieren NF- κ B-Dimere in den Zellkern und binden an die κ B-binding site (Stein und Baldwin 1993), woraufhin NRF seine Funktion vom Repressor zum Koaktivator ändert (Nourbakhsh et al. 2001). OCT-1 wird durch den Transkriptionsfaktor C/EBP ersetzt (Wu et al. 1997). Die Phosphorylierung der Transaktivierungsdomänen von AP-1 und NF- κ B (Schmitz et al. 2001; Gupta et al. 1995; Morton et al. 2004), die Rekrutierung der Histonacetyltransferasen *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein binding protein* (CBP) und p300 (Vanden Berghe et al. 1999) und die posttranslationale Modifikation von Histonen (Vanden Berghe et al. 1999) führen zu *chromatin remodelling*. Durch das *chromatin remodelling* wird die *TATA box* für allgemeine Transkriptionsfaktoren zugänglich, sodass das *TATA box binding protein* (TBP) an diese Promotersequenz binden kann. Die Bindung des TBP an die *TATA box* ist der erste Schritt für die Rekrutierung des *preinitiation complexes*, bestehend aus weiteren allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase Typ II, und den Start der Transkription von *IL8* mRNA (Bhatt und Ghosh 2014). An anderen Genen wie zum Beispiel *Interleukin 6* ist zusätzlich die Aktion von ATP-abhängigen *chromatin remodelling complexes* wie SWItch/sucrose nonfermentable (SWI/SNF) für den ausreichenden Umbau des Nukleosomes notwendig (Ramirez-Carrozzi et al. 2006). Zusätzlich zur Initiation der Transkription wurde gezeigt, dass TNF α -induziertes intranukleäres NF- κ B durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen auch zur Elongation der mRNA von TNF α -Zielgenen, inklusive *IL8*, beiträgt (Bacher et al. 2021; Barboric et al. 2001; Nowak et al. 2008).

Die protranskriptionelle Wirkung von NF- κ B wird durch verschiedene *negative feedback loops* kontrolliert (Weber et al. 2010). Zu diesen gehört, dass das für I κ B α codierende Gen *NFKBIA* nach *IL-1*-Stimulation vermehrt transkribiert wird (Maßmann 2021; Hu et al. 2010; Sun et al. 1993). Daraufhin neu synthetisiertes I κ B α transloziert zunächst in den Zellkern und bindet Chromatin-assoziiertes NF- κ B, woraufhin die NF- κ B-Dimere wieder ins Zytosol translozieren. Unter anderem wird auf diese Weise die Transkription der NF- κ B-Zielgene beendet (Stein und Baldwin 1993; Mayr-Buro et al. 2019; Renner und Schmitz 2009; Arenzana-Seisdedos et al. 1997)

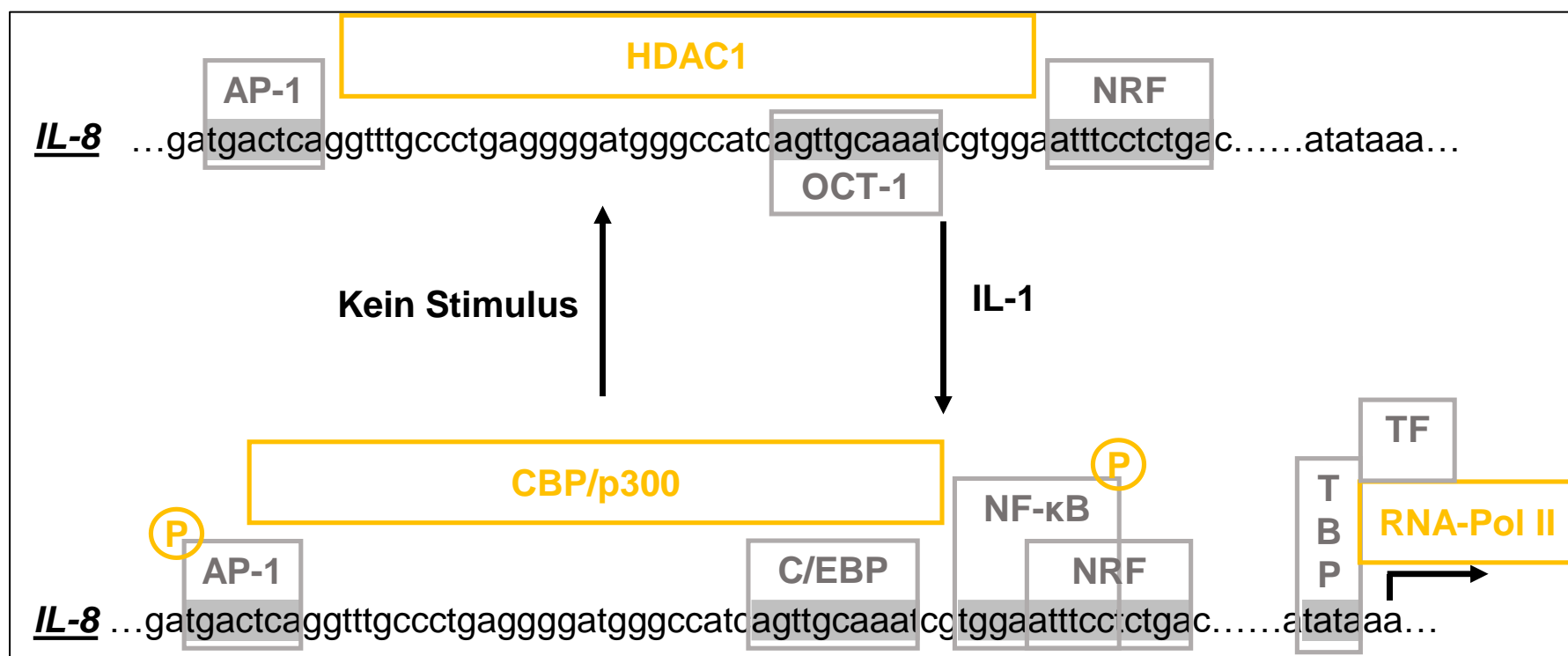


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Induktion der Transkription am *IL-8*-Promotor.

Oben: *IL-8*-Promotor in unstimulierten Zellen. Ohne Stimulus wird die Transkription durch Histondeacetylierung u.a durch Histondeacetylase 1 (HDAC1) und Bindung der beiden Repressorproteine *octamer 1* (OCT-1) und *NF- κ B-repressing factor* (NRF) gehemmt. **Unten:** *IL-8*-Promotor nach *IL-1*-Stimulation: Es kommt zur Bindung von NF- κ B an die κ B-Sequenz, zum Ersatz von OCT-1 durch C/EBP, zur Phosphorylierung (P) von AP-1 und NF- κ B und zur Rekrutierung von CBP/p300 mit konsekutiver Histonacetylierung. Weiterhin wechselt NRF die Funktion zu einem aktivierenden Faktor. Aus diesen Veränderungen resultiert ein *chromatin remodelling*, welches die *TATA box* für das *TATA box binding protein* (TBP) zugänglich macht. Daraufhin kommt es zur Zusammensetzung des *preinitiation complex* aus weiteren allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TF) und RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) und die Transkription startet. Die Abbildung wurde erstellt und modifiziert nach (Elke Hoffmann et al. 2002; Nourbakhsh et al. 2001).

Parallel zu Transkription bindet die prä-messenger RNA (prä-mRNA) an RNA binding proteins (RBPs), erhält an ihrem 5'-Ende eine Kappe aus methylierten Guaninen und wird an ihrem 3'-Ende von der RNA-Polymerase Typ II gelöst und polyadenyliert. Außerdem werden die meisten Introns kotranskriptionell aus der prä-mRNA herausgespleißt. (Zarnack et al. 2020). Die mature mRNA wird aktiv über die Kernporen ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma wird die mRNA entweder stabilisiert (Winzen et al. 1999) und gespeichert, abgebaut oder an Ribosomen in Proteine translatiert (Zarnack et al. 2020). Die synthetisierten Proteine werden final über verschiedene Wege sezerniert (Priester et al. 2022). All diese posttranskriptionellen Schritte sind hoch regulierte Prozesse, die durch proinflammatorische Stimuli modifiziert werden können (Zarnack et al. 2020; Priester et al. 2022).

Die Menge der mRNA einer Zelle insgesamt oder für ein spezifisches Protein ist das Ergebnis aus der mRNA-Syntheserate (Wahrscheinlichkeit pro Zeit, dass ein mRNA-Transkript produziert wird) und der mRNA-Abbaurrate (Wahrscheinlichkeit pro Zeit, dass ein

mRNA-Transkript abgebaut wird) insgesamt oder für ein spezifisches Gen (Berry und Pelkmans 2022). Die mRNA-Synthese vieler (vor allem der induzierbaren) Gene erfolgt nicht als linearer Prozess sondern in sogenannten *transcriptional bursts*. Unter *transkriptional burst* wird die pulsartige Produktion von RNA-Molekülen in zufällig verteilten Zeitintervallen verstanden, welche durch eine kurzzeitige Aktivierung und Inaktivierung der Transkription entsteht (Raj et al. 2006; Finn und Misteli 2019). Die mRNA-Syntheserate ergibt sich aus der *burst frequency* (Häufigkeit der *bursts* in einer bestimmten Zeit) und der *burst size* (Transkriptmenge, die pro *burst* synthetisiert wird) (Bass et al. 2021). Es wurde gezeigt, dass Stimuli wie *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), welcher ebenfalls über die Aktivierung von NF- κ B wirkt, die *burst size* und *burst frequency* an ihren Zielgenen verändern (Bass et al. 2021).

1.4.4 Globale Regulation der Chromatinorganisation im Zusammenhang mit Transkription

Nach seiner Translokation in den Zellkern bindet NF- κ B nicht nur an die spezifischen κ B-*binding sites* in den Promoterregionen seiner Zielgene, sondern auch genomweit an mehr als 1000 κ B-*binding sites* in *intergenic regions* und Enhancern (Jurida et al. 2015). Bei Enhancer-Sequenzen handelt es sich um *cis*-regulatorische Chromatinsequenzen, die die zelltypspezifische Genexpression regulieren (Huang et al. 2018). Auch eine NF- κ B-abhängige und NF- κ B-unabhängige genomweite Umstrukturierung der Chromatinzugänglichkeit ist mit IL-1- bzw. TNF α -*signaling* verbunden (Weiterer et al. 2020; Diermeier et al. 2014). Solche Befunde rufen die Frage hervor, wie genau die Entzündungsmediatoren IL-1 und TNF α die globale Chromatinorganisation beeinflussen und wie die Enhancer zur Regulation der induzierten Genexpression beitragen. Hier besteht zum Beispiel die Frage, ob es IL-1-induziert zur Annäherung der Chromatinsequenzen verschiedener IL-1-Zielgene durch Enhancer-vermittelte Chromatinschleifenbildung kommt und wie sich die Position dieser Chromatinabschnitte im Verhältnis zu anderen nukleären Landmarken verhält.

Die Auswirkung der transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene auf die globale Chromatinorganisation wurde in den letzten Jahren verstärkt mit mikroskopischen (Fluoreszenz *In-Situ*-Hybridisierung) und *proximity-ligation*-basierten (*Chromosome conformation capture-Analysen*) Techniken untersucht. Auf diese Weise konnten einige allgemeine Eigenschaften der Verteilung des Chromatins im nukleären Raum herausgearbeitet werden: Die Verteilung der CTs und einzelner Chromatinabschnitte im Raum scheint nicht zufällig zustande zu kommen, da Chromatinabschnitte häufiger an einigen Positionen zu detektieren sind als an anderen (Dekker und Misteli 2015). Das Chromatin ist probabilistisch im Nukleoplasma verteilt, was bedeutet, dass die Position eines Chromatinabschnittes als Bereich aufgefasst werden sollte, in dem sich dieser Abschnitt mit höherer Wahrscheinlichkeit befindet (Dekker und Misteli 2015). Die absolute Position bestimmter Chromatinabschnitte weist innerhalb einer Zellpopulation eine hohe Variabilität auf (Finn und Misteli 2019) und ändert sich im Zeitverlauf dynamisch (Finn et al. 2019). Die Position der CTs oder kleinerer Chromatinabschnitte wird relativ zur Peripherie (in der Regel definiert durch die Kernlamina), anderen CTs oder Chromatinabschnitten, oder nukleären Kompartimenten, wie dem Nukleolus, gemessen (Crosetto und Bienko 2020)

1.4.4.1 Radiale Position der CTs und kleinerer Chromatinabschnitte

Die Lokalisation eines Chromosoms oder einzelner Chromatinabschnitte im Verhältnis zu Kernzentrum und -peripherie wird auch als radiale Position bezeichnet (Crosetto und Bienko 2020). In menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass genreiche Chromosomen, wie Chromosom 19, häufiger zentral lokalisiert sind und genarme Chromosomen, wie Chromosom 18, häufiger in der Kernperipherie liegen (Nagele et al. 1999; Boyle et al. 2001; Bolzer et al. 2005). Weiterhin scheint die genaue radiale Verteilung der CTs, sowie das Ausmaß des Einflusses der Chromosomengröße auf die radiale Position zelltypspezifisch zu sein (Bolzer et al. 2005). Auch einzelne Chromatinsequenzen scheinen innerhalb des Zellkerns radial organisiert zu sein: es wurde gezeigt, dass genreiche und stark exprimierte Chromatinabschnitte in Lymphozyten und Fibroblasten häufiger in der Nähe des Kernzentrums lagen als genarme, schwächer exprimierte (Küpper et al. 2007).

Auch wenn die radiale Verteilung der CTs und einzelner Chromatinregionen viel untersucht wurde, ist bisher nicht gut verstanden, wie es zur Positionierung des Chromatins kommt und ob die Position eines Genlocus an sich wichtig für seine Funktion oder lediglich ein Nebenprodukt nukleärer Prozesse ist. Dies liegt unter anderem an der Schwierigkeit, einzelne intranukleäre Prozesse voneinander zu trennen und auf diese Weise Ursache und Wirkung voneinander zu differenzieren. Ein weiteres Problem ist, dass Expression und Position verschiedener Gene über verschiedene Mechanismen reguliert werden, was das Erstellen einfacher Regeln erschwert (Meaburn 2016).

Es gibt folgende Hinweise auf eine Verbindung zwischen der Position und der Expression eines Gens:

In den meisten Zellkernen sind die Kernperipherie und die direkte Umgebung von Nukleoli reich an Heterochromatin, während das Kernzentrum und die direkte Umgebung von Kernporen und *nuclear speckles* reich an mit höherer Transkriptionsaktivität assoziiertem Euchromatin sind (Akhtar und Gasser 2007; van Steensel und Furlong 2019; Kalverda et al. 2010; Quinodoz et al. 2018).

Unter dem peripher lokalisierten Chromatin gibt es Abschnitte, die Kontakt zur Kernlamina haben, indem sie an Kernlamina gebunden sind. Diese Abschnitte werden als *lamin-associated domains* (LADs) bezeichnet und zeichnen sich durch Genarmut und geringe transkriptionelle Aktivität aus (Guelen et al. 2008). Im Rahmen der Differenzierung von embryonalen Stammzellen von Mäusen zu Astrozyten konnte eine Lösung vieler Gene von der Kernlamina beobachtet werden, welche mit einer Steigerung der Expression dieser Gene assoziiert war (Peric-Hupkes et al. 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass die künstliche Bindung einiger, aber nicht aller untersuchten Gene an die Kernlamina in verschiedenen humanen Zellen zu einer verringerten Genexpression führte (Finlan et al. 2008). In *Lamin-knockout-Zellen* wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine zentralere Lokalisation der Chromosomen 13 und 18 und eine stärkere Expression von Genen auf Chromosom 18 gezeigt (Malhas et al. 2007; Mewborn et al. 2010). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kernlamina Einfluss auf die Genexpression und die radiale Genposition hat.

Bei der Untersuchung, inwiefern die radiale Position von CTs und einzelnen Chromatinabschnitten, unabhängig von der Assoziation mit der Kernlamina, mit der Transkriptionsaktivität des Chromatins zusammenhängt, wurden jedoch ambivalente Beobachtungen gemacht:

Die Ergebnisse einiger Untersuchungen deuten für bestimmte Genorte auf einen Zusammenhang beider Eigenschaften hin. In embryonalen Stammzellen lag das den proneuronalen Regulator *Achaete-Scute-Homolog 1* codierende Gen initial präferentiell peripher. Nach neuronaler Induktion kam es zu einer Aktivierung und einer zentraleren Position dieses Gens (Williams et al. 2006). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam der Vergleich von transkriptionell aktiven und inaktiven *glial fibrillary acidic protein*-Genen, welche eine signifikant zentralere Position der aktiven Gene zeigten (Takizawa et al. 2008). Gene wie *INO1* und *GAL1* hingegen näherten sich im Rahmen ihrer Aktivierung an die Kernlamina an (Brickner und Walter 2004). Untersuchungen der Position des *major histocompatibility complex*-Genclusters und des *epidermal differentiation complex* zeigten, dass diese Chromatinsequenzen nach ihrer Aktivierung stärker am Rande ihrer CTs positioniert waren als ohne Aktivierung (Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002).

Die Ergebnisse anderer Untersuchungen stellen einen generellen direkten Zusammenhang zwischen Genposition und -expression eher in Frage:

Meaburn und Misteli konnten zwar nachweisen, dass es in Mammaepithel-Zellen zu einer Änderung der radialen Genposition von 7 von 10 tumorassoziierten Genen (unter anderem *transforming growth factor β*) während der Zelldifferenzierung und Karzinogenese kam. Allerdings war diese Änderung entweder nicht verbunden mit einer Änderung der Genaktivität oder es konnte keine reproduzierbare Richtung der Reposition zum Kerninneren oder zur Kernperipherie festgestellt werden (Meaburn und Misteli 2008).

Auch mittels einer *high-throughput*-Analyse konnte kein Zusammenhang zwischen der radialen Position an sich und der Transkriptionsaktivität festgestellt werden, woraus geschlossen wurde, dass die Transkriptionsaktivität unabhängig von der Genposition sein kann. In dieser Untersuchung wurde auch gezeigt, dass jeweils multiple Faktoren die radiale Position eines untersuchten Gens gemeinsam beeinflussten, woraus abgeleitet wurde, dass die Position eines Gens eher das Ergebnis der konzertierten Wirkung verschiedener Faktoren ist als das Ergebnis eines spezifischen Mechanismus. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Position transkriptionell aktiver Gene stärker durch Transkriptionsfaktoren und *chromatin remodeller* beeinflusst wurde als die Position inaktiver Chromatinabschnitte (Shachar et al. 2015).

Therizols et al. konnten zwar eine Änderung der radialen Genposition endogener Gene wie *Pleiotrophin*, *Neuropilin 1* und *SRY* (*sex determining region Y*)-*box 6* in Richtung des Kernzentrums durch die transkriptionelle Aktivierung dieser Gene beobachten, jedoch hatte die reine Dekondensation der Chromatinabschnitte ohne transkriptionelle Aktivierung den gleichen Effekt. Daher folgerte diese Arbeitsgruppe, dass eher die Dekondensation als die transkriptionelle Aktivierung zu der Änderung der Genposition führte (Therizols et al. 2014). Diese Erklärung wird unter anderem dadurch bestärkt, dass die Acetylierung von Histonen an für die transkriptionelle Aktivierung charakteristischen Stellen mit einer zentraleren Position der Chromosomen 17, 18, 19, X und der Gene *APC*, *TP53*, and *CCND1* im Vergleich zu den nicht acetylierten Gensequenzen korrelierte (Strasák et al. 2009).

Aus diesen Beobachtungen sind zwei Modelle entstanden, die die radiale Organisation des Zellkerns beschreiben: Das *periphery vs. center model* beschreibt eine binäre Organisation des Zellkerns, wonach inaktive Chromatinomänen, wie LADs, B-Kompartimente, und B-TADs hauptsächlich nahe der Kernlamina oder um Nukleoli herum lokalisiert sind, während aktive Domänen, wie inter-LADs, A-Kompartimente und A-TADs im restlichen Nukleoplasma verteilt sind. Das *gradient model* beschreibt die Bildung eines Gradienten aus inaktiven und aktiven Chromatinabschnitten, bei dem sich die inaktivsten Chromatinabschnitte direkt an der Kernlamina oder um Nukleoli herum und die aktivsten Abschnitte im Kernzentrum und um *nuclear speckles* herum befinden. Nach diesem Modell hat jeder Genort eine präferierte radiale Position, auch wenn die exakte Position jedes Genortes von Zelle zu Zelle variiert (Crosetto und Bienko 2020).

Auch wenn die Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen Genaktivität und radialer Position noch nicht gut verstanden ist, gibt es Hinweise darauf, dass die radiale Position des Chromatins eine funktionelle Relevanz hat. Dies wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass die räumliche Organisation des Chromatins zelltyp-/ gewebespezifisch ist (Parada et al. 2004) und physiologische Situationen wie die Zelldifferenzierung mit einer Änderung der radialen Position von CTs und Chromatinsequenzen einhergehen. Als Beispiele können hier die Änderung der Position der Chromosomen 12 und 16 während der Differenzierung von Adipozyten (Kuroda et al. 2004) und Astrozyten (Peric-Hupkes et al. 2010), und die Änderung der radialen Position des Chromosoms 1 und der relativen Position des Lysozyngens zum CT 1 während der Differenzierung von Lymphozyten genannt werden (Stadler et al. 2004). Auch nach dem Einwirken des externen Stimulus Phytohaemagglutinin auf Lymphozyten wurden Änderungen der radialen Position einiger CT und eine stärkere Durchmischung verschiedener CTs beobachtet (Branco et al. 2008).

1.4.4.2 Positionen einzelner Geneloci im nukleären Raum zueinander

Durch die räumliche Nähe verschiedener Chromatinabschnitte zueinander steigt die Wahrscheinlichkeit ihrer Interaktion miteinander (Finn et al. 2019). Die meisten Chromatininteraktionen treten innerhalb der *insulated neighborhoods* auf, gefolgt von den TADs, A- und B-Kompartimenten und CTs (siehe Kapitel 1.4.2.) (Lieberman-Aiden et al. 2009). Dies lässt sich auch bei den IL-1-Zielgenen beobachten. So liegen die Chemokine *IL8*, *CXCL 1*, *2* und *3* in einer TAD auf Chromosom 4 (Weiterer et al. 2020). Bereits in unstimulierten humanen KB-Zellen konnten präformierte Kontakte zwischen dem *CXCL2*-Promoter und den Promotern anderer IL-1-Zielgene detektiert werden. Ferner wurden IL-1-induzierbare starke Promoter-Promoter und Enhancer-Promoter-Kontakte innerhalb dieser TAD und den *IL8*- und *CXCL2*-Enhancern in *cis* detektiert (Weiterer et al. 2020). Weiterhin wurde die NF- κ B-vermittelte *de novo*-Formierung von sogenannten Super-Enhancern durch Stimulation von humanen Endothelzellen mit TNF- α beobachtet (Brown et al. 2014). Als Super-Enhancer werden putative Enhancercluster bezeichnet, die eine ungewöhnlich hohe Enhanceraktivität und besonders ausgeprägte enhancertypische Chromatineigenschaften, wie die Anreicherung von Masterregulatoren, Koaktivatoren, Mediatoren und Chromatinfaktoren aufweisen (Huang et al. 2018). Für den *IL8*-Enhancer auf Chromosom 4 gibt es ebenfalls Hinweise, dass er als „*master*“-Enhancer agieren könnte: so führte die Deletion der *IL8*-Enhancer-Sequenz zu einem verringerten Transkriptom der meistinduzierten IL-1-Zielgene, einer verringerten Bindung von p65, RNA-Polymerase II und acetylierten Histonen an Promoter und Enhancern von IL-1-Zielgenen in *cis* (*CXCL1-3*, *8*) und *trans* (*IL6*, *NFkBIA*, *CCL20*) und zu verringerten IL-8 und IL-6-Proteinspiegeln nach Stimulation mit IL-1 α . Die Deletion des *CXCL2*-Enhancers hatte deutlich geringere Folgen (Weiterer et al. 2020). Die Beeinflussung von *IL6* mRNA und IL-6-Proteinspiegeln durch die Deletion des *IL8*-Enhancers, obwohl der *IL8*-Enhancer und der *IL6*-Promoter auf verschiedenen Chromosomen liegen, deutet auf eine interchromosomale Koregulation der beiden Gene hin. Chromatininteraktionen in *cis* und *trans* können durch die Bildung von Chromatinschleifen vermittelt werden (vergleiche Kapitel 1.4.2.).

Als eine der treibenden Kräfte für interchromosomale Interaktionen wird die Rekrutierung von Chromatinabschnitten zu bestimmten nukleären Stellen im Rahmen ihrer transkriptionellen Aktivierung diskutiert. Beispiele für solche Stellen sind die Transkriptionsfabriken und die *nuclear speckles* (Maass et al. 2019). Als Transkriptionsfabriken werden subnukleäre Stellen definiert, an denen mindestens zwei RNA-Polymerasen mindestens zwei DNA-Abschnitte transkribieren. Außerdem befinden sich in den Transkriptionsfabriken Transkriptions- und RNA-Prozessierungsfaktoren in besonders hoher Konzentration (Papantonis und Cook 2013). Es wird vermutet, dass Transkriptionsfabriken durch die Akkumulation der für die Transkription wichtigen Komponenten zu einer höheren Effizienz der Transkription beitragen. Darüber hinaus gelten Transkriptionsfabriken als wichtiges Prinzip für die Organisation des Zellkerns und des Chromatins (Rieder et al. 2012).

Den Zellkern organisieren Transkriptionsfabriken, indem sie zum *clustering* von koregulierten Genen führen. Beispielsweise konnte eine Kolokalisation von Zytokin-induzierten Genen in *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) gezeigt werden: Nach TNF- α -Stimulation zeigten die Gene *SAMD4A* und *EXT1* eine deutlich stärkere Assoziation mit anderen NF- κ B-responsiblen Genen. Außerdem konnte eine Kolokalisation der nascenten *SAMD4A* und *EXT1*-Transkripte mit NF- κ B in putativen Transkriptionsfabriken mittels RNA-FISH visualisiert werden. Hieraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Stimulation mit TNF- α in HUVEC zu einer Formierung von spezifischen NF- κ B-Fabriken führte. Analog hierzu führte auch die Stimulation von HUVEC mit *tumor-growth-factor β* (TGF β), dessen Wirkung über Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie vermittelt wird, zu einer erhöhten Assoziation untersuchter Gene mit anderen TGF β -responsiblen Genen, was auf die Bildung einer Smad-spezifischen Transkriptionsfabrik hindeutete (Papantonis et al. 2012). Infolge dieser Beobachtungen vermuteten Papantonis et al., dass alle Zytokine über spezialisierte Transkriptionsfabriken wirken (Papantonis et al. 2012). Der Nachweis der Bildung einer NF- κ B-spezifischen Transkriptionsfabrik, in der die Gene *IL8* und *IL6* kolokalisieren, ist bis jetzt aber noch nicht erfolgt.

In 3D RNA-FISH-Experimenten wurde gezeigt, dass sich einige Gene in B-Lymphozyten nach ihrer transkriptionellen Aktivierung über im Mittel 500 nm zu einer Transkriptionsfabrik hin bewegen und dass für Gene, die in *trans* in derselben Transkriptionsfabrik transkribiert werden, eine Verkürzung der Distanz zwischen ihren prä-mRNA-Signalen zu erkennen ist (Osborne et al. 2007).

Für erythroide Gene wurde gezeigt, dass sie häufig dieselben *nuclear speckles* teilen, obwohl sie eigentlich auf unterschiedlichen Chromosomen oder viele Basenpaare voneinander entfernt liegen (Brown et al. 2008). Weiterhin *clustern* Gene unabhängig von *nuclear speckles*, Transkriptionsfabriken und transkriptioneller Aktivität. Das organisierende Prinzip hierfür ist noch unbekannt. In Frage kommen allerdings unter anderem die bevorzugte Assoziation einiger Chromatinabschnitte mit Kernporen, der Kernlamina und Nukleosomen (Rieder et al. 2012).

1.4.4.3 Gene repositioning in malignen Tumoren als möglicher Ansatzpunkt für die Diagnosestellung

Im Vergleich zu Zellen gesunder Gewebe oder benignen Tumoren wurden in malignen Tumorzellen Abweichungen der nukleären Position einiger Genbereiche bzw. Gene festgestellt (Cremer et al. 2003; Murata et al. 2007; Meaburn et al. 2009). Zum Beispiel wiesen die Chromosomen 18 und 19 in vielen Tumoren eine aberrante Position auf, wobei Chromosom 18 meist mehr zentral und Chromosom 19 meist peripherer lokalisiert war (Cremer et al. 2003). Besonders gut untersucht sind aberrante Genpositionen in Mamma- und Prostatakarzinomen: Verschiedene Gene konnten in Epithelzellen von Mammakarzinomen reproduzierbar in anderer radialer Position detektiert werden als in gesundem Mammagewebe (Meaburn et al. 2009; Meaburn et al. 2016). In Prostatakarzinomen zeigten die Gene *Fli1*, *Mmp9* und *Mmp2* eine aberrante radiale Position (Leshner et al. 2016; Meaburn et al. 2016). Im Gegensatz dazu änderten 94% der in Prostatakarzinomgewebe und 57% der in Mammakarzinomgewebe untersuchten Gene ihre bevorzugte Position nicht (Leshner et al. 2016; Meaburn et al. 2009).

Wie spezifische Gene ihre Position verändern, scheint von der Tumorentität abzuhängen: So wiesen nur 2 der 11 in Mamma- und Prostatakarzinomen untersuchten Gene in beiden Tumorentitäten eine veränderte Position im Vergleich zu gesundem Gewebe auf (Meaburn et al. 2016). Hieraus wird gefolgert, dass die Änderung der Chromatinorganisation krankheitsspezifisch ist. Aus diesem Grund wird aktuell von einigen Arbeitsgruppen an der Möglichkeit geforscht, die Genposition als diagnostisches Tool zu nutzen. Hier wird vor allem die bereits weite Verbreitung von DNA-FISH und die vermutlich geringe zu untersuchende Gewebemenge als vorteilhaft betrachtet. Weiterhin könnte durch die mögliche Kombination der Untersuchung mehrerer Gene eine hohe Genauigkeit erreicht werden (Meaburn 2016; Meaburn und Misteli 2019).

1.5 Regulation von Genpositionen und Kerngrößen im IL-1-Signalweg

In, im Vorfeld durchgeführten, Studien der Arbeitsgruppe (AG) von Professor Kracht wurden 3D-Immuno-DNA-FISH-Experimente durchgeführt, mit dem Ziel eine durch IL-1 α induzierbare Änderung der radialen Position von *IL8*- und *IL6*-DNA-Loci und eine räumliche Annäherung der beiden Gene in *trans*, als Hinweis für eine interchromosomale Interaktion, zu detektieren. In diploiden immortalisierten Epithelzellen der Retina (hTERT-RPE-1-Zellen) hatte sich nach einstündiger IL-1-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine signifikante Verringerung der Distanzen zwischen den beiden *IL8*-Genloci, zwischen beiden *IL6*-Genloci und zwischen den *IL8*- und *IL6*-Genloci einer Zelle gezeigt (Signifikanzwert (p) $p < 0,01$, Stichprobengröße (n) $n = 2$). Weiterhin konnte eine signifikante Verringerung der Distanz der *IL8*- und *IL6*-Genloci zum Kernzentrum nach einstündiger IL-1-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen gezeigt werden ($p < 0,01$, $n = 2$) (unveröffentlichte Daten der AG Kracht). Um die Distanzen unabhängig von der Kerngröße zu beurteilen, wurden sie als Anteil vom Kernvolumen in Hoechstfärbung angegeben. Bei der Betrachtung des Kernvolumens IL-1 α -stimulierter hTERT-RPE-1-Zellen war im Vergleich zu unstimulierten Zellen ein signifikant höheres Kernvolumen aufgefallen ($p < 0,001$, $n = 2$) (unveröffentlichte Daten der AG Kracht).

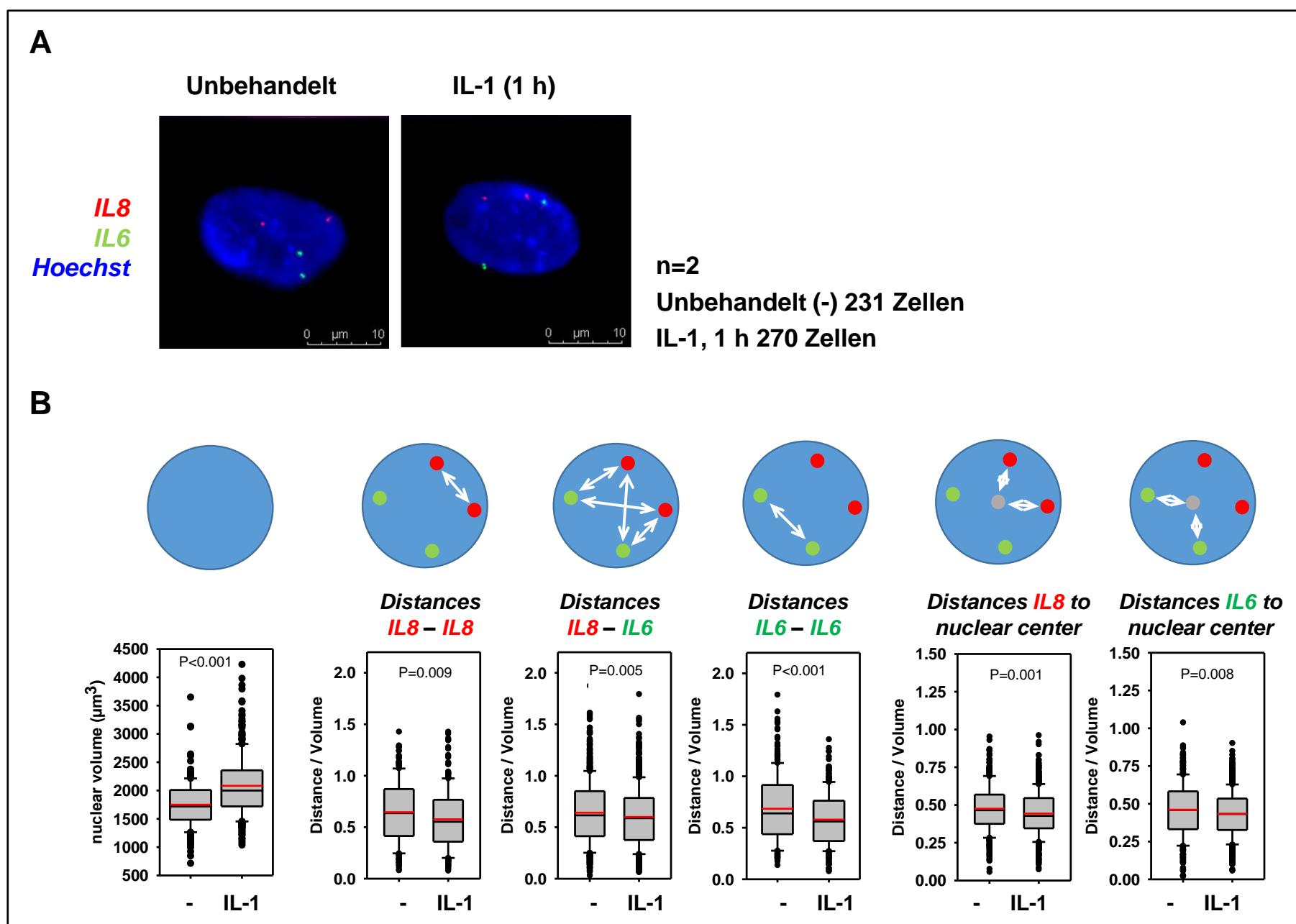


Abbildung 5: Vorangehende Ergebnisse aus Immuno-DNA-FISH: stimulusinduzierte Vergrößerung des Kernvolumens und Verringerung der Distanz zwischen interchromosomalen Genloci.

A: Exemplarische Darstellung von hTERT-RPE-1 Zellkernen nach Durchführung einer Immuno-DNA-FISH mit Sonden für *IL8* und *IL6* DNA-Loci der Firma *Empire Genomics* und einem Primärantikörper für p65 (hier nicht gezeigt) sowie eine Zellkernmarkierung mit Hoechst. Die Zellen wurden in IBIDI *slides* der Firma IBDI ausgesät, für 1h mit Interleukin 1 behandelt oder unbehandelt belassen. DNA-FISH Protokoll wie in (Weiterer et al. 2020) beschrieben. Durchführung zweier technischer Replikate. Anschließende Untersuchung von 231 unbehandelten und 270 behandelten Zellen. Unveröffentlichte Bilder AG Kracht erzeugt durch Anna Beierlein. **B:** Ergebnisse der Messung des Kernvolumens mittels 3D Immunofluoreszenz-Mikroskopie und der LASX Software. Außerdem Darstellung der Distanzen zwischen jeweils zwei *IL8* Genloci, *IL8* und *IL6* Genloci, zwischen zwei *IL6* Genloci und zwischen *IL8* bzw. *IL6* Genloci und dem Kernzentrum. Jeweils schematische Darstellung der gemessenen Distanzen und Darstellung der einzelnen Distanzen normiert auf das Kernvolumen in unstimulierten und 1h mit IL-1 stimulierten Zellen als *Box Plots*. Unveröffentlichte Daten AG Kracht, erzeugt durch Anna Beierlein, Abbildungen erstellt und zur Verfügung gestellt von Michael Kracht.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit und Vorgehensweise

Über eine inflammatorisch induzierbare Regulation von zellulären Parametern wie Genpositionierung im nukleären Raum und Regulation der Kern- bzw. Zellgröße ist nur sehr wenig bekannt. Prälimäre 3D DNA-FISH Daten der AG Kracht zeigten einen schnellen, innerhalb von 1h stattfindenden, Einfluss des Zytokins IL-1 auf die interchromosomale Positionierung der IL-1 Zielgene *IL8* und *IL6*, sowie auf die Regulation der Kerngröße in diploiden, nicht malignen humanen Epithelzelllinien.

Aus diesen Befunden ergaben sich drei weiterführende Fragestellungen, deren Beantwortung das Ziel dieser Arbeit ist:

1. Ob und wie sich die Kern- bzw. Zellgröße in hTERT-RPE-1-Zellen im Rahmen einer Stimulation mit IL-1 zeitabhängig verändern.
2. Ob und wie sich radiale Positionen aktiver, mittels RNA-FISH markierten *IL8*-, *CXCL2*- und *IL6*-Transkriptionsstellen in hTERT-RPE-1-Zellen im Zeitverlauf der IL-1-Stimulation verändern.
3. Ob und wie sich die Positionen aktiver, mittels RNA-FISH markierten *IL8*-, *CXCL2*- und *IL6*-Transkriptionsstellen in hTERT-RPE-1-Zellen zueinander, also in *cis* und in *trans*, im Zeitverlauf nach IL-1-Stimulation verändern.

Das übergeordnete Ziel dieser Untersuchungen ist es, ein besseres Verständnis der nukleären Koregulation von spezifischen, Zytokin-regulierten pro-inflammatorischen Genen im Kontext eines generellen biologischen Prozesses wie der Regulation der Größe des Zellkerns, des Zytoplasmas und der Zellgröße auf Einzelzellebene zu erreichen.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Plastikwaren und Einwegmaterialien wurden von den Firmen *Biosphere*, *ependorf*, *greiner bio-one*, *ibidi*, *nerbe plus*, *pipetman* oder *Sarstedt* bezogen.

2.2 Geräte

Zellkultur

Brutschrank: Heraeus, *Thermo Scientific*, Modell BBD 6220

Sterilwerkbank: *Kendo Laboratory Products*, Modell HS12

Wasserbad: GFL

Mikroskope

Model Dmi8 *automated*, Leica Microsystems CMS GmbH

Model DMIL, Leica Microsystems CMS GmbH

Software

Adobe Photoshop CS2	Version 9.0
<i>open source</i> Icy Bioimaging Software	Version 2.0.2.0.
Leica Application Suite X (LASX)	Version 3.4.2.18368
Sigma Plot	Version 11.0.
Graph Pad Prism	Version 9.1.0.

Andere

Hybridisierungsöfen: Techne Hybridiser HB-1D, thermo-DUX,

Tischzentrifuge: , Zentrifuge 5424, Eppendorf

2.3 Chemikalien, Lösungsmittel, Gebrauchsfertige Reagenzien, Materialien und Kits

(Qualitätsstufe „p.a.“, „Für die Mikrobiologie“ oder „cell culture grade“).

Reagenzien	Endkonzentration	Hersteller	Bestellnummer
4 % Paraformaldehydlösung	4 %	ChemCruz	#sc-281692
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	Sigma Aldrich	#D5879-500ML
<i>Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i>	-	PAN BioTech;	#P04-36500
<i>Fluoromount G</i>	-	invitrogen	#00-4958-02
Glycerol	30 %	VVR Chemicals	#56815
<i>Hank´s Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	-	PAN BioTech	#P04-32505
Hoechst 33342	1 mM	Thermo Fisher Scientific	#H3570
<i>ibiTreat µ-Slide VI 0,4</i>	-	ibidi	#80606
Leptomycin B	20 ng/ml	Santa Cruz Biotechnology	# sc-358688
rekombinates IL-1α	10 ng/ml	AG Kracht	-

<i>normal donkey serum</i>	10 %	Jackson ImmunoResearch	#017-000-121
Saponin	0,005 %	Sigma	#8047-15-2
Trypsin-/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-) Lösung	0,05 % / 0,02%	PAN Biotech	#P10-023100
Triton X-100	0,5 %	MerckKGaA	#90-36-19-5
Tween 20	0,1 %	Sigma Aldrich	#90-05-64-5
<i>View RNA FISH cell assay kit</i>	-	Invitrogen	#QVC0001

2.4 Antikörper

Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Lamin A/C	Maus (ms)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	#sc-3762418
Anti-Lamin B1	Kaninchen (rb)	1:1000	abcam	#ab16048
Anti-LMO7	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology	#sc-3762418
Anti-p65	Ziege (gt)	1:100	Bethyl	#A303-945A
Anti-p65	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology	#sc-80008
Anti-p65	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology	#sc-372

Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Maus-IgG <i>dyelight</i> 488 (DL488)	Esel	1:100	Immuno Reagent	#DKxMu003D488NHSX
Anti-Kaninchen-IgG DL488	Esel	1:100	Immuno Reagent	#DKxRb003D488NHSX
Anti Ziege-IgG Cy3	Esel	1:200	Millipore	#AP182C
Anti-Maus-IgG Cy3	Esel	1:100	Millipore	#AP192C
Anti-Kaninchen IgG Cy3	Esel	1:100	Millipore	#AP182C
Anti-Kaninchen-IgG Cy5	Esel	1:500	Abcam	Ab-977077

2.5 RNA-FISH Sonden

RNA-FISH-Sonde	Type	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
<i>CXCL8</i> intronic	<i>type</i> 1 (rot)	Human	1:100	Affymetrix	#VA1-6000437
<i>CXCL2</i> intronic	<i>type</i> 1 (rot)	Human	1:100	Affymetrix	#VA1-6001011
<i>IL6</i> intronic	<i>type</i> 4 (grün)	Human	1:100	Affymetrix	#VA4-6001007
<i>IL8</i> mRNA	<i>type</i> 6 (violett)	Human	1:100	Invitrogen	#VA6-13192
<i>IL6</i> mRNA	<i>type</i> 6 (violett)	Human	1:100	Affymetrix	#VA6-612712

CXCL2 mRNA	type 4 (grün)	Human	1:100	Affymetrix	#VA4-3086648
------------	---------------	-------	-------	------------	--------------

2.6 Medien und Zusätze

	Hersteller	Bestellnummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12)	gibco	#11320
Fetal bovine serum (FBS)	Pan Biontech	#P40475000

Antibiotikum	Endkonzentration	Hersteller	Bestellnummer
Streptomycin/ Penicillin	100 µg/ml / 100 U/ml	PAN Biotech	#P06-07100
Hygromycin B Gold	100 mg/ml	InvivoGen	#ant-hg-1

DMEM-F12-Vollmedium

500 ml DMEM-F12

- + 100 µg/ml Streptomycin
- + 100 U/ml Penicillin
- + 100 mg/ml Hygromycin B Gold
- + 10 % FBS

Einfriermedium

- 2,5 ml DMEM-F12 Vollmedium
- 0,5 ml DMSO
- 2 ml FBS

2.7 humane Telomerase Immortalisierte Retinale Pigmentierte Epithelzellen Typ 1 (hTERT-RPE-1)

Bei der hTERT-RPE-1-Zelllinie handelt es sich um primäre pigmentierte Retinaepithelzellen einer weiblichen Patientin, die mit einem Plasmid transfiziert worden sind, welches für die *human Telomerase Reverse Transcriptase* (hTERT) codiert (hTERT RPE-1 ATCC® CRL-4000™ Homo sapiens Retina, eye; pigm 2021). Die hTERT verhindert die Verkürzung der Telomere bei der Zellteilung und kann auf diese Weise die normale Lebensspanne der Retinaepithelzellen verlängern, ohne den Karyotyp oder Phänotyp der Zellen zu verändern (Bodnar et al. 1998). In unveröffentlichten DNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsexperimenten der Arbeitsgruppe konnte bestätigt werden, dass die verwendeten Zellen einen diploiden Chromosomensatz besitzen (unveröffentlichte Daten AG Kracht). Die Reaktion der hTERT-RPE1-Zellen auf humanes IL-1α wurde in der Dissertation von V. Maßmann charakterisiert (Maßmann 2021). Dabei zeigte sich, dass nach 1h IL-1α in 80% der Zellen p65 in den Zellkern transloziert war, was ein Marker für die Aktivierung des zytosolischen Teils des IL-1α Signalwegs ist (Maßmann 2021). Diese Beobachtung spricht für eine homogene Reaktion der Zelllinie auf IL-1α in Übereinstimmung mit Bian et al. (Bian et al. 2011). Mit diesen Eigenschaften war das Zellmodell geeignet, um *in vitro* Kerngröße und intranukleäre Distanzen zwischen aktiven Genorten von physiologischen Epithelzellen zu untersuchen. Die verwendeten Zellen wurden aus der AG Schmitz, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen bezogen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

hTERT-RPE-1-Zellen wurden in DMEM-F12-Vollmedium (siehe Kapitel 2.6.) im Brutschrank bei 37 °C, 6 % CO₂ und 96 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Dafür wurde zuerst das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 10 ml DPBS gewaschen, um die Reste des Mediums und das darin enthaltene Serum zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin-/EDTA-Lösung

benetzt, die der enzymatischen Ablösung der adhärennten Zellen von der Zellkulturschale (*detachment*) diene. Dabei katalysiert die Serinprotease Trypsin die hydrolytische Spaltung von Proteinen, die die Zell-Substrat-Adhäsion vermitteln, und EDTA bildet einen Komplex mit den zweiwertigen Kationen Calcium und Magnesium, die die Zell-Substrat-Bindung stabilisieren. Da Trypsin seine maximale Aktivität bei 37 °C erreicht (Schmitz 2020), wurden die Zellen im Brutschrank mit der Trypsin-/EDTA-Lösung inkubiert. Nach ca. 2 Minuten wurde mikroskopisch kontrolliert, ob sich die Zellen abgerundet hatten und im Überstand schwammen. Daraufhin wurde die Enzymaktivität durch 5 ml DMEM-F12-Vollmedium gestoppt und die Zellen in dem Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen pro Milliliter Zellsuspension ermittelt. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Da das Volumen in jedem Quadrat 0,1 mm³ (das entspricht 0,1 µl) betrug, konnte die Zellzahl pro Milliliter berechnet werden, in dem die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat mit 10⁴ multipliziert wurde. Anschließend wurden die Zellen zu definierten Zellzahlen (je 100 mm Schale: 1 Tag: 1,6*10⁶ Zellen, 2 Tage: 7*10⁵ Zellen, 3 Tage: 3*10⁵ Zellen, 4 Tage: 1,5*10⁵ Zellen) in eine neue Zellkulturschale mit DMEM-F12-Vollmedium überführt.

3.1.2 Aussaat von Zellen

Für die indirekte Immunfluoreszenz und die RNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden die Zellen in µ-Slides VI^{0,4} (IbiTreat von ibidi) ausgesät. Dazu wurde eine Zellsuspension von 350.000 hTERT-RPE1-Zellen pro ml eingestellt und davon je 30 µl pro Kanal verwendet, was einer Zellzahl von 10.500 Zellen pro Kanal entspricht. Die Zellen wurden ca. 1 Stunde bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Dann wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen bereits adhärennt waren. Sobald dies der Fall war, wurden die Kanäle mit 100 µl Medium aufgefüllt und die Zellen über Nacht im Brutschrank kultiviert.

3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten hTERT-RPE-1-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturschale mit frischem Vollmedium (siehe Kapitel 2.6.) überführt und wie oben beschrieben kultiviert.

Um die Zellen einzufrieren, wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit vorgewärmtem DPBS gewaschen und mithilfe von Trypsin-/EDTA-Lösung von der Zellkulturschale gelöst. Dann wurden die Zellen in 5 ml DMEM-F12-Vollmedium resuspendiert und 4 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 3 ml warmem Einfriermedium (siehe Kapitel 2.6.) resuspendiert und auf drei Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden in einem Styroporgefäß zellschonend bei -80°C eingefroren und später in flüssigen Stickstoff für eine längerfristige Lagerung überführt.

3.1.4 Behandlung der Zellen mit Leptomycin B

Leptomycin B führt durch die Hemmung des nukleären Exports zu vergrößerten Zellkernen und sollte daher in dieser Arbeit als positive Kontrolle verwendet werden (Jevtić et al. 2019). In einer Konzentration von 20 ng/ml sollte mit Leptomycin B überprüft werden, ob die Kombination aus Immunfluoreszenz und der Auswertung der Mikroskopaufnahmen mit der Icy Bioimaging Software in der Lage ist, Veränderungen der Kerngröße zu detektieren. Die Behandlung der Zellen mit Leptomycin B (Lagerungskonzentration 5 µg/ml gelöst in Ethanol) erfolgte an in µ-Slides VI^{0,4} (Ibi Treat von ibidi) ausgesäten Zellen für die im Ergebnisteil gezeigten Konzentrationen. Zuerst wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen ausreichend konfluent, aber nicht zu dicht waren und keine morphologischen Auffälligkeiten zeigten. Um in den µ-Slides VI^{0,4} die niedrigen finalen Konzentrationen zu erhalten, wurde zunächst eine Vorverdünnung des Leptomycin B in Vollmedium vorgenommen und mit dem Gesamtvolumen im Kanal weiter verdünnt. Anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.1.5 Behandlung der Zellen mit IL-1

Die Stimulation der Zellen mit IL-1α (Endkonzentration 10 ng/ml, Lagerungskonzentration 10 µg/ml) erfolgte an in µ-Slides VI^{0,4} (Ibi Treat von ibidi) ausgesäten Zellen für die im Ergebnisteil gezeigten Zeiten. Zuerst wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen ausreichend konfluent, aber nicht zu dicht waren und keine morphologischen Auffälligkeiten zeigten. Um in den µ-Slides VI^{0,4} eine finale Konzentration von 10 ng/ml zu erhalten, wurde zunächst eine Vorverdünnung des IL-1α von 1:100 in Medium vorgenommen und mit dem Gesamtvolumen im Kanal 1:10 weiter verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für im Ergebnisteil angezeigte Zeiten im Brutschrank inkubiert.

3.2 Zellbiologische Techniken

3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IF) können Proteine und ihre Lokalisation innerhalb einer Zelle unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu werden ausgewählte Proteine mittels primärer Antikörper markiert. An deren Fc-Rezeptoren binden wiederum Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper, deren Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann (Schmitz und Desel 2018).

hTERT-RPE1-Zellen wurden, wie unter Kapitel 3.1.2. beschrieben, in μ -Slides VI^{0,4} (Ibi Treat von ibidi) ausgesät und am darauffolgenden Tag dem Versuchsaufbau entsprechend mit IL-1 α (Endkonzentration: 10 ng/ml) oder Leptomycin B (Endkonzentration: 20 ng/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Im Anschluss wurde die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst noch einmal unter dem Mikroskop auf morphologische Auffälligkeiten kontrolliert. Anschließend wurde das restliche Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 150 μ l HBSS bei Raumtemperatur gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 100 μ l 4 %-iger Paraformaldehydlösung über Nacht bei 4 °C fixiert. Durch Paraformaldehyd werden Proteine und Lipide so denaturiert, dass die zellulären Strukturen weitgehend erhalten bleiben, Zellmembranen aber für Substanzen wie Antikörper durchlässig werden (Schmitz und Desel 2018).

Die nächsten Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dreimal 5 Minuten mit 150 μ l HBSS gewaschen und für 15 Minuten mit 100 μ l des Detergens 0,5 % Triton-X-100 in HBSS permeabilisiert, damit die Antikörper bestmöglich in die Zelle und den Zellkern eindringen konnten (Schmitz und Desel 2018). Das überschüssige Detergens wurde daraufhin entfernt und dreimal 5 Minuten mit je 150 μ l HBSS ausgewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 100 μ l 10 %-igem Serum (generiert im Esel), gelöst in HBSS mit 0,005 % Saponin, für 30 Minuten blockiert, um unspezifische Fluoreszenzsignale zu reduzieren (Schmitz und Desel 2018). Dann erfolgte die Inkubation mit 80 μ l Primärantikörpern über zwei Stunden. Die Primärantikörper wurden hierzu in Verhältnissen zwischen 1:100 und 1:1000 (siehe Kapitel 2.4.) in HBSS mit 0,005 % Saponin gelöst. Daraufhin wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die Zellen dreimal 10 Minuten mit 150 μ l HBSS mit 0,005 % Saponin gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für zwei Stunden mit ebenfalls in HBSS mit 0,005 % Saponin gelösten Sekundärantikörpern inkubiert. Ab diesem Schritt wurde im Dunkeln gearbeitet, um die lichtempfindlichen, an die Antikörper gekoppelten, Fluorophore zu schonen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal 10 Minuten mit 150 μ l HBSS gewaschen und für 5 Minuten mit 100 μ l Hoechst 33342 inkubiert. Hoechst interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert blaue Fluoreszenz. Auf diese Weise ist es möglich die DNA und damit den Zellkern anzufärben (Schmitz und Desel 2018). Danach wurde die Hoechstlösung entfernt, ihre Reste zweimal in 5 Minuten mit 150 μ l HBSS ausgewaschen und die Zellen in 100 μ l einer 30 %-igen Glycerollösung (in HBSS gelöst) eingebettet. Um eventuell vorhandene unspezifische Bindungen und Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, wurde eine negative Kontrolle angefertigt, welche ohne Primärantikörper nur mit HBSS mit 0,005 % Saponin inkubiert und sonst identisch behandelt wurde (Schmitz und Desel 2018). Die Mikroskopie der Zellen erfolgte am folgenden Tag an einem invertierten Fluoreszenzmikroskop der Marke Leica (Modell DMi8 *automated*). Dabei wurden die jeweils schärfsten Schichten als zweidimensionale (2D) Bilder mit der Software LASX aufgenommen und prozessiert, und im Anschluss mit der Icy Bioimaging Software analysiert (siehe Kapitel 3.3.).

3.2.2 RNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die RNA-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (RNA-FISH) ist eine Methode, um spezifische RNA-Abschnitte auf Einzelzellebene nachzuweisen (Schmitz und Desel 2018).

Hierfür werden Sonden, sogenannte *Probe Sets*, verwendet, die aus Nukleinsäurefragmenten bestehen, die spezifisch an die komplementäre Nukleinsäurezielsequenz der fixierten Zellen hybridisieren (Schmitz und Desel 2018). An die *Probe Sets* hybridisieren im nächsten Schritt sequentiell *Pre-Amplifier* und *Amplifier*, die zur Signalverstärkung dienen (Schmitz und Desel 2018). An die *Amplifier* binden als letztes Fluorophore, die *Label Probes*, deren Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops als punktförmiges Signal detektierbar ist (ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit 2023). Dabei kann jedes Signal als einzelnes RNA-Molekül betrachtet und daher für die Quantifizierung der mRNA-Menge auf Einzelzellebene verwendet werden (Femino et al. 1998).

In dieser Dissertation wurden *Probe Sets* verwendet, die hochspezifisch zum einen an mRNA-Sequenzen und zum anderen an Introns der ungespleißten prä-mRNA binden. Diese wurden speziell von der Firma Affymetrix designt. Prä-mature mRNA, die noch aus Introns und Exons besteht, wird noch während des Transkriptionsprozesses vom sogenannten Spleißosom prozessiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Spleißosomen direkt an der aktiven Transkriptionsstelle befinden (Huang und Spector 1996). Demzufolge befinden sich auch die, durch die Bindung der Sonden an intronische mRNA-Abschnitte markierten, prä-mRNA-Moleküle direkt an der aktiven Transkriptionsstelle und werden im Folgenden als aktive Genloci bezeichnet. Besonders die Kolo-kalisation von mRNA und dazugehöriger prä-mRNA kann als spezifischer Hinweis auf eine aktive Transkriptionsstelle (ATS) betrachtet werden.

Die Aussaat, Behandlung und Fixierung der hTERT-RPE-1 Zellen erfolgte analog zum Protokoll der IF und entsprechend dem jeweiligen Versuchsaufbau (vergleiche Kapitel 3.2.1.).

Am auf die Aussaat und Fixierung der Zellen folgenden Tag wurde die Paraformaldehydlösung entfernt und die Reste dreimal 3 Minuten mit 150 μ l PBS ausgewaschen. Dann wurde die Zellmembran mit 100 μ l des Detergens Tween 20 (1:1000 in PBS verdünnt) über 5 Minuten permeabilisiert. Anschließend wurde das Detergens entfernt und die Zellen zweimal 3 Minuten mit 150 μ l PBS gewaschen. Um eine bessere Zugänglichkeit der prä-mRNA für die verwendeten Sonden zu gewähren, wurden putativ an die prä-mRNA gebundene Proteine durch

zehnminütige Inkubation der Zellen mit der Proteinase K (1:800 verdünnt in PBS) enzymatisch entfernt (Angerer und Angerer 1991). Nach dieser Inkubationszeit wurde das Enzym entfernt und seine Reste dreimal 3 Minuten mit 150 µl PBS ausgewaschen.

Danach erfolgte die Hybridisierung mit 50 µl der vorgewärmten *Probe Sets*, die in einer Verdünnung von 1:100 in einem speziellen *Probe Set Diluent* gelöst waren, bei 40°C für 3 Stunden. Diese Temperatur diente der Beschleunigung der Hybridisierung der *Probe Sets* an die RNA und damit der Vermeidung unspezifischer Hybridisierungen (Angerer und Angerer 1991).

Nach 3 Stunden wurden die *Probe Sets* entfernt und die Zellen dreimal für 3 Minuten mit 150 µl Waschpuffer gewaschen, um überschüssige *Probe Sets* zu entfernen und dadurch unspezifische Bindungen zu reduzieren (Schmitz und Desel 2018). Dann wurden die Zellen 30 Minuten lang mit 50 µl *Pre-Amplifiern* (1:30 verdünnt in *Amplifier Diluent*) bei 40°C inkubiert, dreimal für 3 Minuten mit 150 µl Waschpuffer gewaschen und für 30 Minuten bei 40°C mit 50 µl *Amplifiern* (1:30 verdünnt in *Amplifier Diluent*) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer für 3 Minuten erfolgte die Hybridisierung mit den *Label Probes*. Dabei wurde im Dunkeln gearbeitet, um zu verhindern, dass die an den *Label Probes* befindlichen Fluorophore ausbleichen (Schmitz und Desel 2018). Die Zellen wurden bei 40°C 30 Minuten lang mit 50 µl *Label Probes* (1:30 verdünnt in *Label Probe Diluent*) inkubiert. Anschließend wurden die *Label Probes* entfernt und die Zellen zweimal 2 Minuten und einmal 10 Minuten mit 150 µl Waschpuffer gewaschen.

Danach wurden die Zellkerne angefärbt, indem die Zellen 5 Minuten lang mit 100 µl 1 µM Hoechst inkubiert wurden. In den letzten Schritten wurde die Hoechst-Lösung entfernt und ihre Reste zweimal in 5 Minuten mit PBS ausgewaschen und Zellen in 100 µl *Fluoromount G* (Affymetrix) eingebettet. *Fluoromount G* gehört zu den *Anti-Fading*-Reagenzien, die durch eine Kombination von Glycerin, physiologischen Puffern und Antioxidantien das Ausbleichen der Fluorophore verringern (Schmitz und Desel 2018). Dies ist vor allem für die instabilen Cyanin (Cy)5-Signale hilfreich.

Für die Mikroskopie der Zellen am folgenden Tag und die Bearbeitung der Aufnahmen wurde das *Dmi8 automated* Mikroskop von Leica mit der LASX Software von Leica genutzt. Damit wurden zum einen 2D Aufnahmen der jeweils schärfsten Ebene gemacht, als auch dreidimensionale (3D) Aufnahmen erstellt. Für die 3D-Aufnahmen wurden automatisiert pro Bild über eine Höhe von 30 µm insgesamt 60 Aufnahmen im Abstand von 500 nm gemacht, aus denen durch die LASX Software ein 3D Bild erstellt wurde (Finn et al. 2017).

3.2.3 Immuno-RNA-FISH

Um sowohl Proteine als auch spezifische RNA-Sequenzen in derselben Probe fluoreszenzmikroskopisch zu detektieren, wurden IF und RNA-FISH kombiniert. Die Aussaat, Behandlung und Fixierung der hTERT-RPE-1 Zellen erfolgte analog zum Protokoll für die IF (vergleiche Kapitel 3.2.1.). Anschließend wurde zuerst die RNA-FISH wie oben beschrieben durchgeführt und, nachdem die *Label Probes* zweimal 2 Minuten und einmal 10 Minuten mit Waschpuffer ausgewaschen worden waren, die IF angeschlossen. Dafür wurden die Zellen zunächst zweimal 1 Minute mit 0,005% Saponin in HBSS gewaschen und dann 15 Minuten mit 0,5% Triton-X-100 in HBSS permeabilisiert. Die folgenden Schritte waren zum oben geschilderten Vorgehen identisch, abgesehen davon, dass die Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern bei 37 °C stattfand, und auf diese Weise auf jeweils eine Stunde verkürzt werden konnte. Zuletzt wurden die Zellen in *Fluoromount G* eingebettet.

3.3 Computergestützte Analyse der Immunfluoreszenz- und RNA-FISH-Experimente mit Icy Bioimaging Software

Um eine standardisierte Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen durchzuführen, wurde die frei verfügbare Software Icy Bioimaging Software (Chaumont et al. 2012) genutzt. Die verschiedenen Tools der Software ermittelten Flächen, Umfänge, Intensitäten und Distanzen und erfassten, quantifizierten und lokalisierten Signale und Kollokationen. Diese Parameter wurden in Excel zusammengeführt und einzelnen Zellen zugeordnet, sodass am Ende eine ausführliche und nachvollziehbare Charakterisierung einzelner Zellen möglich war. Die detaillierte Vorgehensweise und Informationen zu den genutzten *tools* finden sich im folgenden Abschnitt.

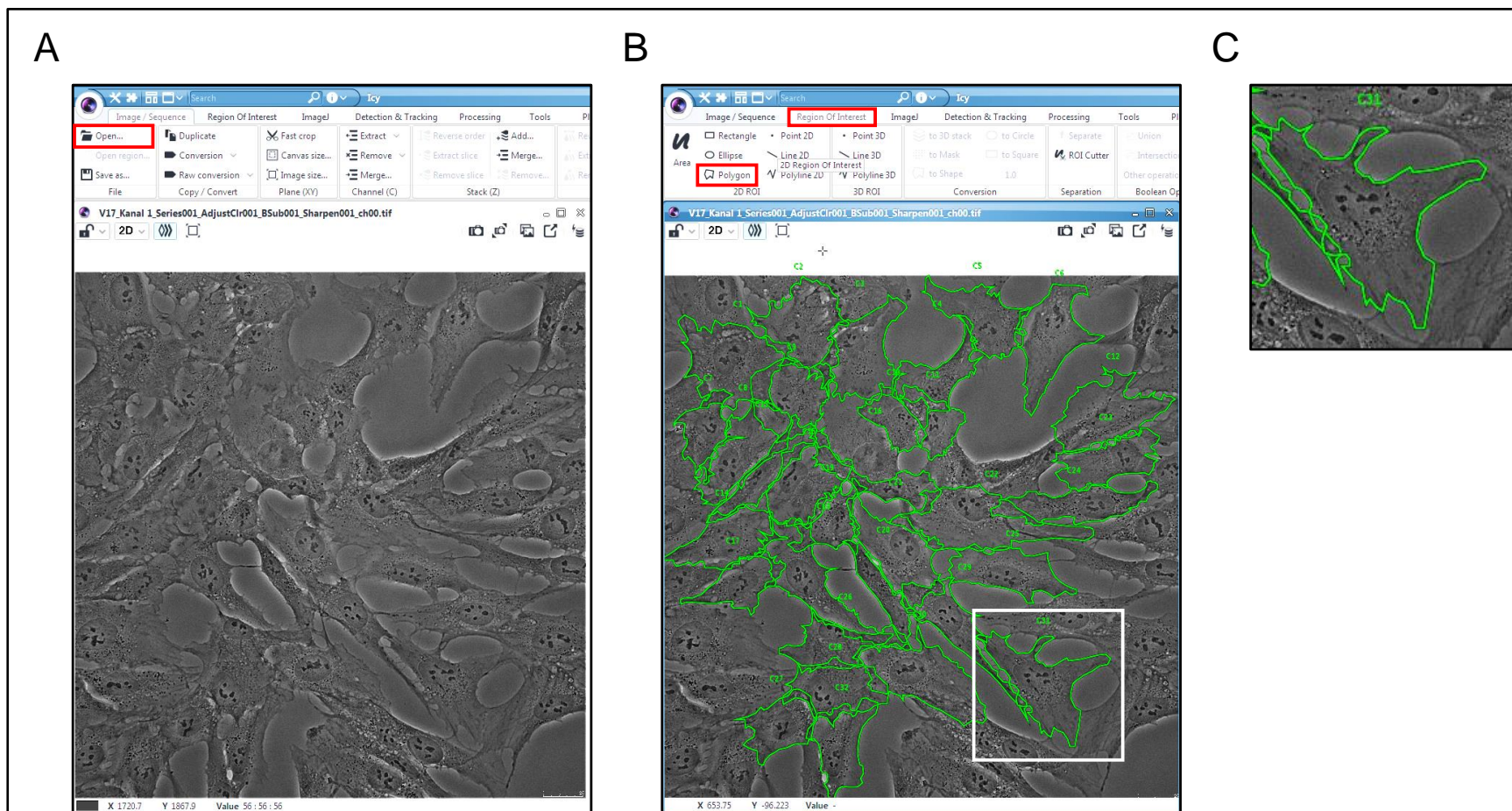
3.3.1 Definition der Zellgrenzen

Zunächst wurden Zellgrenzen manuell anhand des Phasenkontrastes umrandet, als „*Region of Interest*“ (ROI) definiert und durchnummeriert (Abb. 6), um unvoreingenommen die Zellgrenzen zu bestimmen und anhand dieser die Zellfläche, die Fluoreszenzintensität und die in der Zelle enthaltenen mRNA-Signale zu ermitteln. Verschiedene Parameter dieser ROI wurden mit dem

Abbildung 6: Definition der Zellgrenzen mit Icy Bioimaging Software.

Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source bioimaging* Software Icy. 400x Vergrößerung. Phasenkontrast. **A:** In die Software geladenes Bild. **B:** Umrandung der Zellgrenzen als ROI mit dem *tool* „ROI polygon“ (rote Umrandungen). Weißer Kasten: Markierung der beispielhaft vergrößerten Zelle aus C. **C:** Beispielhaft vergrößerte umrandete Zelle.

tool „ROI statistics“ erhoben (Abb. 7H). Die Zellgrenzen-ROI wurden für die Weiterverwendung gespeichert.



3.3.2 Definition der Zellkerngrenzen

Um die Kernfläche zu messen und im Kern enthaltene Proteine, mRNA-Signale und prä-mRNA zu detektieren, wurden die Kernumrisse anhand von einer Hoechstfärbung oder der immunologischen Markierung der Kernlamina bestimmt. Dafür wurde das *tool* „active contours“ der Software verwendet, welches in der Lage ist eine initiale Kontur, die um eine Struktur gezeichnet wurde oder die das Programm generiert hat, automatisch so anzupassen, dass die Grenzen dieser Struktur genau umrandet werden (Dufour et al. 2011) (Abb. 7E, F). Diese Kontur kann als ROI definiert werden und wurde entsprechend der Zellgrenzen-ROI nummeriert, um die Informationen später einzelnen Zellen zuordnen zu können (Abb. 7G). Auch die Kerngrenzen-ROI wurden für die Weiterverwendung gespeichert. Bevor das *tool* „active contours“ genutzt werden konnte, musste der Kontrast zwischen den Zellkernen und dem Hintergrund verstärkt werden. Dies wurde erreicht, indem zunächst ein Schwarz-Weiß-Bild erzeugt wurde (Abb. 7A), welches anschließend mit dem *tool* „Thresholder“ in ein binäres Bild umgewandelt wurde (Abb. 7B, C). Die dafür gewählten Einstellungen wurden für jedes Replikat optimiert und innerhalb eines Replikates konstant gehalten.

Über das *tool* „ROI statistics“ konnten verschiedene Parameter der Kerngrenzen- und Zellgrenzen-ROI erfasst werden (Abb. 7H), die in Excel exportiert wurden. Als Parameter für die Kern- bzw. Zellgröße wurde der Parameter *area* (Fläche in Pixel (px)) und für die Messung intranukleärer Distanzen die X-, Y-Koordinaten der Mittelpunkte der Zellkern-ROI bestimmt.

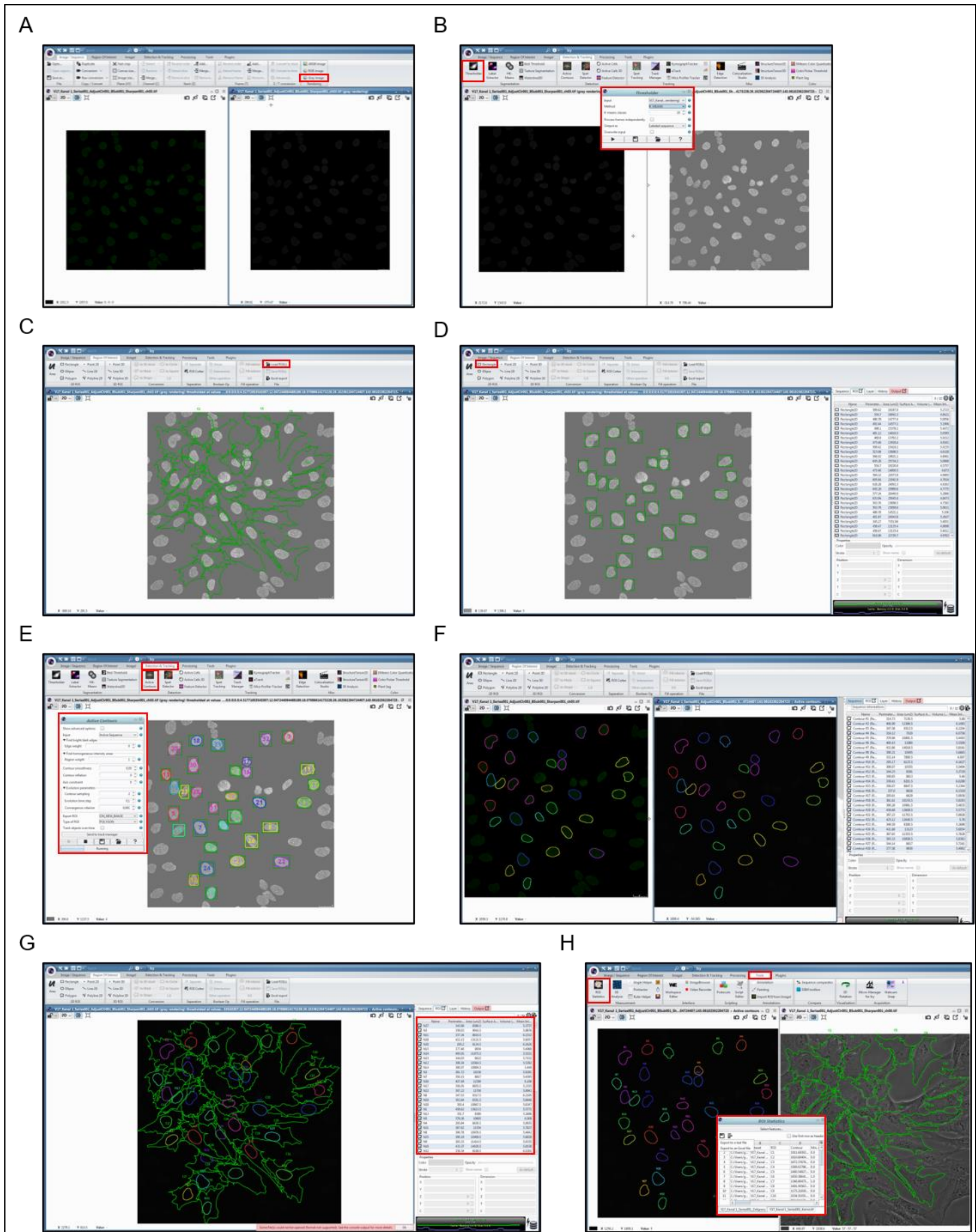


Abbildung 7: Definition der Kerngrenzen mit der Icy Bioimaging Software.

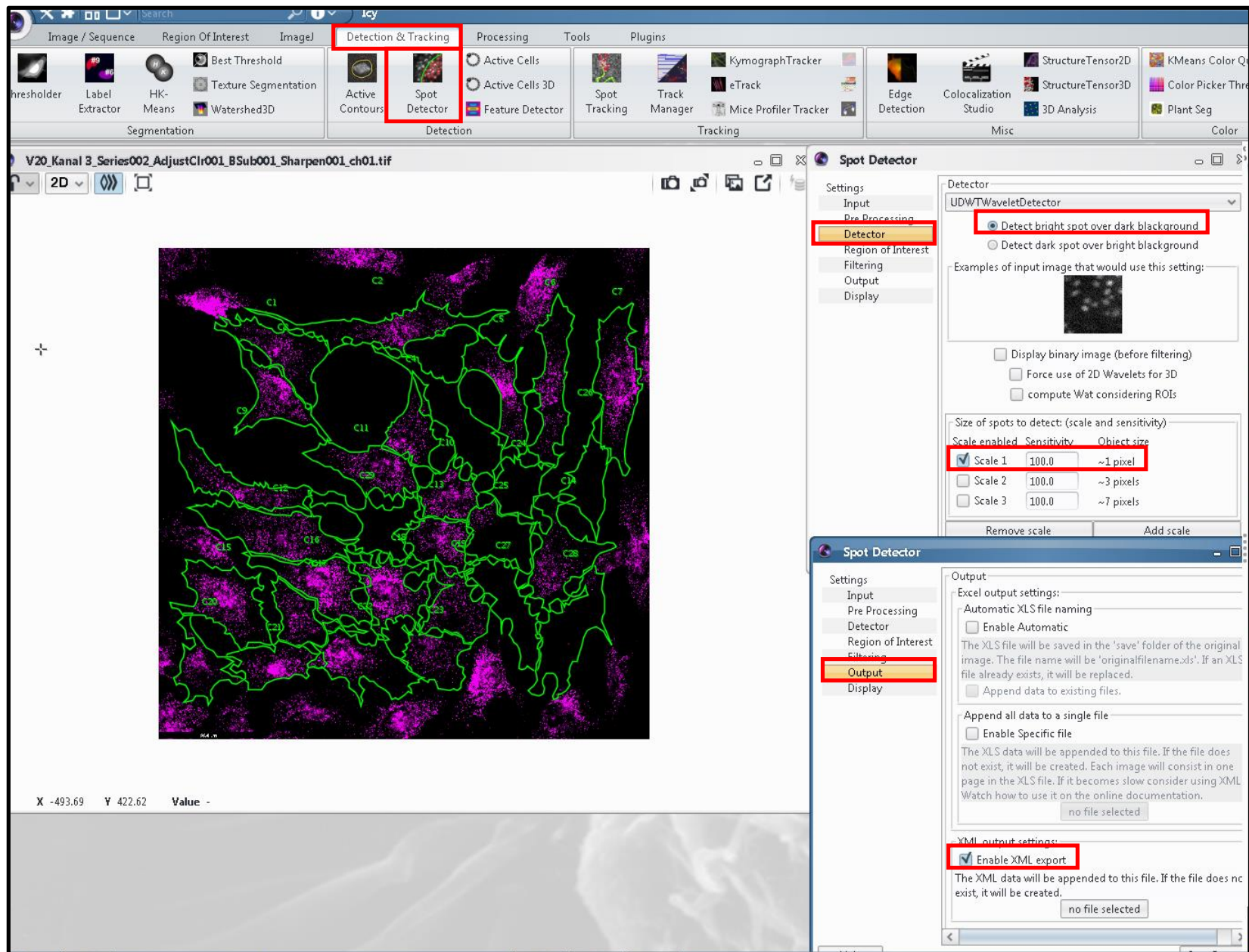
Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source* Software Icy. 400x Vergrößerung. IF mit Primärantikörpern für Lamin A/C. Entscheidende Schaltfelder und Einstellungen sind jeweils rot umrandet. **A:** Links: Zellkerne markiert durch Lamin A/C-Antikörper. Rechts: Erzeugung eines Schwarz-Weiß-Bildes durch die Funktion „grey image“. **B:** Links: Schwarz-Weiß-Bild aus A. Rechts: Binäres Bild nach Anwendung des *tools* „threshold“ mit markierten Einstellungen. **C:** Laden der Zellgrenzen-

ROI in das Bild nach Anwendung des *tools* „*thresholder*“. **D:** Umrandung der Zellkerne der eingeschlossenen Zellen mit rechteckigen ROI. **E:** Aktivität des *tools* „*active contours*“ mit den markierten Einstellungen. **F:** Ergebnis der Anpassung der Kerngrenzen: rechts: unverändertes Ergebnis. links: Die Übertragung der Kerngrenzen-ROI in das ursprüngliche Bild mit durch Lamin A/C-Antikörpern markierten Zellkernen zeigt, dass die Kerngrenzen gut übereinstimmen. **G:** Nummerierung der Kerne analog zu den Zellen. **H:** Nutzung des *tools* „*ROI statistics*“ um erwünschte Parameter in Excel zu exportieren.

3.3.3 Erfassung der mRNA-Menge pro Zelle und Kern

Die mRNA-Menge in der Zelle und im Kern wurde auf zwei verschiedene Weisen bestimmt: zum einen durch die Messung der Intensität der Cy5-Fluoreszenz, welche der RNA-FISH-Markierung entspricht, zum anderen durch die Detektion der einzelnen mRNA-Signale pro Zelle bzw. im Zellkern der Zelle. Für beide Ansätze wurden als erstes die gespeicherten Zellgrenzen-ROI und Zellkern-ROI in das Bild für den Cy5-Kanal geladen. Dann wurde für die Messung der Intensität das *tool* „*ROI statistics*“ genutzt, welches die „*Sum intensity*“ (die Gesamtintensität der Cy5-Fluoreszenz) innerhalb dieser Fläche bestimmte. Für die Detektion und Quantifizierung einzelner mRNA-Signale wurde das *tool* „*spot detector*“ (Olivo-Marin 2002) verwendet (Abb. 8A) und die Ergebnisse (Abb 7B) in Excel exportiert. Die vorgenommenen Einstellungen (vgl. Abb. 8A) wurden für jedes Replikat so optimiert, dass möglichst viele, aber ausschließlich sichtbare Signale detektiert und in der Kontrolle ohne *Probe Sets* keine Signale erkannt wurden. Die Einstellungen wurden innerhalb eines Replikates konstant gehalten. Auf dieselbe Weise erfolgte die Quantifizierung der Signale innerhalb des Zellkerns.

A



B

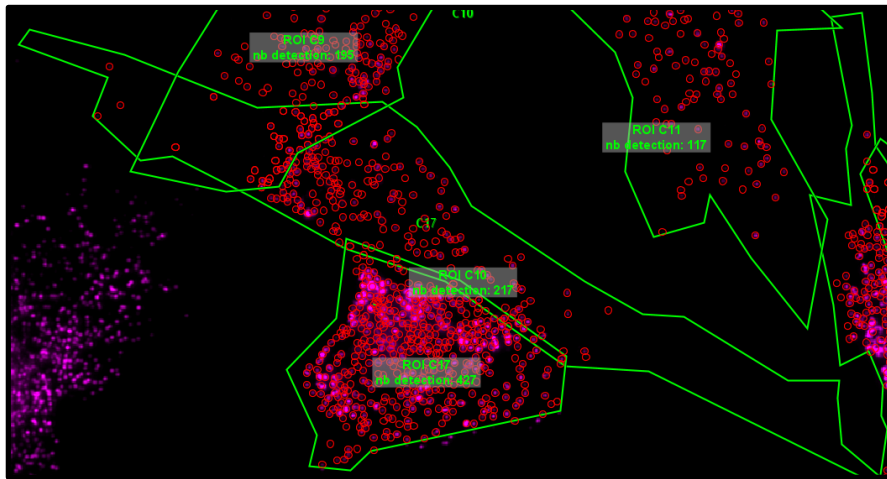


Abbildung 8: Detektion der mRNA-Signale pro Zelle mit der Icy Bioimaging Software.

Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source* Software Icy. RNA-FISH. 400x Vergrößerung. *IL8* mRNA. **A:** Nutzung des tools „Spot detector“ mit den markierten Einstellungen (rote Umrandungen). **B:** Exemplarische Darstellung der detektierten Signale

3.3.4 Erfassung der prä-mRNA-Signale und Berechnung intranukleärer Distanzen

Als prä-mRNA-Signale und damit aktive Genloci wurden Fluoreszenzsignale definiert, die sich durch Größe und Intensität vom Hintergrund und von multiplen kleineren Signalen unterschieden. Diese kleineren Signale kamen oft in enger räumlicher Nähe zu den prä-mRNA-Signalen, aber auch teilweise in Zellen ohne deutliches prä-mRNA-Signal vor. Vermutlich handelte es sich bei ihnen um herausgespleißte Introns, an die die für intronische Abschnitte codierenden Sonden hybridisiert hatten. Diese kleineren Signale wurden in den im Ergebnisteil dargestellten Analysen nicht berücksichtigt. In Abbildung 9A werden Beispiele für subjektiv als prä-mRNA-Signale definierte Signale und unspezifische Signale gezeigt.

Zum einen sollten die detektierten prä-mRNA-Signale pro Zelle quantifiziert werden. Zum anderen sollte ihre Position im intranukleären Raum und zueinander erfasst werden. Dazu wurden verschiedene Distanzen berechnet: die absolute Distanz zum Kernzentrum, die absolute Distanz zur Kernperipherie, absolute Distanzen zwischen zwei prä-mRNA Signalen, die relative Position der prä-mRNA-Signale im intranukleären Raum zwischen Kernzentrum und Kernperipherie (Abb. 9B).

Die absolute Distanz zwischen zwei Punkten, wie zum Beispiel zwischen dem Kernzentrum und einem prä-mRNA-Signal oder zwischen zwei prä-mRNA-Signalen, kann über die X- und Y- Koordinaten dieser Punkte mit Hilfe des Satzes des Pythagoras berechnet werden. Die Signale oder der Kernmittelpunkt werden als Punkte in einem Koordinatensystem betrachtet, welche die Koordinaten X und Y haben. Die Distanz d zwischen den beiden Punkten, kann als Hypotenuse (normalerweise c, hier schon als Distanz d bezeichnet) eines rechtwinkligen Dreiecks betrachtet werden, welches die beiden Seiten a und b hat (Abb. 9C)

Im rechtwinkligen Dreieck gilt der Satz des Pythagoras: $d^2 = a^2 + b^2$

Die Länge d der Hypotenuse kann durch Umstellung des Satzes des Pythagoras berechnet werden:

$$d = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Sind nicht die Strecken a und b, sondern die Koordinaten der Endpunkte der Hypotenuse bekannt, können die Strecken a und b wie folgt berechnet werden:

$$a = x_2 - x_1$$

$$b = y_2 - y_1$$

Diese Terme können in die Formel für d eingesetzt werden:

$$\text{absolute Distanz } d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$$

Um die Distanzen aus verschiedenen Zellen unterschiedlicher Größe miteinander vergleichen zu können, wurden die absoluten Distanzen in relative Distanzen umgerechnet, in dem sie auf die Kernfläche bezogen wurden:

$$\text{relative Distanz } d = \frac{\sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}}{\text{Kernfläche } A}$$

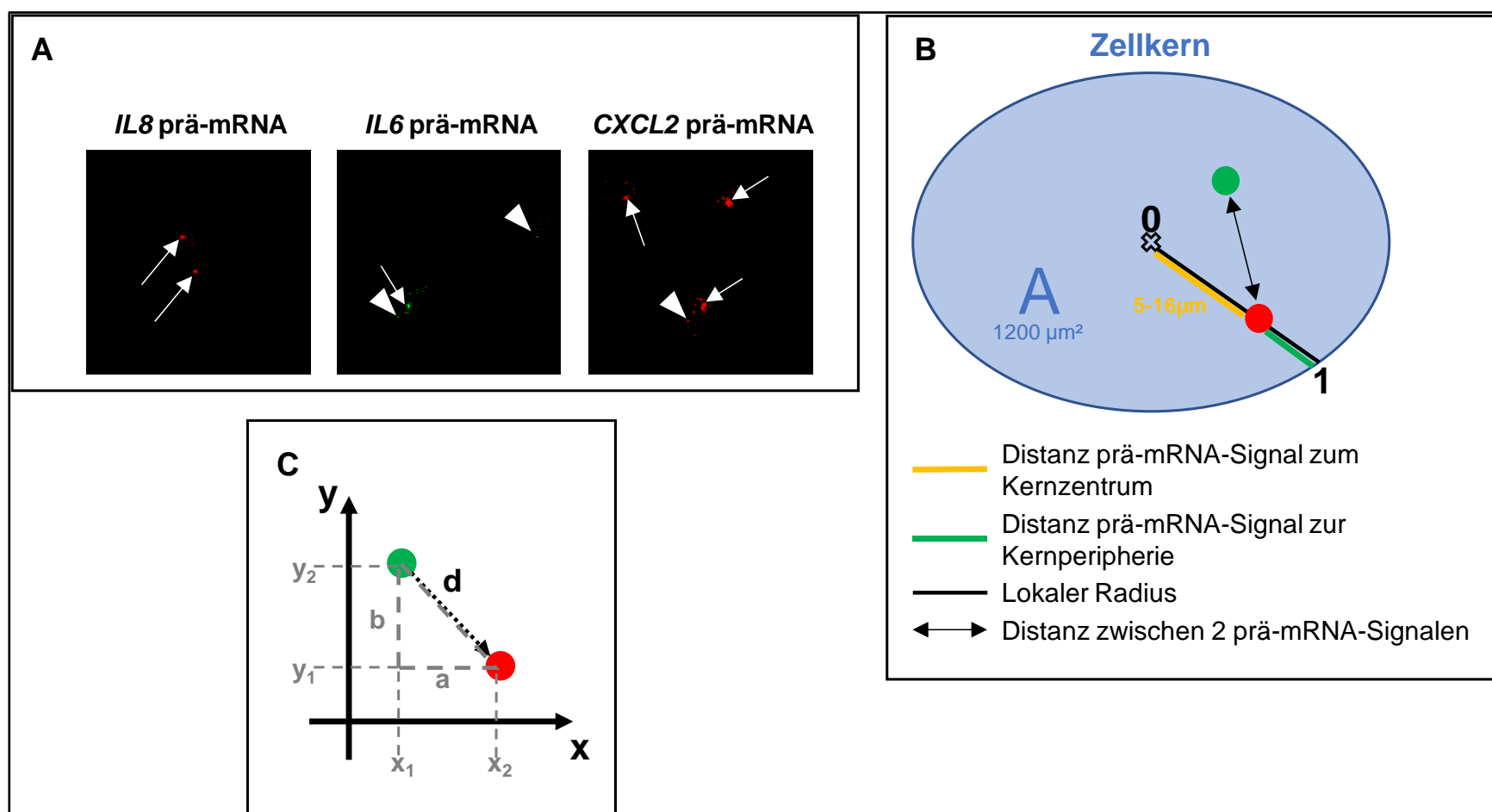


Abbildung 9: Visualisierung der Vorannahmen für die Detektion von prä-mRNA-Signalen und die Berechnung intranukleärer Distanzen.

Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source* Software Icy. **A.:** hTERT-RPE1-Zellen. RNA-FISH mit Sonden für *IL8*, *IL6* oder *CXCL2* prä-mRNA. 400x Vergrößerung. Beispiele für prä-mRNA-Signale und unspezifische Signale. Pfeil: prä-mRNA-Signal. Pfeilspitzen: unspezifisches Signal. **B.:** Schematische Darstellung der bestimmten Distanzen. **C.:** Veranschaulichung zur Herleitung der Formel für die Berechnung intranukleärer Distanzen

Die Anzahl der prä-mRNA-Signale pro Zellkern und ihre Distanz zur Kernperipherie wurde mit dem *tool* „inclusion analysis“ der *Icy Bioimaging Software* (Yhello 2020) ermittelt. Dieses *tool* bestimmt die Anzahl der ROI, die von einer bestimmten ROI umgeben sind. Zusätzlich ermittelt es die, entlang des lokalen Radius liegende, absolute Distanz des Mittelpunktes der inneren ROI zum Rand der äußeren ROI (Abb. 9B, 9C). Diese absolute Distanz gibt das *tool* außerdem als relative Distanz, bezogen auf den lokalen Radius, als

dimensionslosen Wert zwischen 0 und 1 an, wobei 0 für eine maximal zentrale Position und 1 für eine maximal periphere Position steht (Abb. 9B).

Zu Beginn der Analyse wurde der Kontrast der Signale erhöht, in dem ein Schwarz-Weiß-Bild erstellt wurde (Abb. 7A). Die prä-mRNA-Signale wurden mit Hilfe des tools „spot detector“ detektiert. Dieses tool ermöglicht die Erkennung von Signalen mit bestimmter Intensität und Größe über die Einstellung von Größe und Sensitivität und damit die Unterscheidung zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen. Die Einstellungen wurden für jedes Replikat und Gen optimiert und innerhalb der Replikate konstant gehalten. Um die prä-mRNA-Signale zu quantifizieren und die X-, Y-Koordinaten der Mittelpunkte der prä-mRNA-Signale zu bestimmen, sollten die prä-mRNA-Signale als ROI deklariert werden. Dies kann automatisch durch die Software vorgenommen werden. Da der Mittelpunkt der automatisch erstellten ROI jedoch häufig nicht mit den tatsächlichen sichtbaren Mittelpunkten der Signale übereinstimmte, wurde entschieden, die ROI der detektierten Signale manuell festzulegen. Da die Einstellungen nicht hundertprozentig optimiert werden konnten, wurden Einstellungen akzeptiert, bei denen geringfügig mehr prä-mRNA-Signale detektiert wurden als durch den Betrachter im Bild erkennbar waren. Während der manuellen Festlegung der ROI wurden detektierte Signale, die im Bild subjektiv nicht als solche erkannt wurden, aussortiert. Das nachträgliche Einfügen von zuvor nicht detektierten Signalen erfolgte nicht (Abb. 10B). Dadurch wurde die falsch positive Erkennung von prä-mRNA-Signalen geringgehalten.

Nachdem die prä-mRNA-Signale detektiert worden waren, wurde die X-, Y-Koordinate der prä-mRNA-Signale durch das tool „ROI statistics“ angegeben. Weiterhin wurde, durch das tool „inclusion analysis“, die Anzahl der Signale pro Zellkern quantifiziert, und ihre Distanz zur Kernperipherie sowie die relative Orientierung der Signale im nukleären Raum angegeben (Abb. 10C). Diese Parameter wurden den einzelnen Zellen zugeordnet und die relativen Distanzen der prä-mRNA-Signale untereinander und zum Kernzentrum, wie oben beschrieben, berechnet.

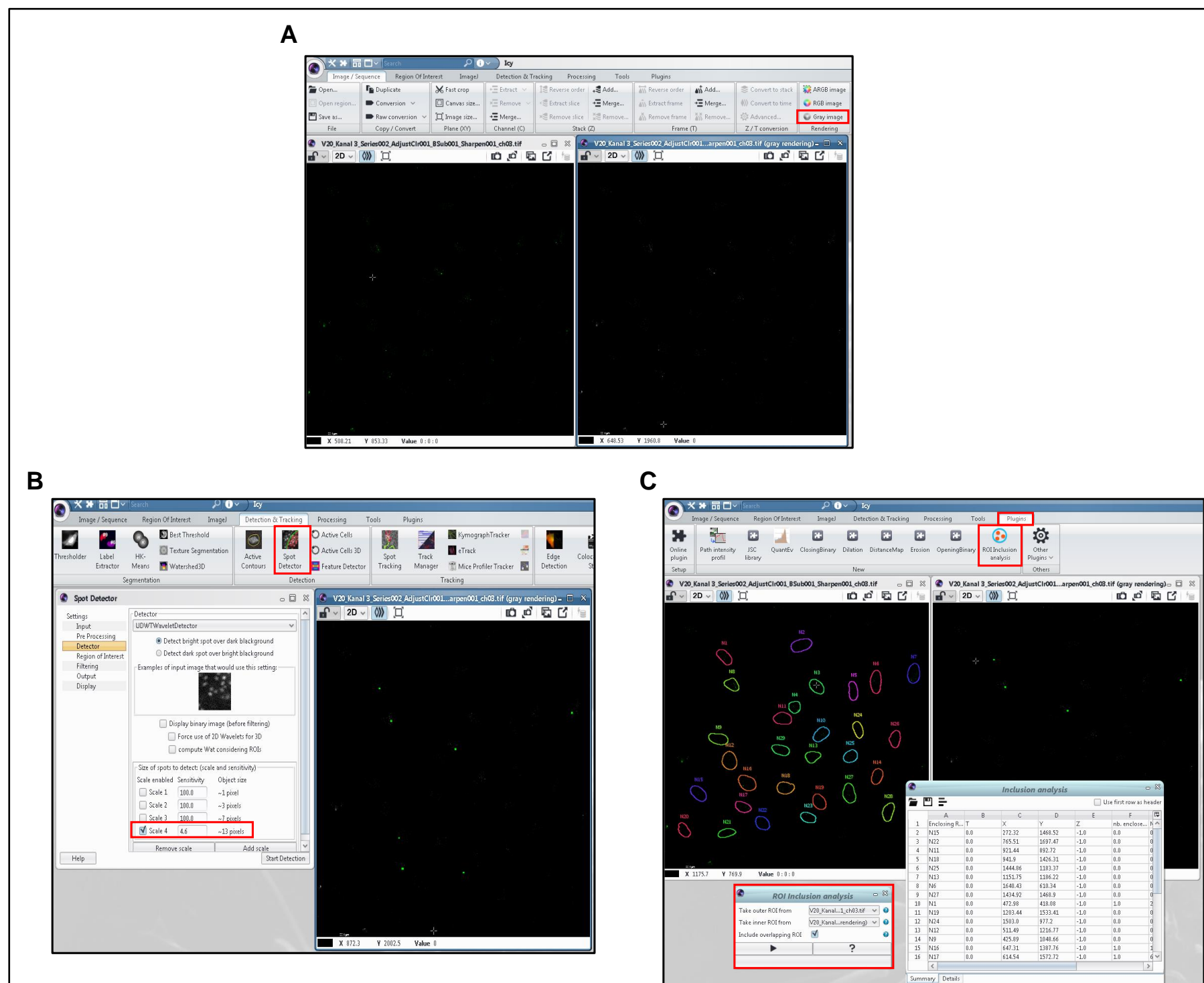


Abbildung 10 Erfassung der prä-mRNA Signale mit Icy Bioimaging Software.

Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source* Software Icy. 400x Vergrößerung. **A:** Links: Originalbild *IL6* prä-mRNA-Kanal. Rechts: Schwarz-Weiß-Bild. **B:** Detektion der prä-mRNA-Signale und Definition als ROI mit den markierten Einstellungen. **C:** Quantifizierung und Bestimmung der radialen Distanzen mittels des tools „*inclusion analysis*“. Links: äußere ROI (Zellkerne) Rechts.: innere ROI (prä-mRNA-Signale).

3.3.5 Erfassung der Kolokalisationen von prä-mRNA und mRNA

In dieser Arbeit wurden Kolokalisationen aus der mRNA und der prä-mRNA eines Genes genutzt, um spezifisch ATS zu erkennen (siehe Kapitel 3.2.2.). Beispiele für Kolokalisationen von *IL8* bzw. *IL6* prä-mRNA und mRNA sind in Abb. 11A gezeigt. Um diese Kolokalisationen zu bestimmen, wurde das tool „*colocalization studio*“ verwendet (Lagache et al. 2015; Lagache et al. 2018). Dieses tool berechnet über statistische Verfahren die Distanz zwischen zwei Punkten verschiedener Populationen (zum Beispiel Punkt 1 aus der mRNA-Population und Punkt 2 aus der prä-mRNA Population) und vergleicht diese statistisch mit der Distanz, die anzunehmen wäre, wenn die zwei Punkte sich zufällig im Raum befinden würden. Ist die berechnete Distanz signifikant kleiner als die bei Zufälligkeit wahrscheinliche, werden die Punkte als Kolokalisation deklariert (Lagache et al. 2015).

Im ersten Schritt wurden, wie in Kapitel 3.3.3. und Kapitel 3.3.4. beschrieben, mRNA- und prä-mRNA-Signale detektiert und in einer Zwischenablage („*Swimming Pool*“) zwischengespeichert (Abb. 11B links). Im *Colocalization Studio* wurden diese Signale, wie in Abb. 10B rechts dargestellt, hinterlegt. Die Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse wurden als ROI ausgegeben (Abb. 11C rote ROI). In den letzten Schritten wurde kontrolliert, ob die detektierten Kolokalisationen mit den zuvor definierten prä-mRNA-ROI übereinstimmten. Dazu wurden die prä-mRNA-ROI in das Bild übertragen (Abb. 11C grüne ROI) und vermeintliche Kolokalisationen aussortiert, bei denen prä-mRNA-ROI und errechnete Kolokalisations-ROI nicht übereinstimmten. (Abb. 11C). Analog zu den prä-mRNA-ROI wurden alle Parameter erhoben, um die intranukleären Distanzen zu berechnen (vergleiche Kapitel 3.3.4.).

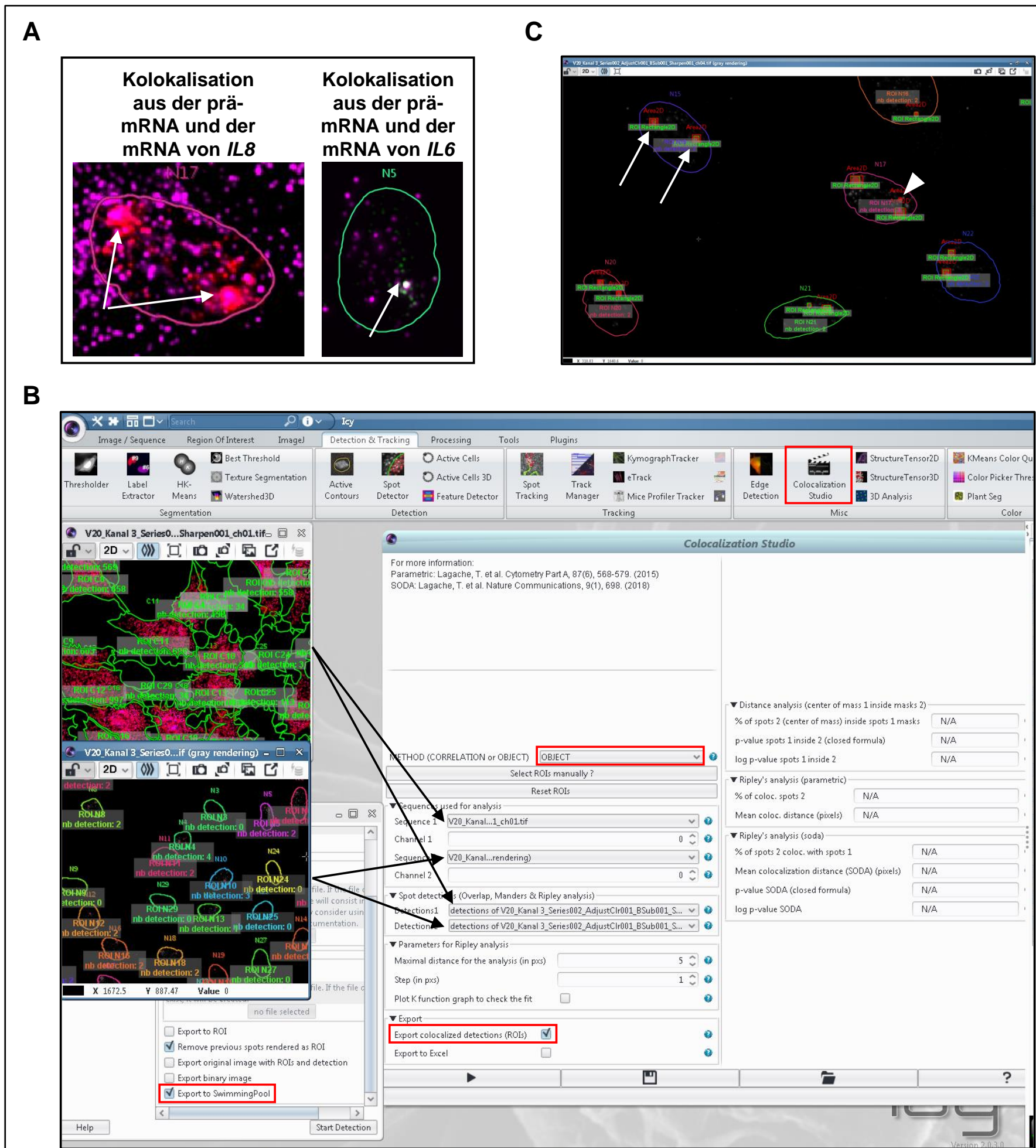


Abbildung 11: Erfassung von Kolokalisationen mit Icy Bioimaging Software.

Bildanalyse von hTERT-RPE-1 Zellen mit Hilfe der *open source* Software Icy. 400x Vergrößerung. **A:** Beispiel für Kolokalisationen der *IL8*- bzw. *IL6* prä-mRNA und der korrespondierenden mRNA. **B:** Nutzung des tools „Colocalization Studios“. Links: Mittels „Spot Detector“ detektierte mRNA und prä-mRNA Signale, die in den Zwischenspeicher exportiert wurden. Rechts: „Colocalization Studio“ mit allen Einstellungen (rote Markierungen). Die Ergebnisse des „Spot Detectors“ wurden entsprechend der Pfeile zugeordnet. **C:** Validierung der Kolokalisationen: Errechnete Kolokalisationen (rote ROI) und prä-mRNA-ROI (grüne ROI). Übereinstimmungen definieren tatsächliche Kolokalisationen (Pfeile). Fehlende prä-mRNA über errechneter Kolokalisation war ein falsch-positives Ergebnis und wurde aussortiert (Pfeilspitze).

3.3.6 Berechnungen zusätzlicher Parameter

Um die Fläche des Zytoplasmas zu ermitteln, wurde die Differenz aus den Flächen der Gesamtzelle ($A(\text{Zelle})$) und des Zellkerns ($A(\text{Kern})$) gebildet:

$$A(\text{Zytoplasma}) = A(\text{Zelle}) - A(\text{Zellkern})$$

Um die Gesamtintensität im Zytoplasma zu bestimmen, wurde die Differenz aus den Intensitäten der Gesamtzelle ($I(\text{Zelle})$) und des Zellkerns ($I(\text{Kern})$) gebildet:

$$I(\text{Zytoplasma}) = I(\text{Zelle}) - I(\text{Zellkern})$$

Um das Verhältnis aus Kern- und Zellfläche (K-/Z-Verhältnis der Fläche) zu berechnen, wurde die Kernfläche ($A(\text{Kern})$) durch die Zellfläche ($A(\text{Zelle})$) dividiert:

$$\frac{K}{Z} \text{Verhältnis} = \frac{A(\text{Kern})}{A(\text{Zelle})}$$

Um die durch *Icy Bioimaging Software* in Pixel angegebenen, gemessenen Distanzen und Flächen in die Einheit μm umzurechnen, wurde die Auflösung der Bilder über Anzahl der Pixel des im Bild angegebenen *scale bars* ermittelt und daraus ein Faktor für die Umrechnung gebildet:

Länge (*scale bar*) = 25 μm ; Anzahl der Pixel entlang der *scale bar* = 153 px

$$\mu\text{m} = \text{px} \times \frac{\mu\text{m}}{\text{px}}$$

$$\text{Strecke } (\mu\text{m})(\text{errechnet}) = \text{Strecke } (\text{px})(\text{gemessen}) \times \frac{25 \mu\text{m}}{153 \text{px}}$$

$$\text{Fläche } (\mu\text{m}^2)(\text{errechnet}) = \text{Fläche } (\text{px})(\text{gemessen}) \times \left(\frac{25 \mu\text{m}}{153 \text{px}}\right)^2$$

3.4 Computergestützte Analyse der 3D RNA-FISH Experimente mit der LASX-Software von Leica

Die Auswertung der erstellten 3D Mikroskopaufnahmen erfolgte größtenteils über die LASX-Software von Leica. Allerdings konnten die Zellgrenzen in 3D nicht eindeutig bestimmt werden, sodass auch eine Zuordnung der mRNA-Moleküle zu einer Zelle nicht sicher möglich war. Außerdem war für die Auswertung der Kernvolumina und der Koordinaten der prä-mRNA-Signale eine Prozessierung der Aufnahmen mit 3D *deconvolution* notwendig. Dieses *tool* reduziert die Unschärfe der durch z-Stapel erstellten 3D-Bilder, die aufgrund von physikalischen Phänomenen wie der Beugung des Lichtes entsteht (Sibarita 2005). Auf die mit Cy5 markierten mRNA-Signale angewendet, reduzierte die *deconvolution* die Zahl der mRNA-Signale so stark, dass sie nicht mehr mit den ursprünglichen Bildern zusammenpassten und eine Auswertung der nach *deconvolution* noch messbaren Signale die mRNA-Menge vermutlich deutlich unterschätzt hätte. Aus diesen Gründen wurde entschieden, die Zahl der mRNA-Signale pro Zelle analog zu den in 2D aufgenommenen Bildern mit *Icy Bioimaging Software* in der z-Schicht zu bestimmen, in der die mRNA-Signale am schärfsten waren.

Hierfür wurde als erster Schritt der Auswertung die z-Schicht ausgewählt, in der die mRNA-Signale am schärfsten erschienen und diese aus dem z-Stapel mit der „*Crop*“-Funktion der Leica-LASX-Software ausgeschnitten (Abbildung 11). Diese z-Schicht wurde für jedes Bild separat ausgewählt. Anschließend wurde der Hintergrund so angepasst, dass die RNA-FISH-Kontrolle keine Fluoreszenz mehr aufwies. In den auf diese Weise erstellten 2D Bildern wurde, wie in Kapitel 3.3.3. beschrieben, die mRNA-Menge pro Zelle bestimmt. In die Auswertung wurden alle Zellen miteinbezogen, deren Zellgrenzen komplett im Bild erfasst worden waren, die einen normalen Phänotyp und in der Hoechst-Färbung keinen Mitosekern zeigten.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Kernvolumina und die Analyse der prä-mRNA-Signale mit der Leica LASX-Software. Die hierfür durchgeführten Arbeitsschritte waren im Vorfeld in der AG Kracht durch K. Beuerlein und A. Beyerlein etabliert worden. Als erstes wurde mittels der „*Crop*“-Funktion der Phasenkontrast-Kanal entfernt, weil er für die weitere Auswertung nicht mehr benötigt wurde und so Rechenleistung gespart werden konnte (Abbildung 12).

Im nächsten Schritt wurde an den Bildern eine 3D *deconvolution* im Modus *blind* mit 10 Durchgängen durchgeführt (Abbildung 13). Danach wurde die Autofluoreszenz durch das *tool* „*eliminate autofluorescence*“ reduziert (Abbildung 14). Im Anschluss wurden die einzelnen Zellkerne aus dem Gesamtbild mittels der „*Crop*“-Funktion ausgeschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, die Kerne genauso zu nummerieren, wie es für die mRNA-Analyse mittels *Icy Bioimaging Software* erfolgt war, um eine eindeutige Zuordnung von mRNA und Zellkern zu ermöglichen. Zuletzt wurde der Hintergrund reduziert bis in der RNA-FISH-Kontrolle keine Fluoreszenz zu detektieren war. Die Ergebnisse dieser Prozessierung sind in den Abbildungen 45 bis 49 zu sehen.

Für die Analyse wurden die in Abbildung 16 gezeigten Einstellungen vorgenommen. Diese Einstellung waren dafür entscheidend, welche Strukturen durch die Software erkannt und vermessen wurden. Es musste die minimale Größe (in Voxel) angegeben werden, die eine Struktur haben musste, um durch die Software als einzelne Struktur erkannt und vermessen zu werden. Dies wurde anhand der RNA-FISH-

Kontrolle so eingestellt, dass in der RNA-FISH-Kontrolle keine Signale vermessen wurden. In Abbildung 16 ist exemplarisch ein Zellkern gezeigt, für die prä-mRNA-Signale wurde identisch vorgegangen. Von besonderem Interesse waren die Kernvolumina, die Fluoreszenzintensität der Kerne, die Koordinaten des Mittelpunkts der Kerne und der prä-mRNA-Signale. Die Ergebnisse der Messungen der Software wurden in Tabellenform angegeben und konnten in Microsoft-Excel exportiert werden. Hier wurden die Messergebnisse den entsprechenden mRNA-Signalen derselben Zelle zugeordnet und nach folgender Formel aus den Koordinaten die Distanzen zwischen Kernzentrum und den prä-mRNA-Signalen und zwischen den verschiedenen prä-RNA-Signalen berechnet:

$$\text{Distanz (Punkt 1 zu Punkt 2)} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

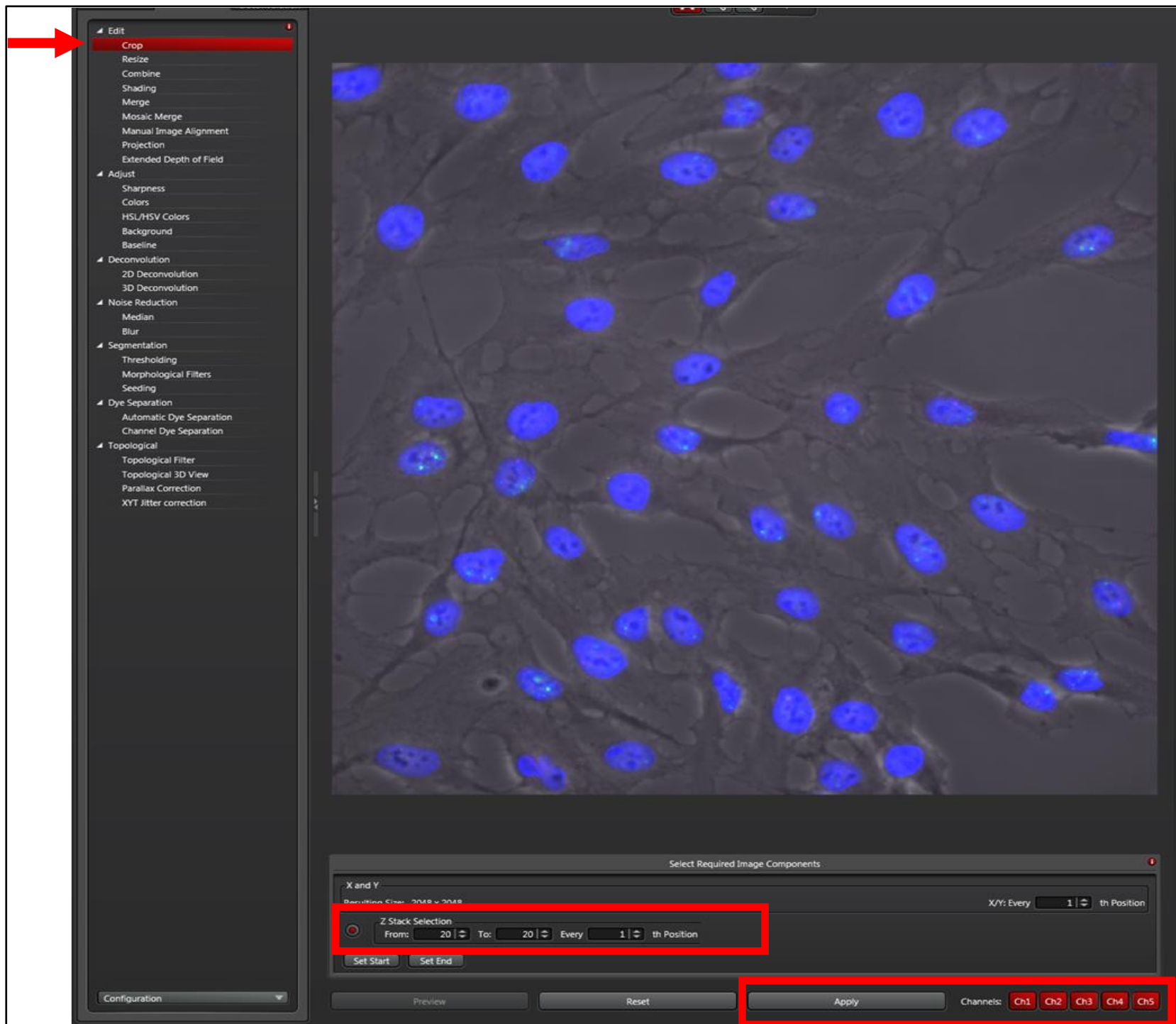


Abbildung 12: Auswahl der z-Schicht, in der die mRNA-Signale am schärfsten zur Darstellung kamen.

Screenshot aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6* prä-mRNA, Hoechst-Färbung und Phasenkontrast. Für die Bestimmung der mRNA-Menge pro Zelle mittels Icy Bioimaging Software wurde aus den erstellten z-Stapeln die z-Schicht mit der Funktion „Crop“ ausgeschnitten, in der die mRNA-Signale am schärfsten erschienen.

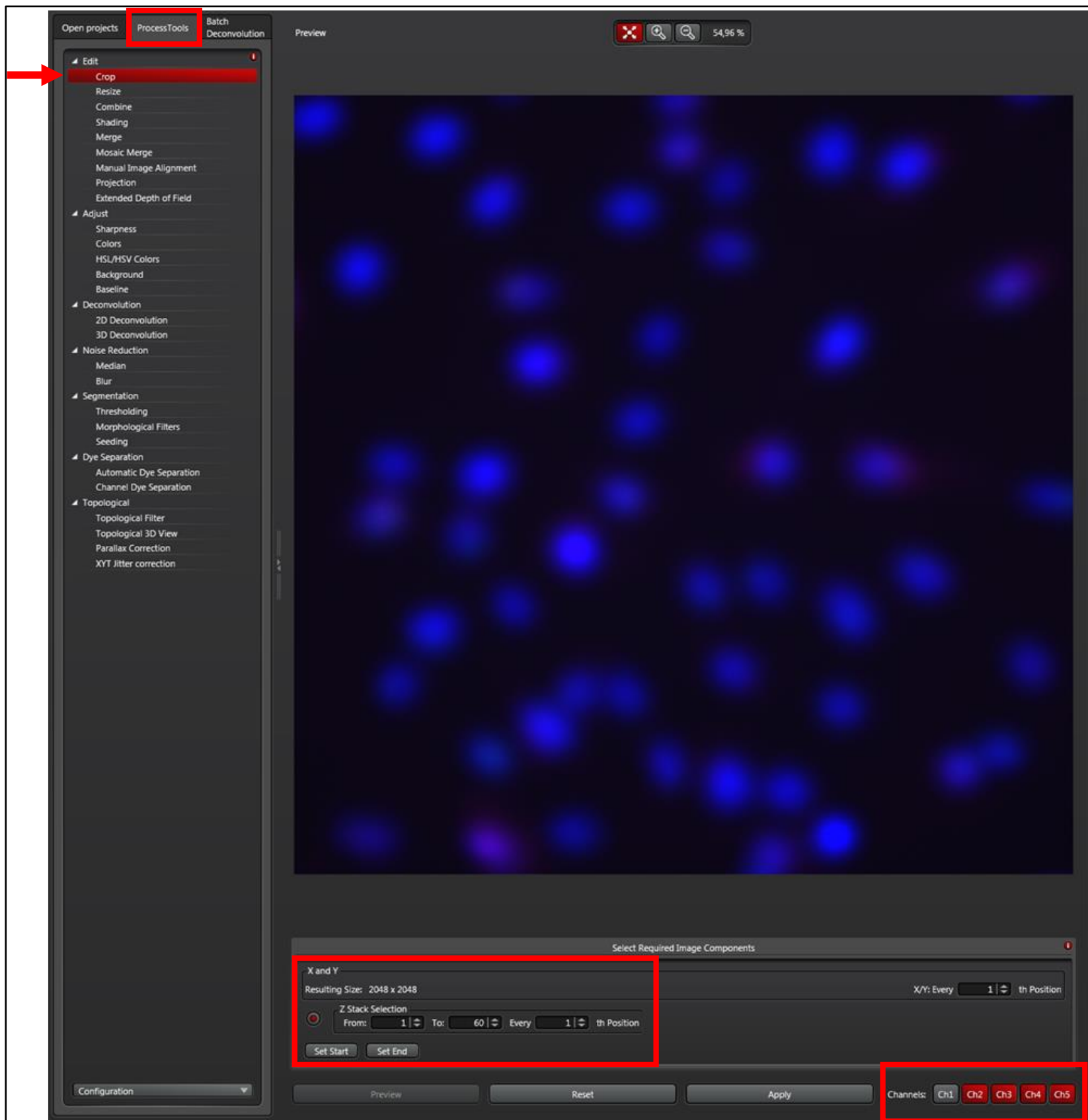


Abbildung 13: Entfernung des Phasenkontrasts.

Screenshot aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6*-prä-mRNA Hoechst-Färbung und Phasenkontrast. Da der Phasenkontrast für die Analyse von Kernvolumen und prä-mRNA-Signalen in 3D nicht benötigt wurde, wurde dieser Kanal (Channel 1) durch die „Crop“-Funktion entfernt.

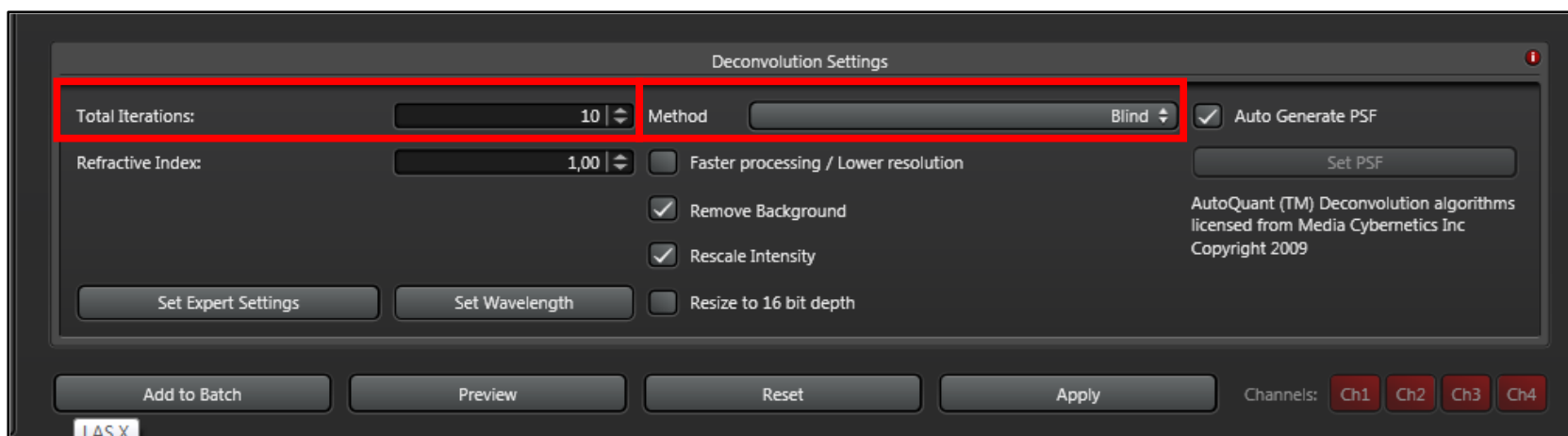


Abbildung 14: Einstellungen für die 3D *deconvolution* zur Erhöhung der Bildschärfe

Screenshot der *deconvolution*-Einstellungen aus der LASX-Software. Zur Erhöhung der Bildschärfe wurde eine 3D *deconvolution* mit 10 Durchführungen in der Methode *blind* durchgeführt.

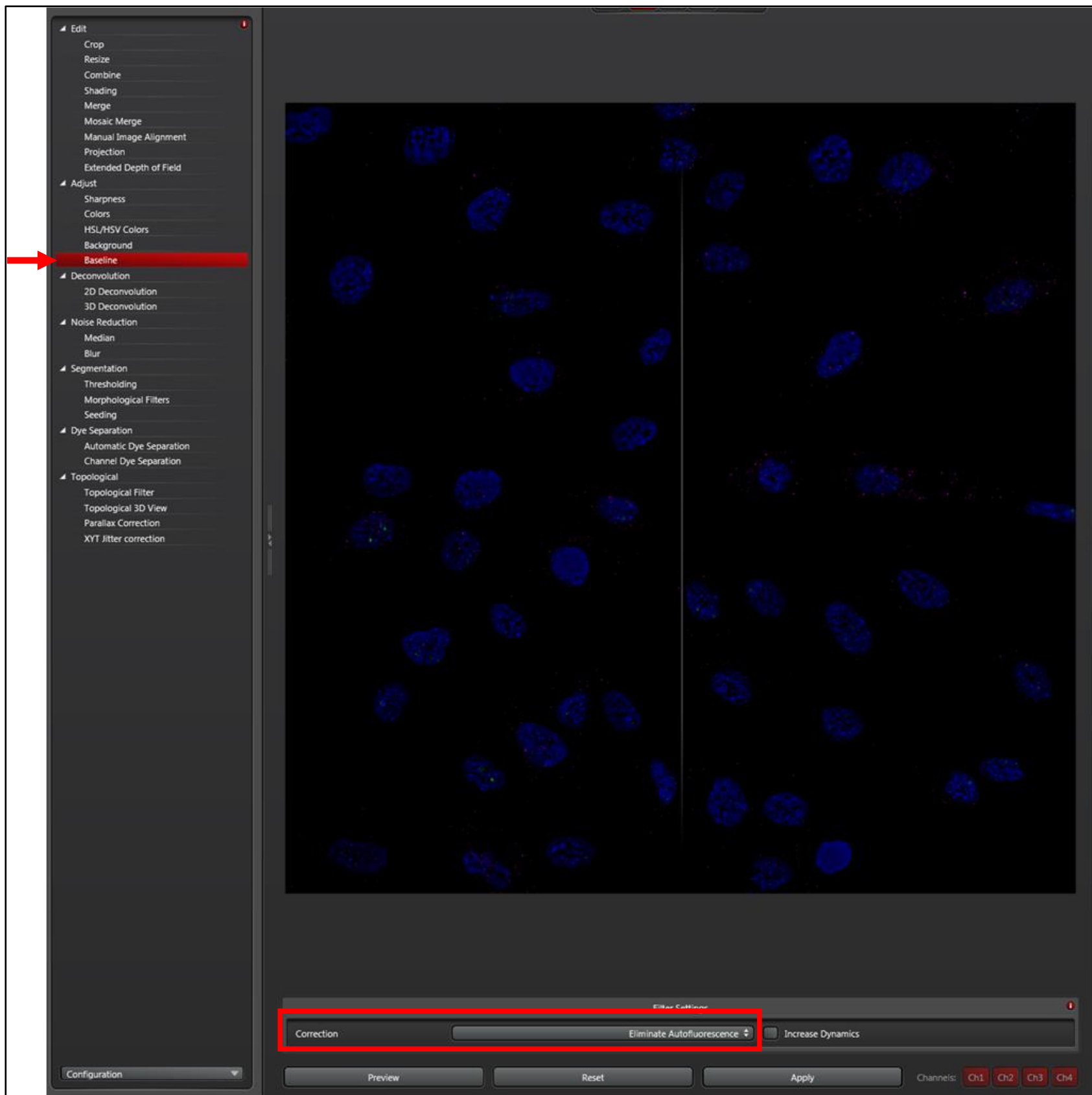


Abbildung 15: Reduktion der Autofluoreszenz in 3D Mikroskopaufnahmen.

Screenshot aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6* prä-mRNA und Hoechst-Färbung.

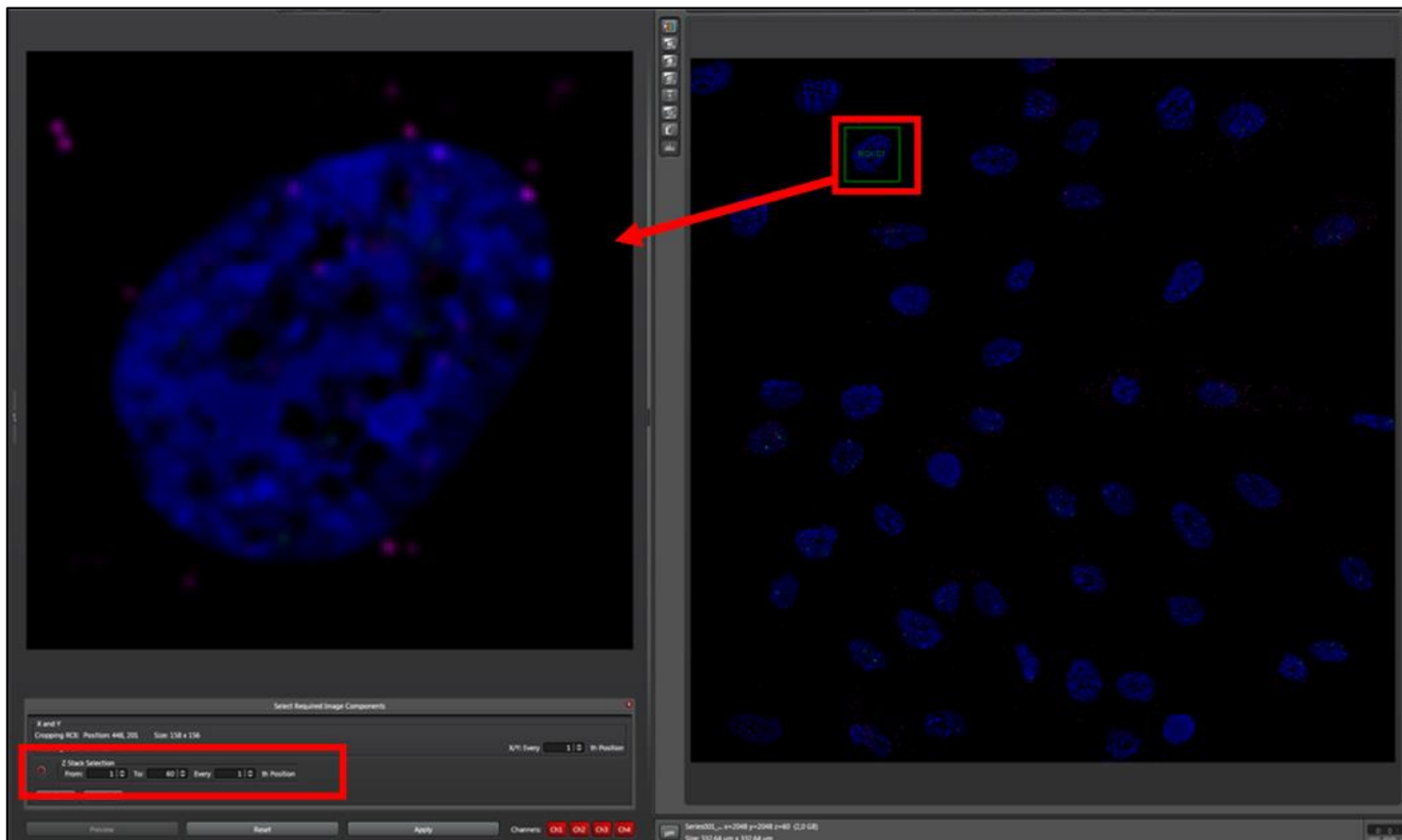


Abbildung 16: Ausschneiden einzelner Zellkerne für die 3D Analyse.

Screenshot aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6* prä-mRNA und Hoechst-Färbung. Rechts: Gesamtbild in einer möglichst scharfen z-Schicht, der mittels „Crop“ auszuschneidene Zellkern ist markiert. Links: vergrößerte Darstellung des rechts ausgewählten Zellkerns in einer z-Ebene. Vorschau wie neue Bild nach dem Schneiden aussehen würde.

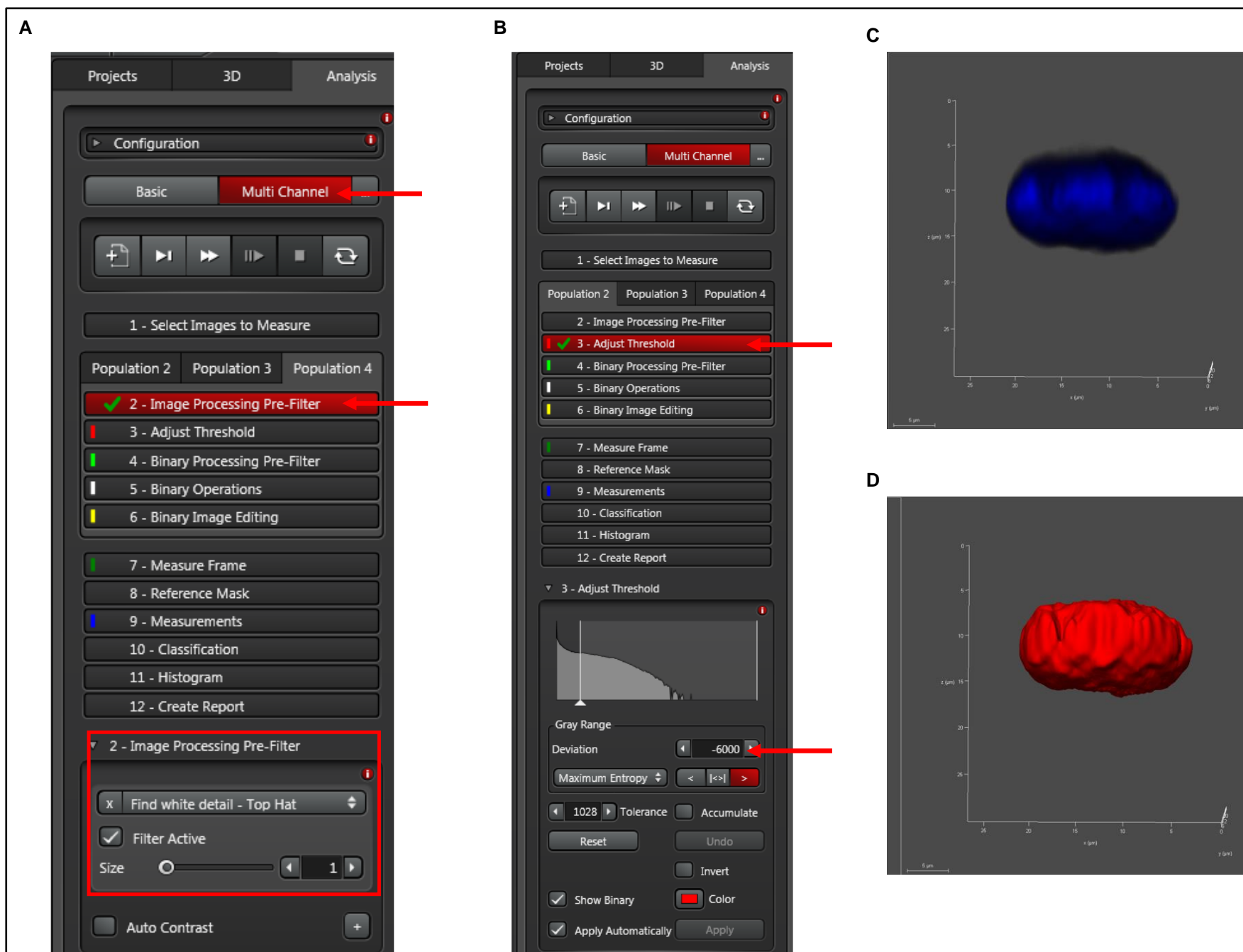


Abbildung 17: Analyse der Zellkerne in 3D mit Leica LASX-Software.

Vergrößerte und ausgeschnittene Screenshots aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6* prä-mRNA und Hoechst-Färbung.

A: Einstellungen im Analysefenster: Anzeige im *multichannel*-Modus. *Image processing pre-filter*: Hoechst: kein; Kanäle, in denen prä-mRNA markiert worden war: *find white detail*. **B:** Anpassung der Grenze der Fluoreszenzintensität in jedem Kanal, die mit in die Auswertung einbezogen wird. Dafür wurde der *Threshold* für jeden Kern einzeln so gesetzt, dass der gemessene Bereich, dargestellt in **D**, dem als Signal sichtbaren Bereich, dargestellt in **C** entsprach.

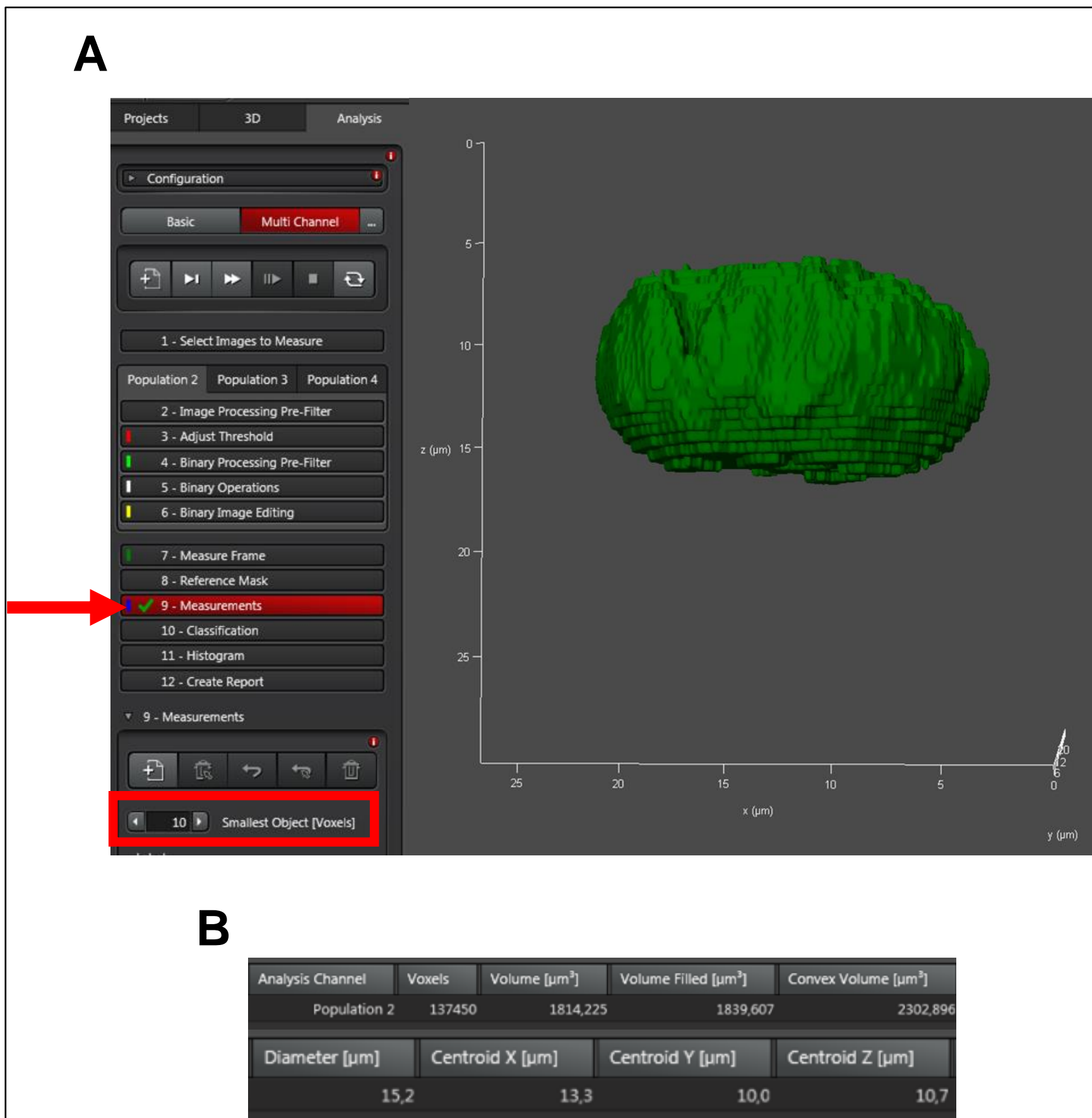


Abbildung 18: Messung der Kernvolumina, Koordinaten des Kernzentrums und der Koordinaten der prä-mRNA-Signale.

Vergrößerte und ausgeschnittene Screenshots aus der LASX-Software mit einem exemplarischen Bild aus 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA, *IL6* prä-mRNA und Hoechst-Färbung. **A:** Links: Einstellungen für die kleinste Größe (in Voxel), die eine Struktur haben muss, um als einzelne Struktur erkannt und ausgemessen zu werden. Rechts: Erkannter und gemessener Bereich. **B:** Messwerte des in A dargestellten Zellkerns.

3.5 Statistische Auswertung mittel Graph Pad Prism Software

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism. Für die meisten Fragestellungen wurden die Mittelwerte von Zellen aus mehreren Gruppen (unterschiedliche Dauer der Stimulation mit IL-1) miteinander verglichen. Hierfür wurden *analysis of variance* (ANOVA)-Tests verwendet, die Vergleiche von mehr als zwei Gruppen möglich machen. Je mehr Gruppen jedoch miteinander verglichen werden, umso höher steigt die Wahrscheinlichkeit, mit der zufällig signifikante Ergebnisse entstehen, der α -Fehler steigt. Dies wird auch als steigende *family-wise error rate* bezeichnet. Um dieses sogenannte *multiple comparisons problem* zu reduzieren, wurden verschiedene Testverfahren etabliert, die die *family-wise error rate* reduzieren sollen. Diese unterscheiden sich darin, welche Gruppen miteinander verglichen werden. Im Tukeys-Test erfolgt der Vergleich der Mittelwerte aller Gruppen untereinander. Mit dem Dunnetts-Tests wird jeweils eine (Kontroll-)Gruppe mit den (behandelten) Gruppen verglichen. Und im Sidaks-Test können bestimmte Paare zum Vergleich miteinander

ausgewählt werden gasu (Gaus et al. 2023; H. J. Motulsky Accessed 2016). Um möglichst wenig unspezifische Test durchzuführen und die *family-wise error rate* möglichst gering zu halten, wurden in dieser Arbeit jeweils die passenden Testverfahren ausgewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung der Methodik zur Messung von Kerngrößen

Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) ermöglicht den spezifischen Nachweis und die Darstellung der Lokalisation von Proteinen, wie zum Beispiel Proteinen der Kernlamina, den Laminen. Durch die immunologische Färbung der Lamina wurde in dieser Arbeit deren Lokalisation an der Nukleushülle nachgewiesen und der Umriss der Zellkerne dargestellt. Anhand dieser Umrisse sollte die Fragestellung nach einer IL-1 α -induzierten Änderung der Kerngröße in hTERT-RPE-1-Zellen beantwortet werden. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hilfe des, in doppelsträngige DNA interkalierenden, Farbstoffes Hoechst 33342 indirekt angefärbt. Initial wurde die Darstellung und Analyse der Zellkerne in den einfacheren 2D-Verfahren durchgeführt, da die Validität von 2D und 3D Aufnahmen davon abhängt, wie groß gemessene Distanzen sind, wie die Form der Zellen ist, wie groß die Probengröße ist und ob ein Vergleich verschiedener Proben oder eine originalgetreue Abbildung der Rohdaten angestrebt wird (Finn et al. 2017). Die Kerne von hTERT-RPE-1-Zellen sind eher flach (unveröffentlichte Daten AG Kracht) und ihre Querschnittsflächen sind deutlich über 5 μm groß (Deolal et al. 2021). Weiterhin handelte es sich bei dem Versuchsaufbau nicht um einen *high-throughput*-Ansatz und es sollten in erster Linie die Kerngröße unbehandelter Zellen und die Kerngröße von mit IL-1 α inkubierten Zellen verglichen werden. Damit Bedingungen gegeben nach denen anhand einer anderen Studie eine 2D Darstellung ausreichend und einer 3D Darstellung vorzuziehen ist (Finn et al. 2017). Über die Umriss der Zellkerne sollte mit der *Icy Bioimaging Software* die Kernfläche bestimmt werden, da diese Software ein hohes Maß an Transparenz und viele Möglichkeiten, Zelleigenschaften zu quantifizieren, bietet (vergleiche Kapitel 3.3).

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob es möglich ist, Unterschiede der Kerngröße mit der spezifischen Markierung der Kernhülle über Kernlamina und der indirekten Markierung über die Hoechstfärbung kombiniert mit der Bildanalyse mit *Icy Bioimaging Software* festzustellen. Weiterhin wurde überprüft, ob Unterschiede zwischen beiden Markierungen in der Detektion von induzierbaren Änderungen der Zellkerngröße bestanden. Dazu wurde das ursprünglich aus *Streptomyces* isolierte Polyketid Leptomycin B verwendet. Leptomycin B bindet kovalent an den nukleären Exportmediator *Chromatin Maintenance Region 1* (CRM1, auch bekannt unter dem Namen *Exportin 1*). Dadurch kommt es zu einer strukturellen Modifikation eines Cystinrestes in CRM1, welcher essenziell für die Bindung der nukleären Exportsequenz (NES) von Proteinen oder mRNA an CRM1 ist. Für den Export bestimmte RNAs und Proteine können somit nicht an den Exportmediator binden und werden nicht mehr aus dem Kern heraustransportiert (Ferreira et al. 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des nukleären Exports durch Leptomycin B (20 ng/ml) zu einer Größenzunahme der Zellkerne behandelter Zellen führt (Jevtić et al. 2019).

Um die Auswertungsmethode zu validieren, wurden die hTERT-RPE-1-Zellen in *IBIDI μ -Slides VI* ausgesät und am nächsten Tag über 24 Stunden (h) mit Leptomycin B (20 ng/ml gelöst in Ethanol) behandelt, unbehandelt belassen oder zur Kontrolle des Einflusses des Lösungsmittels mit Ethanol behandelt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern für Lamin B1 und p65 durchgeführt (Abbildung 18A). p65 gehört zu den Proteinen, deren Export durch CRM1 vermittelt wird und akkumuliert daher in den Zellen die auf Leptomycin B reagieren (Huang et al. 2000). Aus diesem Grund wurde die verstärkte Lokalisation von p65 im Zellkern als Marker für die Wirkung von Leptomycin B auf Einzelzellebene herangezogen. Die Zellen, die nicht oder mit Ethanol behandelt worden waren, waren im Phasenkontrast morphologisch unauffällig und entsprachen in ihrer Konfluenz den Erwartungen. Die mit Leptomycin B behandelten Zellen waren deutlich größer und weniger konfluent. In den Kontrollzellen (unbehandelt bzw. mit Ethanol behandelt) befand sich p65 überwiegend im Zytoplasma, wohingegen p65 nach erfolgter Leptomycin B-Behandlung bei fast allen Zellen eine ausgeprägte Lokalisation im Zellkern aufwies. Dies zeigte die starke und homogene Wirkung der gewählten Menge Leptomycin B auf die gesamte Zellpopulation. Anhand der Markierung des Kernlamins B1, sowie über die Färbung der DNA mit Hoechst, wurde der Zellkern beurteilt, der sich in den mit Leptomycin B behandelten Zellen deutlich größer als in den anderen Zellen darstellte. In der IF-Kontrolle, für die unbehandelten Zellen ausschließlich mit den verwendeten Sekundärantikörpern inkubiert wurden, zeigten sich keine unspezifischen Signale.

In Abbildung 19B sind der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der Kernflächen, die anhand der Markierung des Kernlamins B1 und anhand der Hoechstfärbung gemessen wurden, als *Violin Plot* dargestellt. Zunächst sollen die Ergebnisse der immunologischen Markierung von Lamin B1 beschrieben werden. In den unbehandelten Zellen hatten die Zellkerne im Mittel eine Fläche von 292,3 μm^2 und im Median eine Fläche von 280,5 μm^2 . 50% der unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen waren zwischen 250,5 μm^2 und 323,7 μm^2 groß. Nach Leptomycin B-Behandlung war die Kernfläche im Mittel 362,1 μm^2 und im Median 330,0 μm^2 groß. Damit war die Kernfläche behandelter Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen im Median um 18 % signifikant größer (Dunnett's Test, $p \leq 0,05$). Der große Unterschied zwischen Median und Mittelwert der Flächen der mit Leptomycin B behandelten Zellen deutet auf eine schiefe Verteilung der Daten hin. 50% der Flächen der mit Leptomycin B behandelten Zellen waren zwischen 296,7 μm^2 und 435,5 μm^2 groß. Dieser Bereich ist im Vergleich

zum Interquartilsabstand (IQA) der unbehandelten Zellen groß, und deutet auf eine starke Streuung der Kernflächen nach Leptomycin B-Behandlung hin.

Die mit Ethanol behandelten Zellen hatten im Mittel einen $293,0 \mu\text{m}^2$ großen Zellkern (Median: $280,3 \mu\text{m}^2$, IQA: 80) und unterschieden sich damit nicht signifikant von den unbehandelten Zellen (Dunnett's Test; $p \geq 0,05$).

Der *Violin Plot* visualisiert zusätzlich die Häufigkeitsverteilung. Die unbehandelte und die mit Ethanol behandelte Population stellten sich als homogene Gruppen dar, die ihre häufigste Ausprägung ungefähr auf der Höhe des Medians besaßen. Im Gegensatz dazu waren in der mit Leptomycin B inkubierten Population zwei Subpopulationen erkennbar, von denen die eine größere und die andere kleinere Kernflächen besaß.

Genauer zu sehen war die Heterogenität der mit Leptomycin B behandelten Zellen und ihre Aufspaltung in die zwei Subpopulationen in den Verteilungen der relativen Häufigkeiten der Kernflächen, gemessen anhand der Markierung von Lamin B1 (Abb. 18C). Aus der relativen Häufigkeitsverteilung ist ersichtlich, dass es sich bei der Kernfläche unbehandelter und mit Ethanol behandelter Zellen um ein symmetrisch verteiltes Merkmal handelte, welches in den beiden Populationen eine sehr ähnliche Verteilung aufzeigte. Dabei hatten jeweils die meisten (19 % der unbehandelten, 17 % der mit Ethanol behandelten) Zellen eine Kernfläche zwischen 260 und $280 \mu\text{m}^2$. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den geringen Einfluss von Ethanol auf die Kernfläche. Die mit Leptomycin B inkubierte Zellpopulation zeigte hingegen eine zweigipflige, nach rechts verschobene Häufigkeitsverteilung. Am häufigsten (15 % der Gesamtpopulation) waren in dieser Population Kernflächen zwischen 320 und $340 \mu\text{m}^2$. In 6 % der Gesamtpopulation lagen die Kernflächen zwischen 460 und $480 \mu\text{m}^2$, was den zweiten Gipfel der Verteilung bildete. Diese Kernflächen waren in den anderen beiden Gruppen nur selten (unter 1 % der Gesamtpopulation) zu beobachten. Die Aufspaltung der mit Leptomycin B behandelten Zellen in zwei Subpopulationen deutet darauf hin, dass das Polyketid unterschiedlich (stark) auf die Zellen gewirkt hat, aber in allen Zellen eine Vergrößerung der Kernfläche bewirkte.

Wurden die Ergebnisse der Markierung von Lamin B1 jeder Bedingung mit den dazugehörigen Ergebnissen der Hoechstfärbung verglichen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19B) (Sidak-Test, $p \geq 0,05$). Weiterhin besaßen die Häufigkeitsverteilung und die Größenordnung der Ergebnisse beider Färbungen eine große Ähnlichkeit. In der Vergangenheit wurden bereits Daten veröffentlicht, nach denen sich Kernflächen, die über die Hoechstfärbung gemessen wurden, nicht signifikant von Kernflächen derselben Zellen unterschieden, die über eine Lamin-Markierung ermittelt wurden (Jevtić et al. 2019). Somit kann aus den Ergebnissen dieses Abschnitts geschlossen werden, dass die Hoechstfärbung, die nur indirekt den Zellkernumriss visualisiert, ebenfalls zur Beurteilung einer putativen Änderung der Kerngröße herangezogen werden kann.

Insgesamt zeigten diese Versuche eine signifikante Erhöhung der Kernfläche der hTERT-RPE-1-Zellen nach Leptomycin B-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten oder mit dem Lösungsmittel behandelten Kontrolle. Dies entspricht den veröffentlichten Daten (Jevtić et al. 2019) und bestätigt daher, dass sich mit der immunologischen Anfärbung der Kernlamina in 2D und der gewählten Auswertungsmethode Veränderungen der Zellkerngröße spezifisch quantifizieren lassen. Die Hoechst-Färbung kann ebenfalls zur Messung der Zellkerngröße herangezogen werden. Des Weiteren ist festzustellen, dass die unphysiologische Hemmung eines wichtigen Exportmediators eine Veränderung des Medians der Kerngröße um 18 % des Medians der Kerngröße in unbehandelten Zellen bewirkt hat. Dies deutet darauf hin, dass potenzielle physiologische Veränderungen der Kerngröße im Rahmen einer Stimulus-induzierten Entzündungsreaktion in kleinerem Umfang zu erwarten sind.

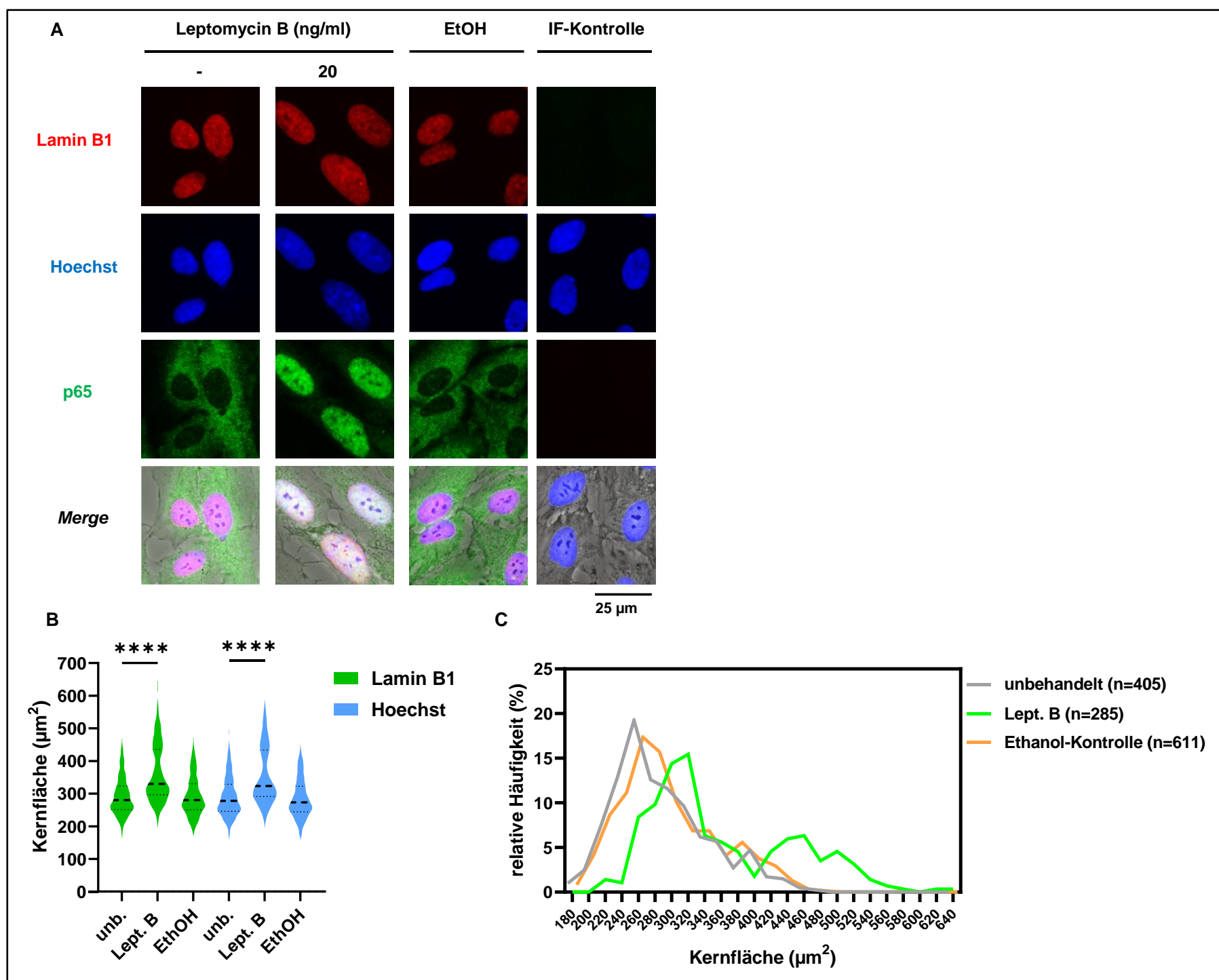


Abbildung 19: Validierung der Analysemethoden der Kerngröße mit Leptomycin B.

A: hTERT-RPE-1 Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für 24h mit Leptomycin B (20 ng/ml) oder Ethanol behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine indirekte Immunfärbung (IF) durchgeführt. Dabei wurden die Primärantikörper anti-Lamin B1 (rb) der Firma abcam #ab16048 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3 der Firma Millipore #AP182C) und anti-p65 (ms) der Firma Santa Cruz Biotechnology #sc-8008 (markiert mit Sekundärantikörper DL488 der Firma Immuno Reagent #DKxMu003D488NHSX) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienen unbehandelte Proben ohne Markierung mit Primärantikörpern. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Messbalken: 25 µm. **B:** Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Kernfläche in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 285 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ getestet. ****: $p<0,0001$. **C:** Darstellung der Verteilung der relativen Häufigkeiten der, über die Lamin B1-Markierung gemessenen, Kernflächen in Prozent von der Gesamtpopulation aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 285 Zellen pro Bedingung. Abkürzungen: EtOH: Ethanol; unb.: unbehandelt; Lept. B: Leptomycin B.

4.2 Änderungen der Zellmorphologie und des Zellkernes als Reaktion auf den Entzündungsreiz IL-1 α

Die in Kapitel 4.1. validierte Untersuchungsmethode sollte genutzt werden, um den Einfluss des Entzündungsmediators IL-1 α auf die Kerngröße zu untersuchen. Da die Kerngröße unter anderem mit der Größe des Zytoplasmas assoziiert ist und das Kern- /Zytoplasma-Verhältnis (K-/Z-Verhältnis) unter physiologischen Konditionen konstant gehalten wird (Huber und Gerace 2007; Neumann und Nurse 2007; Cantwell und Nurse 2019b), wurden zusätzlich die Zytoplasmafläche und das K-/Z-Verhältnis der Zellen erfasst. Hierfür wurde die Fläche der gesamten Zelle über den Phasenkontrast ermittelt und die Zytoplasmafläche sowie das K-/Z-Verhältnis aus der Zell- und Kernfläche errechnet (vergleiche Kapitel 3.3.6.). Weiterhin sollten nur die Zellen in die Auswertung einbezogen werden, die stimulusbezogen auf IL-1 reagiert hatten (vergleiche Kapitel 5.1.). Um stimulusassoziiert reagierende Zellen von nicht oder prolongiert reagierenden Zellen zu unterscheiden, wurde die subzelluläre Lokalisation des Proteins p65 erfasst. Der Transkriptionsfaktor p65 ist in unbehandelten Zellen hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und transloziert, als wichtiger Bestandteil der Endstrecke des zytoplasmatischen IL-1-Signalwegs, nach halbstündiger Inkubation der Zellen mit IL-1 in den Zellkern (Stein und Baldwin 1993; Mayr-Buro et al. 2019). Nach 90 Minuten wird p65 wieder von neu synthetisiertem I κ B α gebunden und transloziert zurück in das Zytoplasma, wodurch die Aktivierung der Transkription durch

p65 aufgehoben wird (Mayr-Buro et al. 2019). Aus diesem Grund kann die Lokalisation von p65 innerhalb einer Zelle als Indikator für die Aktivierung des zytoplasmatischen IL-1-Signalweges in einer Zelle betrachtet werden.

hTERT-RPE-1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und mit IL-1 α (10 ng/ml) behandelt. Da die Reaktion auf IL-1 ein dynamischer Prozess ist (Bacher et al. 2021), sollte die Morphologie der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IL-1 Behandlung und im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beurteilt werden. Dafür wurden die Zellen unbehandelt belassen oder 0,5h, 1h, 3h oder 6h nach der IL-1-Behandlung bei 4°C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die hTERT-RPE-1-Zellen mit Primärantikörpern für Lamin A und C und p65 angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst markiert (Abb. 20). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit dem DMI8-Mikroskop von Leica und der LASX-Software mikroskopiert und die Bilder mit der Icy Bioimaging Software analysiert.

Im Phasenkontrast waren in allen Kanälen Zellen mit unauffälligem Phänotyp, erwarteter Konfluenz und Adhärenz zu sehen. Sowohl die Färbung der Zellkerne mit Hoechst, als auch die Markierung der Kernproteine Lamin A und C zeigten ovale Zellkerne mit homogener Größe und optisch ähnlichem Kern-/ Zytoplasmaverhältnis. Bei der Betrachtung des *merge* aller Fluoreszenzkanäle war zu sehen, dass die grüne Fluoreszenz, ausgehend von den Kernlaminen, einen dünnen Ring um die Hoechst-Färbung bildete. Weiterhin fiel die Variation der Lokalisation von p65 auf: in unbehandelten Zellen, war p65 erwartungsgemäß weitgehend im Zytoplasma lokalisiert, nach 0,5h und 1h IL-1-Stimulation vorwiegend im Zellkern. Nach 3h und 6h konnten Zellen ausgemacht werden, bei denen p65 vorwiegend im Zytoplasma, vorwiegend im Kern oder gleichmäßig in beiden Kompartimenten lokalisiert war. Für die Analysen wurden nur Zellen verwendet, bei denen p65 subjektiv nach halb- und einstündiger IL-1 Stimulation im Zellkern lokalisiert war. Aus den unbehandelten und den 3h bzw. 6h mit IL-1 inkubierten Zellen wurden jene ausgewählt bei denen IL-1 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert war, um den Einfluss der IL-1 Stimulation in Zellen mit einer stimulus-induzierten pulsatilem IL-1 Reaktion zu untersuchen und den Einfluss prolongierter, verzögerter oder stimulusunabhängiger Aktivitäten des IL-1 und NF- κ B Signalweges auf die Kerngröße möglichst auszuschließen (Abb. 20) (Maßmann 2021; Bacher et al. 2021).

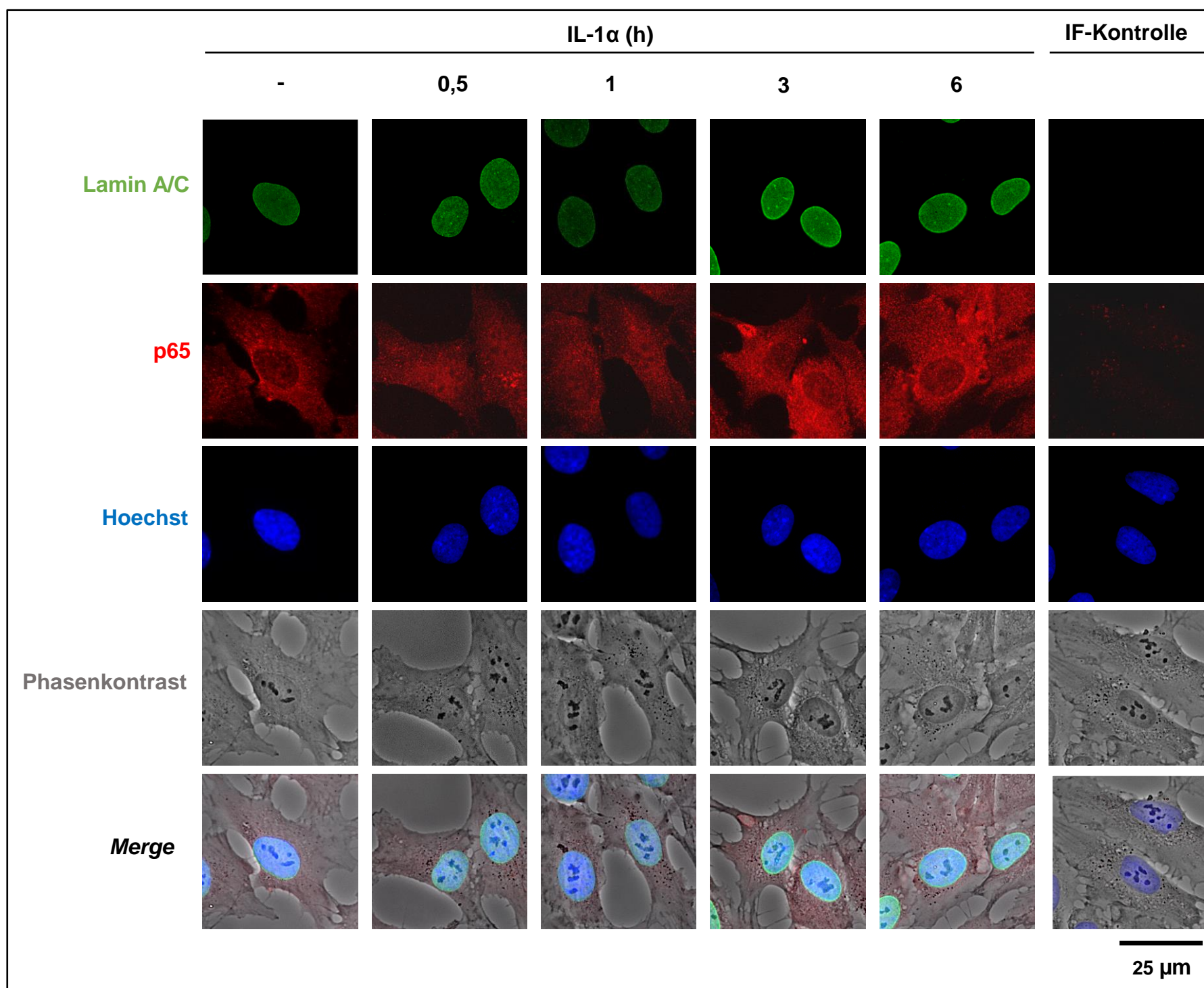


Abbildung 20: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz zur Untersuchung des Einflusses von IL-1 α auf den Phänotyp von hTERT-RPE-1-Zellen.

hTERT-RPE-1 Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine indirekte Immunfärbung (IF) durchgeführt. Dabei wurden die Primärantikörper anti-Lamin A/C (ms) der Firma Santa Cruz Biotechnology #sc-3762418 (markiert mit Sekundärantikörper DL488 der Firma Immuno Reagent #DKxMu003D488NHSX) und anti-p65 (gt) der Firma Bethyl #A303-945A (markiert mit Sekundärantikörper Cy3 der Firma Millipore #AP182C) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen ohne Inkubation mit Primärantikörpern. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Messbalken: 25 μ m.

In Abbildung 20A sind der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der Kernflächen, die über die Markierung der Lamine A und C und die Hoechstfärbung gemessen wurden, als *Violin Plot* dargestellt. Die unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen hatten im Mittel eine Kernfläche von 280,0 μ m² (Median: 273,4 μ m²), wobei 50% der Zellkerne zwischen 239,2 μ m² und 317,1 μ m² groß waren (jeweils gemessen über die Markierung der Kernlamine A/C). Die Mittelwerte der Kernflächen der behandelten Zellen und die mittlere Kernfläche der unbehandelten Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Dunnets Test $p > 0,05$). Weiterhin war in den Unterschieden zwischen den Mittelwerten oder Medianen der behandelten und unbehandelten Zellen kein Muster erkennbar, welches auf eine Veränderung der Kerngröße, entsprechend der IL-1-Kinetik schließen lassen würde.

Der Mittelwert der über Hoechst gemessenen Kernfläche der unbehandelten Zellen lag bei 262,8 μ m² (Median: 263,0 μ m²). Auch für die Ergebnisse aus der Hoechst-Färbung der mittleren Fläche der unbehandelten Zellen und der behandelten Zellkerngrößen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Dunnets-Test, $p > 0,05$). Allerdings lagen die durch die Hoechst-Färbungen gemessenen Mittelwerte und Mediane der Kernflächen ungefähr 10 bzw. 20 μ m² unter denen, die über die Lamin A/C-Markierung ermittelt wurden, wobei es sich um einen signifikanten Unterschied handelte (Sidak-Test, $p < 0,05$). Die Form der Verteilung, sowie die Größe der Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen waren jedoch sehr ähnlich zu den Ergebnissen aus der Markierung der Kernlamine A/C.

Die Verteilung der relativen Häufigkeit der Kernflächen die über die Lamin A/C-Markierung gemessen wurden, wird in Abbildung 20B gezeigt. Da die Häufigkeitsverteilung für alle Bedingungen einer Log-Normalverteilung gleich, wurde sie in das Modell dieser Verteilung

angepasst, um die Kurven zu glätten und auf diese Weise eine bessere Übersicht zu erhalten. Die Häufigkeitsverteilungen waren für die unbehandelten Zellen und alle Behandlungszeitpunkte symmetrisch und für alle Bedingungen weitgehend identisch, das heißt keine der Kurven war im Vergleich zu den anderen deutlich nach rechts verschoben. Die mit 37-45 % der Gesamtpopulation in allen Bedingungen häufigste Ausprägung waren Kernflächen zwischen $240 \mu\text{m}^2$ und $280 \mu\text{m}^2$. Vergleichswerte anderer Arbeitsgruppen lagen für diese Zelllinie nicht vor, allerdings die Größenordnung Vorbefunden für HeLa, humanen Mammaepithelzellen und humanen Lungenfibroblasten) (Vuković et al. 2016; Jevtić et al. 2015; Jevtić et al. 2019).

Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Kernflächen ohne und nach IL-1-Behandlung festgestellt werden. Dies wurde sowohl anhand der Färbung der Kernlamina über den Nachweis der Proteine Lamin A und C als auch anhand des in die DNA interkalierenden Farbstoffs Hoechst 33342 gezeigt. Weiterhin waren die Häufigkeitsverteilungen der Kernflächen unbehandelter Zellen und mit IL-1 inkubierter Zellen kaum voneinander zu unterscheiden. Daher kann aus den Ergebnissen dieser Versuche geschlossen werden, dass der Entzündungsmediator IL-1 die Kerngröße einer gesamten Population nicht beeinflusst. Anhand der indirekten Färbung der Kernumrisse über die Gegenfärbung der DNA mittels Hoechst konnten signifikant kleinere Kernflächen gemessen werden als anhand des Nachweises der Kernhülle über die Detektion der Proteine Lamin A und C. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Kernlamina, die durch Hoechst angefärbte DNA umgibt (Cantwell und Dey 2021). Ferner entsprachen die Formen der Häufigkeitsverteilungen und die Größe der Unterschiede zwischen den verschiedenen Inkubationsbedingungen der über die Hoechst-Färbung gemessenen Kernflächen, denen, die über die Markierung von Lamin A/C gemessen wurden. Daher scheint die Hoechst-Färbung ein zuverlässiger Marker für Veränderungen der Kerngröße zu sein. Eine Aussage über die tatsächliche Kernfläche sollte allerdings eher anhand der Lamin A/C-Färbung getroffen werden.

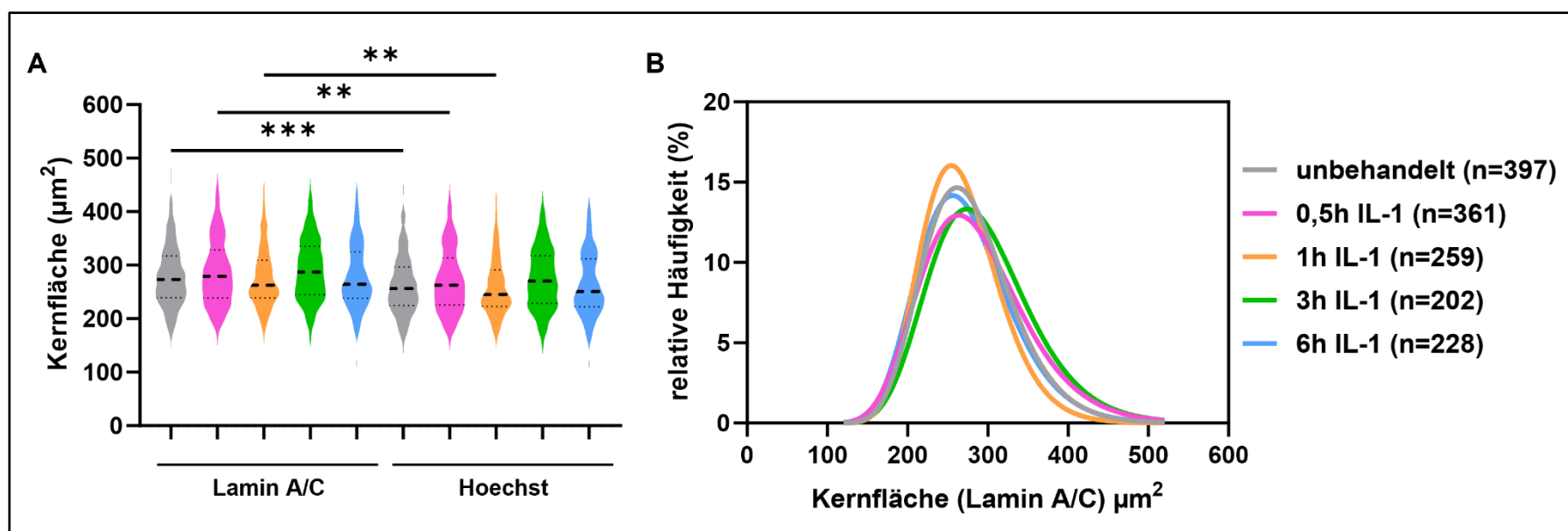


Abbildung 21: Beeinflussung der Kernfläche in hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.

A: Darstellung der Mediane, Interquartilsabstände und der Häufigkeitsverteilung der Kernfläche in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet. Mit dem Sidak's-Test wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Lamin-Färbung mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ gegen die jeweiligen Ergebnisse der Hoechstoffärbung getestet. Dargestellt sind nur signifikante Ergebnisse. ***: $p<0,001$; **: $p<0,01$; *: $p<0,05$. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der über die Markierung der Kernproteine Lamin A und C gemessenen Kernflächen als in die Log-Normalverteilung gefittete Kurven. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen. Originalkurven siehe Abbildung 54.

Für die Beurteilung des Einflusses des Entzündungsmediators IL-1 auf die Zytoplasmafläche wurde eingangs die Zellfläche anhand des Phasenkontrasts bestimmt. Anschließend wurden die Kernflächen, die über die Markierung der Kernlamina A und C gemessen worden waren, von der Zellfläche subtrahiert. In Abbildung 21A werden der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der auf diese Weise bestimmten Zytoplasmaflächen als *Violin Plot* dargestellt. Die unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen hatten im Mittel eine Zytoplasmafläche von $1643 \mu\text{m}^2$ (Median: $1532 \mu\text{m}^2$), wobei die mittleren 50 % der Zytoplasmaflächen unbehandelter Zellen zwischen $1210 \mu\text{m}^2$ und $1957 \mu\text{m}^2$ groß waren. Es bestand kein großer oder signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten und Medianen der verschiedenen Bedingungen (Dunnett's Test; $p>0,05$) und auch die IQA, und damit die Streuung, wiesen große Ähnlichkeiten auf. Die Verteilung der relativen Häufigkeiten der Zytoplasmaflächen (Abb. 22B) entsprach einer Log-Normalverteilung und wurde, um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, an dieses Modell angepasst. Dabei konnte für alle Bedingungen eine symmetrische Form, sowie eine gleiche Verteilung ohne Verschiebung nach rechts oder links festgestellt werden. Zwischen 39 % und 50 % der Gesamtpopulation und damit die meisten Zellen hatten eine Zytoplasmafläche zwischen 1200 und $1600 \mu\text{m}^2$.

Aus den kleinen und nicht signifikanten Unterschieden zwischen der Zytoplasmafläche von mit IL-1 behandelten und unbehandelten Zellen, sowie den ähnlichen Häufigkeitsverteilungen lässt sich schließen, dass IL-1 zu keiner Veränderung der Zytoplasmagröße führte.

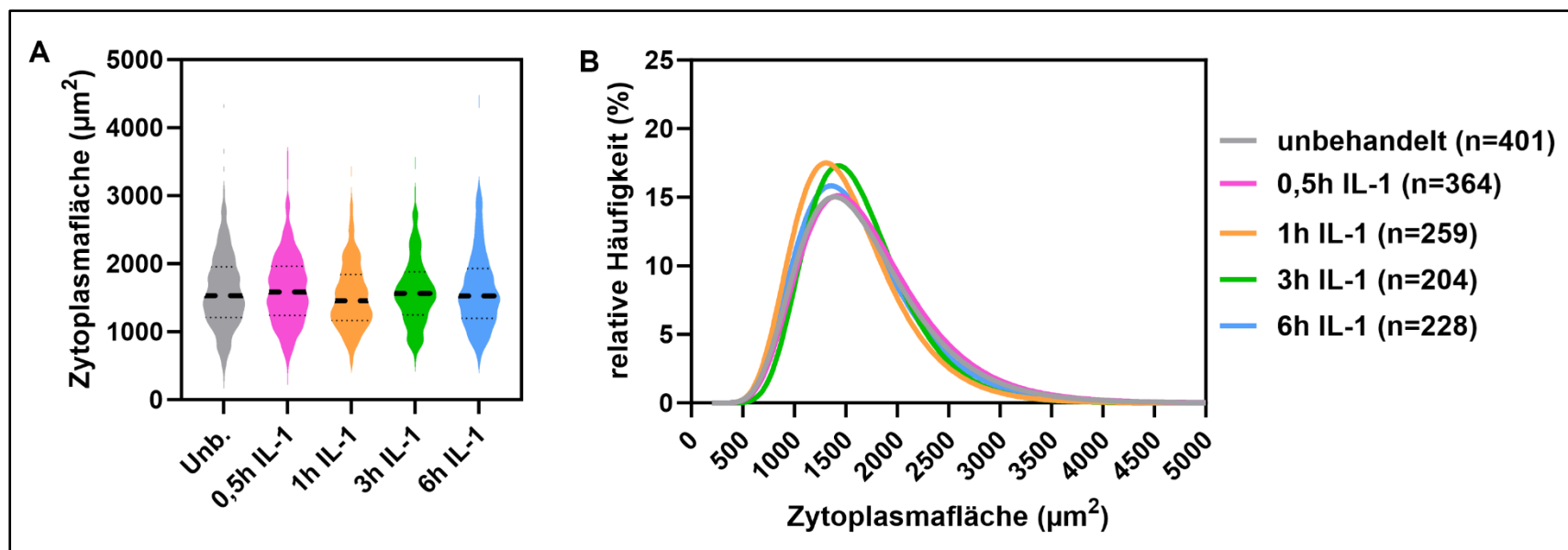


Abbildung 22: Untersuchung der Beeinflussung der Zytoplasmafläche von hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.

A: Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Zytoplasmafläche in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Gesamtpopulationen von mindestens 204 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der Zytoplasmaflächen als in die Log-Normalverteilung gefittete Kurven. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 204 Zellen. Originalkurven in Abbildung 54B.

Da das Kern- / Zytoplasma-Verhältnis (K-/Z-Verhältnis) und seine Aufrechterhaltung unter physiologischen Konditionen eine besondere Bedeutung innezuhaben scheint (Cantwell und Nurse 2019b), sollte der Einfluss des Entzündungsmediators IL-1 auf dieses Verhältnis untersucht werden. Dafür wurde das K-/Z-Verhältnis aus den zuvor über die Markierung der Kernlamina A und C ermittelten Flächen der Kerne und des Zytoplasmas errechnet. Der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der K-/Z-Verhältnisse sind in Abbildung 22A als *Violin Plot* dargestellt. Für das K-/Z-Verhältnis in unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen ergab sich ein Mittelwert von 0,20 und ein Median von 0,18 (IQA: 0,7). Nach einer halbstündigen und dreistündigen IL-1-Behandlung lag das mittlere K-/Z-Verhältnis bei 0,19, nach 1h und 6h bei 0,20. Der Median des K-/Z-Verhältnisses schwankte zwischen 0,18 (nach 0,5h, 3h und 6h IL-1) und 0,19 (1h). Diese kleinen Unterschiede zeigten kein Muster und waren nicht signifikant (Dunnett's Test, $p>0,05$).

Die Verteilung der relativen Häufigkeit der K-/Z-Verhältnisse wird in Abbildung 22B dargestellt. Zu erkennen war eine der Log-Normalverteilung sehr ähnliche symmetrische Verteilung für alle Bedingungen, weswegen die Verteilungen, um den Kurvenverlauf zu glätten, an dieses Modell angepasst wurden. Am häufigsten lag das K-/Z-Verhältnis in unbehandelten Zellen und nach sechsständiger Stimulation zwischen 0,15 und 0,2 und nach 0,5h, 1h und 3h IL-1-Stimulation zwischen 0,2 und 0,25. Diese Unterschiede könnten auf eine Veränderung des K-/Z-Verhältnisses in Richtung größerer Zellkerne nach IL-1-Stimulation hinweisen, welche sich nach sechsständiger Stimulation wieder zurück entwickelte.

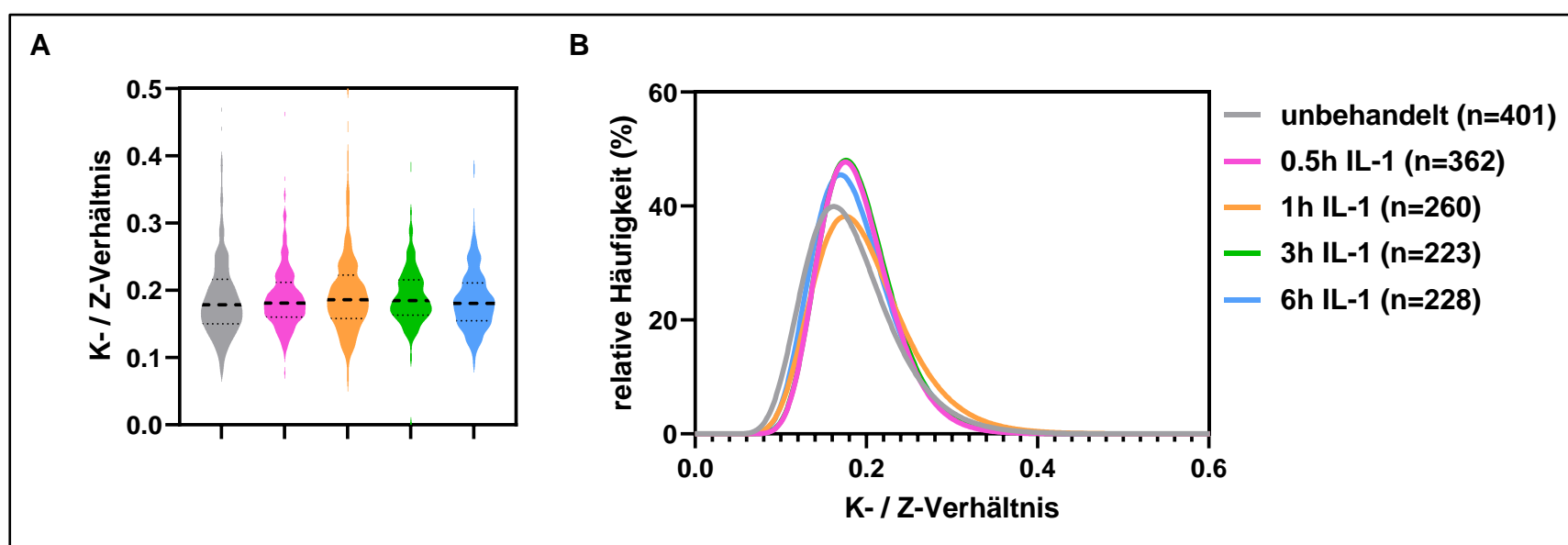


Abbildung 23: Untersuchung der Beeinflussung des K-/Z-Verhältnisses von hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.

A: Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung der K-/Z-Verhältnisse für die Flächen, berechnet anhand der Kernflächen, die über die Markierung der Kernlamina A und C ermittelt wurden, in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Gesamtpopulationen von mindestens 223 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ getestet. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der K-/Z-Verhältnisse für die Flächen als in die Lognormalverteilung gefittete Kurven. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 223 Zellen. Originalkurven in Abbildung 54C.

In der Zusammenschau zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kernfläche, der Zytoplasmafläche oder K-/Z-Verhältnisse der unbehandelten und mit IL-1 inkubierten hTERT-RPE-1. Weiterhin waren in den Verteilungen

der relativen Häufigkeiten der Kernflächen, Zytoplasmaflächen und der K-/Z-Verhältnisse keine eindeutigen Unterschiede zwischen der unbehandelten Population und den mit IL-1 behandelten Populationen zu erkennen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass der Entzündungsmediator IL-1 weder die Kernfläche noch die Zytoplasmafläche, und damit auch nicht das K-/Z-Verhältnis beeinflusst.

4.3 Reaktion von hTERT-RPE-1 Zellen auf IL-1 α

4.3.1 Translokation von p65 in den Zellkern

Der zu der NF- κ B-Familie gehörende Transkriptionsfaktor p65 transloziert als Teil des IL-1-Signalweges nach 10- bis 30-minütiger IL-1-Stimulation in den Zellkern (Mayr-Buro et al. 2019; Bacher et al. 2021). Wird p65 immunologisch angefärbt, ist dessen Lokalisation im Zellkern ein messbarer Parameter für die Reaktion der Zellen auf die Stimulation mit IL-1 auf Einzelzellebene (Meier-Soelch et al. 2021). Für die Analyse der Stärke dieser Reaktion sollte die relative Menge von p65 in den Zellkernen des in Kapitel 4.2 beschriebenen Experiments quantifiziert werden, wofür die Gesamtintensität der Immunfluoreszenz des Sekundärantikörpers Cy3 (mit welchem p65 indirekt markiert wurde) gemessen wurde.

Abbildung 24 stellt den Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der pro Zellkern detektierten Gesamtfluoreszenz für Cy3 als *Violin Plot* dar. In unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen war die Gesamtintensität im Mittel 91.292 (Median 81.641). Nach halbstündiger und einstündiger IL-1-Stimulation nahm die mittlere Gesamtintensität für Cy3 im Zellkern zu und lag nach 0,5h bei 117.575 (Median: 110.495) und nach 1h bei 120.482 (Median: 111.714). Nach drei und sechsständiger IL-1-Stimulation nahm die mittlere Gesamtintensität der Zellen wieder ab und betrug nach 3h 115.101 (Median: 101.336) und nach 6h 105.159 (Median: 93.817). Damit unterschied sich die Gesamtintensität in den Zellkernen aller behandelten Zellen signifikant von der Gesamtintensität in unbehandelten Zellkernen (Dunnett's-Test, $p < 0,05$). Nach 6h war die Gesamtintensität allerdings noch nicht wieder auf die Intensität in den Zellkernen unbehandelter Zellen zurückgegangen, obwohl, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, nach drei- und sechsständiger Stimulation nur Zellen analysiert worden waren, bei denen sich subjektiv deutlich mehr p65 im Zytosol als im Kern befand. Bei der Betrachtung der Interquartilsabstände (IQA) der Gesamtintensität fielen weitere Unterschiede zwischen den Populationen auf: in unbehandelten Zellen war der IQA mit 42.335 am geringsten und stieg nach halb- und einstündiger IL-1 Stimulation leicht auf 52.028 (0,5h) bzw. 55.466 (1h). Dies könnte eine relativ homogene p65-Menge innerhalb der Zellkerne andeuten. In den Zellen die 3h und 6h mit IL-1 behandelt worden waren, zeigten sich deutlich größere IQA von 71.774 (3h) und 73.911 (6h), was auf eine zunehmende Heterogenität der Stärke der p65-Translokation in der isogenen Zellpopulation hindeuten kann.

Die Ergebnisse spiegelten die bekannte Kinetik des IL-1 *signalings* wider, im Rahmen dessen nach halb- und einstündiger IL-1-Stimulation besonders viel p65 in die Zellkerne transloziert, welches diese nach 3h und 6h wieder verlässt (Meier-Soelch et al. 2021; Mayr-Buro et al. 2019). Zusätzlich konnten auch nach 6h IL-1-Behandlung noch viele Zellen, die höhere p65 Konzentrationen enthielten beobachtet werden, sowie eine Zunahme des IQA im Zeitverlauf der IL-1-Behandlung, die zusammen auf eine zunehmende Heterogenität der Reaktion der Gesamtpopulation im Zeitverlauf auf IL-1 hindeutet.

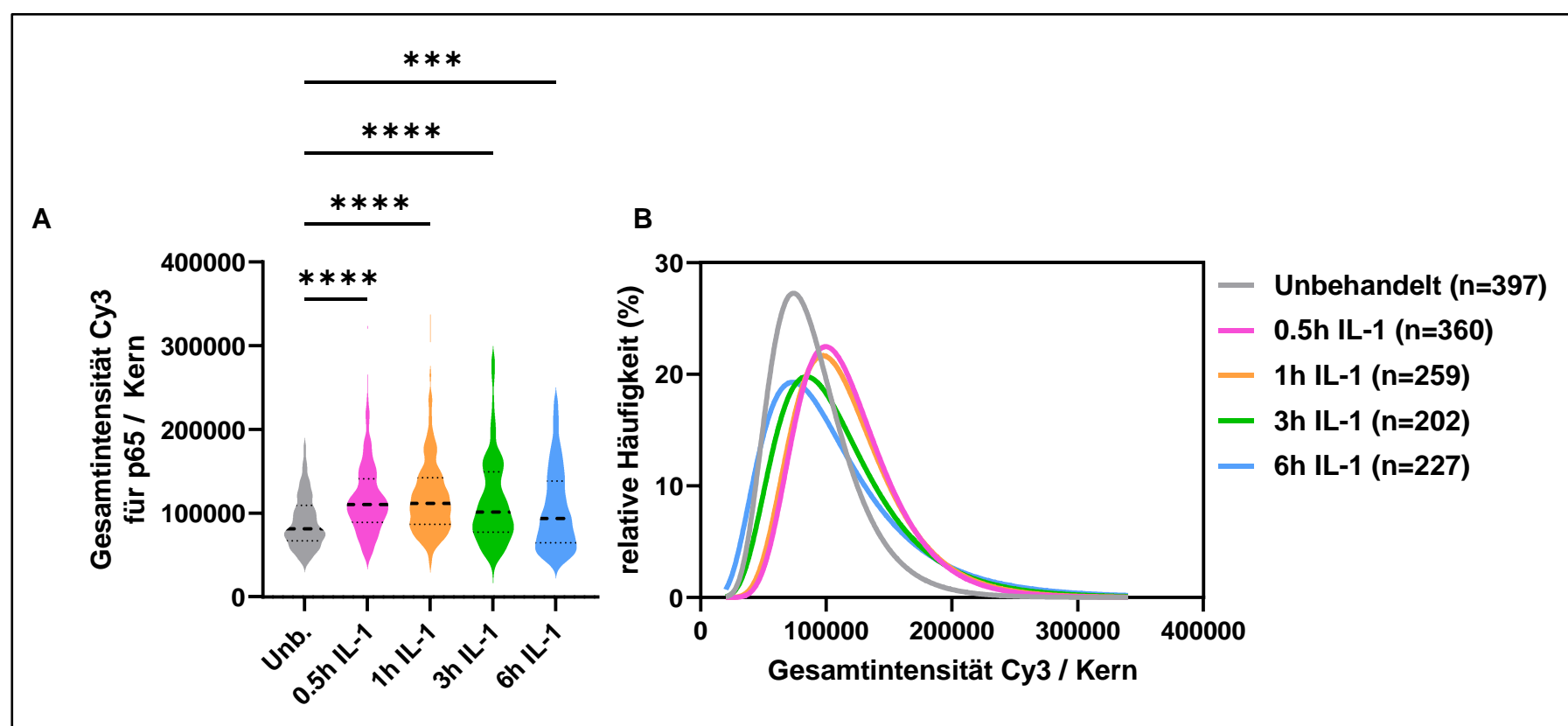


Abbildung 24: Die Gesamtintensität von Cy3 im Zellkern als indirektes Maß für die Stärke der Reaktion einer Zelle auf IL-1

A: Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung der intranukleären Gesamtfluoreszenzintensität des Cy3-Sekundärantikörpers, welcher p65 indirekt markierte, in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ getestet. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der intranukleären Gesamtfluoreszenzintensität des Cy3-Sekundärantikörpers, welcher p65 indirekt markierte, aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung.

4.3.2 Untersuchung aktiver Transkriptionsorte in Interleukin-stimulierten hTERT-RPE1-Zellen

Mit der RNA-FISH können RNA-Moleküle fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden (Femino et al. 1998). Sonden, die an intronische Abschnitte der ungespleißten prä-mRNA binden, können dazu verwendet werden aktive Transkriptionsstellen innerhalb des Zellkerns spezifisch darzustellen (Huang und Spector 1996). Diese Methode sollte genutzt werden, um zu untersuchen, ob und wie auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierte, aktive Gene sich innerhalb des nukleären Raumes bewegen und räumlich miteinander interagieren. Dafür wurde die RNA-FISH mit Sonden für mRNAs und prä-mRNAs der durch IL-1 induzierten Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* durchgeführt, nachdem die Zellen mit IL-1 α stimuliert worden waren. Diese drei Zielgene wurden gewählt, da *IL8* und *CXCL2* auf Chromosom 4 innerhalb derselben topologisch assoziierten Domäne (TAD) lokalisiert sind siehe Abbildung 24, während sich *IL6* auf Chromosom 7 befindet (Gene: *CXCL8* (ENSG00000169429) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 2021; Gene: *CXCL2* (ENSG00000081041) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 2021; Gene: *IL6* (ENSG00000136244) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 2021). Die Stimulation der Zellen mit IL-1 α erfolgte wie zuvor für 0,5h, 1h, 3h und 6h, um die dynamischen Veränderungen nach Hinzugabe eines IL-1-Stimulus im Laufe der Zeit zu erfassen.

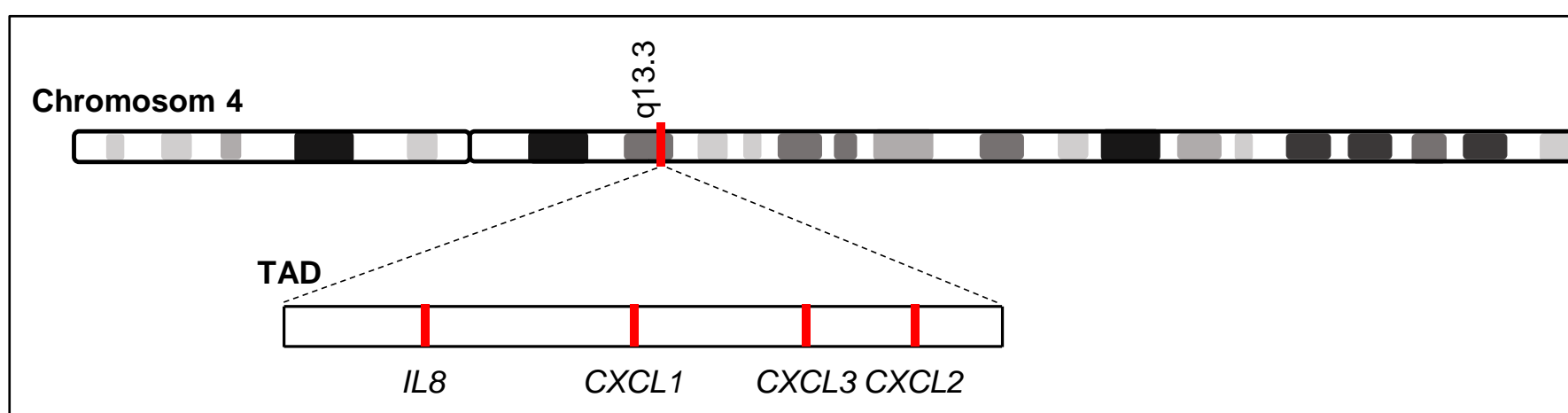


Abbildung 25: Schematische Darstellung der topologisch assoziierten Domäne TAD für *IL8*, *CXCL1*, *CXCL2* und *CXCL3*

Im oberen Abbildungsteil ist Chromosom 4 schematisch dargestellt. Der Abschnitt q13.3. enthält eine TAD, die die Gene *IL8* und *CXCL1-3* enthält. Diese TAD ist im unteren Abbildungsteil vergrößert schematisch gezeigt. Die Abbildung wurde anhand des *Ensemble genome browsers* und (Weiterer et al. 2020) erstellt.

Die Untersuchung der interchromosomalen Distanzen erfolgte zunächst in 2D, da interchromosomale Interaktionen selten sind und sich über lange Strecken ereignen (Maass et al. 2019). Zudem bestünde laut einer Studie von Finn et al. für die Untersuchung solcher Distanzen kein Unterschied zwischen den Ergebnissen von 2D und 3D Untersuchungen, sodass 2D durch den geringeren Aufwand vorteilhafter wäre (Finn et al. 2017). Weiterhin wird von Finn et al. argumentiert, dass die Untersuchung von radialen Genpositionen wahrscheinlich von 2D Analysen profitiere, weil diese meist im Verhältnis zur Kernfläche und zur Kernperipherie angegeben werden. Die Kernperipherie sei in 2D leichter durch den Computer zu erkennen, und erfordere daher eine geringere Rechenleistung (Finn et al. 2017).

Um die Bewegung aktiver Genorte im nukleären Raum zu erfassen, wurden hTERT-RPE1-Zellen in *IBIDI μ -Slides VI* ausgesät mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach 0,5h, 1h, 3h oder 6h Inkubation mit IL-1 α (10 ng/ml) wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C fixiert. Am folgenden Tag wurde eine RNA-FISH mit zwei verschiedenen Sondenkombinationen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden die Zellen mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA und *IL6* prä-mRNA inkubiert, um die aktiven Transkriptionsstellen (ATS) von *IL8* spezifisch darzustellen (Abb. 26). Im zweiten Ansatz wurden Sonden für *IL6* mRNA, *IL6* prä-mRNA und *CXCL2* prä-mRNA verwendet, um die ATS von *IL6* abzubilden (Abb. 28). Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem DMi8 Mikroskop von Leica und der LASX-Software und wurden mittels Icy Bioimaging Software analysiert. In die Auswertung wurden alle Zellen einbezogen, die eine unauffällige Morphologie aufwiesen, deren Zellumrisse vollständig im Bild erkennbar waren und in denen einzelne mRNA-Signale klar voneinander abgrenzbar waren.

In beiden Ansätzen stellten sich die Zellen im Phasenkontrast adhärent, mäßig konfluent und mit einem unauffälligen Phänotyp dar. Zudem konnten mit der Hoechst-Färbung ovale Zellkerne sichtbar gemacht werden. *IL8* mRNA konnte in Form von violetten punktförmigen Signalen dargestellt werden. In unbehandelten Zellen zeigten sich kaum solche Signale, wohingegen die Anzahl der *IL8* mRNA-Signale nach IL-1-Behandlung deutlich anstieg. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation waren in vielen Zellen wenige *IL8*-mRNA-Signale zu sehen, nach 1h und 3h wiesen viele Zellen multiple *IL8*-mRNA-Signale auf und nach 6h IL-1 Stimulation zeigte sich ein heterogenes Bild aus sehr vielen Zellen mit abundanten und Zellen mit wenigen *IL8* mRNA-Signalen. Dabei fand sich um den Zellkern herum die höchste Dichte an *IL8* mRNA-Signalen. Die genaue Quantifizierung der *IL8* mRNA-Signale findet sich in Kapitel 4.3.3. Nach der IL-1-Stimulation stellten sich *IL8* prä-

mRNA-Signale als rote Punkte dar, von denen maximal zwei große und viele kleine innerhalb eines Zellkerns detektiert werden konnten. Die beiden großen *IL8* prä-mRNA-Signale überlappen in der Regel mit den Signalen für fertig prozessierte *IL8* mRNA und markieren daher die eigentlichen Transkriptionsorte. Prä-mature *IL6* mRNA-Signale waren als grüne Punkte zu erkennen, und traten seltener als *IL8* prä-mRNA-Signale auf. Die FISH-Kontrolle wurde mit unbehandelten Zellen und ohne Sonden angefertigt und zeigte keine unspezifischen Signale.

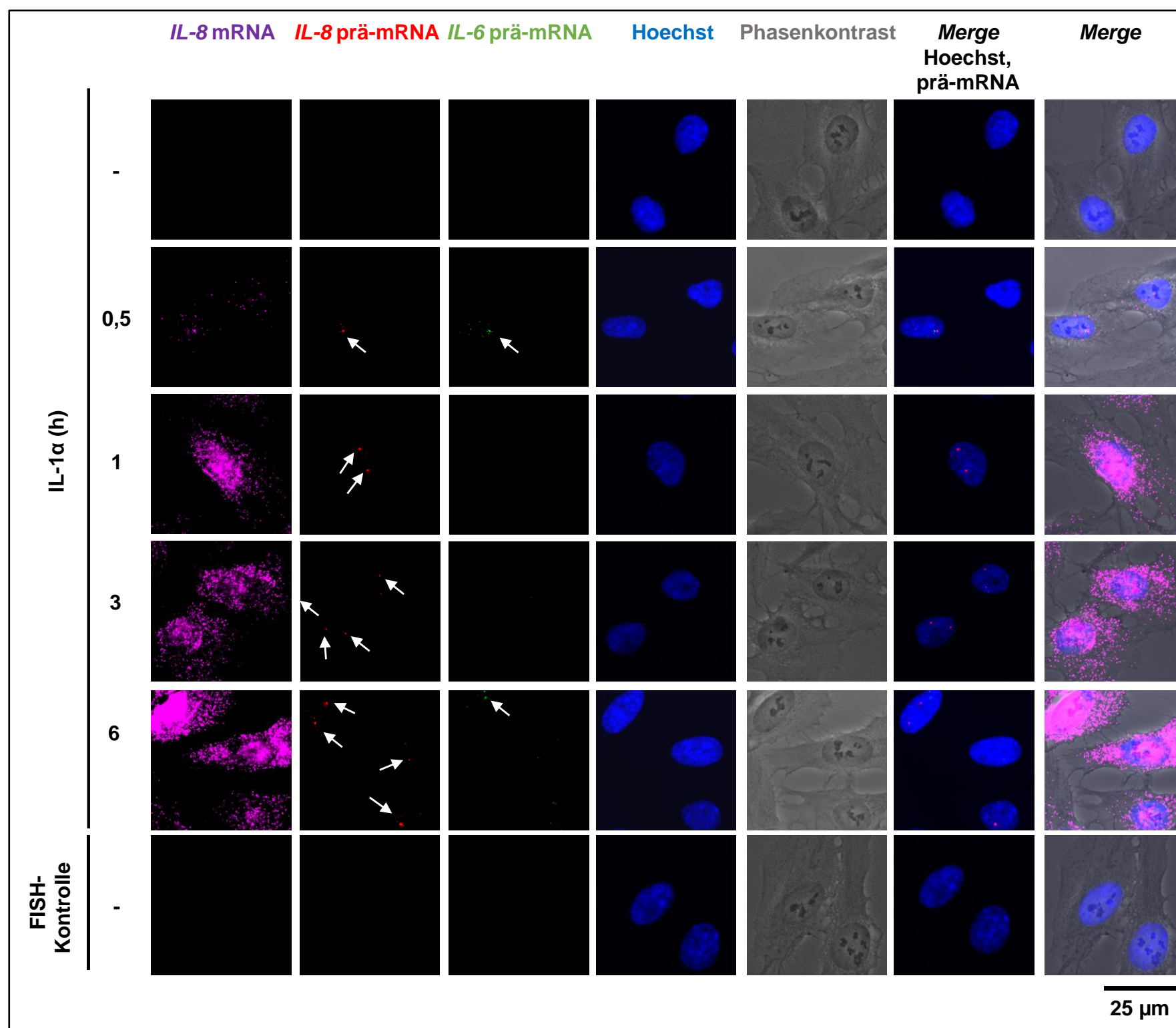


Abbildung 26: Darstellung der Zytokin-regulierten *IL8* mRNA, der Lokalisation von aktiven *IL8*- und *IL6*-Genen und der ATS von *IL8*.

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und für die angezeigten Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL8* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) und *IL6* prä-mRNA (#VA4-6001007; type 3) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Markierung der prä-mRNA-Signale mit weißen Pfeilen. Messbalken: 25 μ m.

Zunächst wurde analysiert welche und wie viele Genloci zum Zeitpunkt der Fixierung in den einzelnen Zellen aktiv transkribiert worden waren. In Abbildung 25A wird dargestellt, wie groß der Anteil der Zellen mit aktiven Genloci für *IL8* oder *IL6* von allen analysierten Zellen war. Dabei entsprach ein aktiver Genlocus einem detektierten prä-mRNA-Signal, weil die Herstellung der prä-maturen mRNA, sowie ihre Prozessierung in den Spleißosomen direkt an der Transkriptionsstelle stattfindet (Wada et al. 2009). In unbehandelten Zellen waren nur in 3,83 % der Zellen *IL8*-oder *IL6*-Genloci aktiv. Nach einer halbstündigen IL-1 Stimulation stieg der Anteil an Zellen mit aktiven *IL8*- oder *IL6*-Genloci auf das erfasste Maximum von 61,38 % aller Zellen. Zu späteren Zeitpunkten nach der Stimulation mit IL-1 sank der Anteil der Zellen mit aktiven Genloci langsam wieder und erreichte nach 6h 40,28 %.

Abbildung 25B zeigt die Häufigkeit der möglichen Kombinationen, in denen die Gene *IL8* und *IL6* in den einzelnen Zellen aktiv waren, in Prozent von der Gesamtpopulation. Zu erkennen ist, dass in unbehandelten Zellen fast alle aktiven Genloci *IL6*-Genloci waren (3,55 % von

3,82 % aller Zellen). Dies änderte sich nach einer halbstündigen Stimulation mit IL-1. In insgesamt 57,35 % der Zellen waren *IL8*-Genloci aktiv, *IL6*-Genloci allerdings nur in insgesamt 13,54 % der Zellen. Diese Verteilung zwischen den detektierten *IL8*- und *IL6*-prä-mRNAs war für die anderen Zeitpunkte sehr ähnlich und zeigte, dass *IL8* häufiger durch IL-1 induziert wurde. Im Zeitverlauf waren für *IL8* die meisten Genloci nach halbstündiger IL-1-Stimulation aktiv (57,35 % aller Zellen). Nach längerer Stimulation sank die Zahl der aktiven *IL8* Genloci sukzessive auf 37,5 % der Zellen nach 6h. Auch für *IL6* zeigten sich nach halbstündiger IL-1-Stimulation die meisten aktiven Genloci (17,58 % aller Zellen). Nach 6h IL-1 waren nur noch in 11,07 % der Zellen *IL6* Genloci aktiv.

Weiterhin fällt auf, dass nach 0,5h IL-1-Behandlung in 22,48 % aller Zellen an beiden *IL8*-Allelen Transkription stattfand. Im Gegensatz dazu wurde *IL6* nur in 2,59 % aller Zellen biallelisch exprimiert. In den anderen behandelten Populationen unterschieden sich die *IL8*- und *IL6*-Genaktivität ebenso deutlich, was auf eine im Vergleich zu *IL6* stärkere Induktion der *IL8*-Genaktivität hindeutete. Dies deckte sich mit den in den Mikroskopaufnahmen (Abbildung 24) beobachteten Unterschieden zwischen *IL8* und *IL6*, sowie mit der Quantifizierung der mRNA (siehe Kapitel 4.3.3). Zuletzt ist zu sehen, dass *IL6*-Genloci nach 0,5h IL-1-Stimulation in nur 4,04 % aller Zellen aktiv war, wenn in diesen Zellen keine *IL8* prä-mRNAs detektiert wurden. In 13,54 % der Zellen konnten nach halbstündiger IL-1-Behandlung zeitgleich *IL8* und *IL6* prä-mRNA-Signale detektiert werden. Ein ähnliches Muster war für die anderen Zeitpunkte zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis auf eine Koregulation des *IL6* Genes durch das aktive *IL8*-Gen sein.

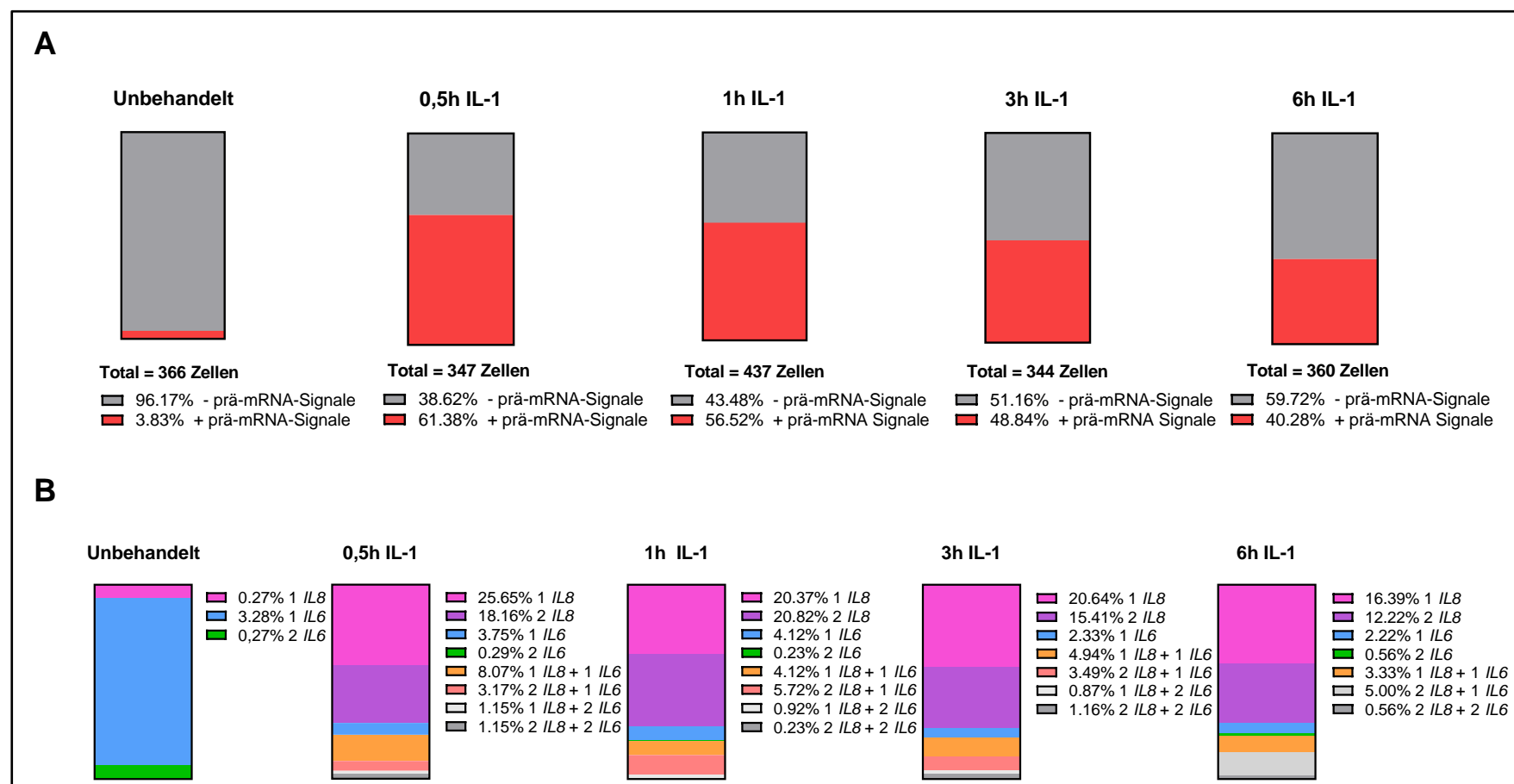


Abbildung 27: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Genloci für *IL8* und *IL6* relativ zur Gesamtpopulation.

A: Darstellung des relativen Anteils (%) der Zellen mit (+) und ohne (-) prä-mRNA Signale für *IL8* oder *IL6* in Bezug auf die Gesamtpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation aus 3 unabhängigen Experimenten für eine Gesamtpopulationen von mindestens 344 Zellen. **B:** Darstellung des Vorkommens verschiedener Kombinationen aktiver *IL8* und *IL6* Genloci innerhalb einer Zelle als relativer Anteil der Gesamtpopulation (%)

In den Zellen, die mit der zweiten Sondenkombination untersucht wurden, stellten sich die *IL6* mRNA-Signale ebenfalls als violette Punkte dar. Diese waren bereits in unbehandelten Zellen in geringem Umfang vorhanden und wurden nach der IL-1-Stimulation zahlreicher. Allerdings erreichten sie nie die Anzahl, welche nach 1h und 3h IL-1 für die *IL8* mRNA beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der Quantifizierung der *IL6* mRNA-Signale findet sich in Kapitel 4.3.3. *CXCL2* prä-mRNA-Signale präsentierten sich nach der Stimulation mit IL-1 als kleine rote Punkte innerhalb des Zellkerns, von denen maximal zwei große und viele kleine in einer Zelle auftraten. In ähnlicher Form und Menge konnten auch hier die *IL6* prä-mRNA-Signale in grün identifiziert werden.

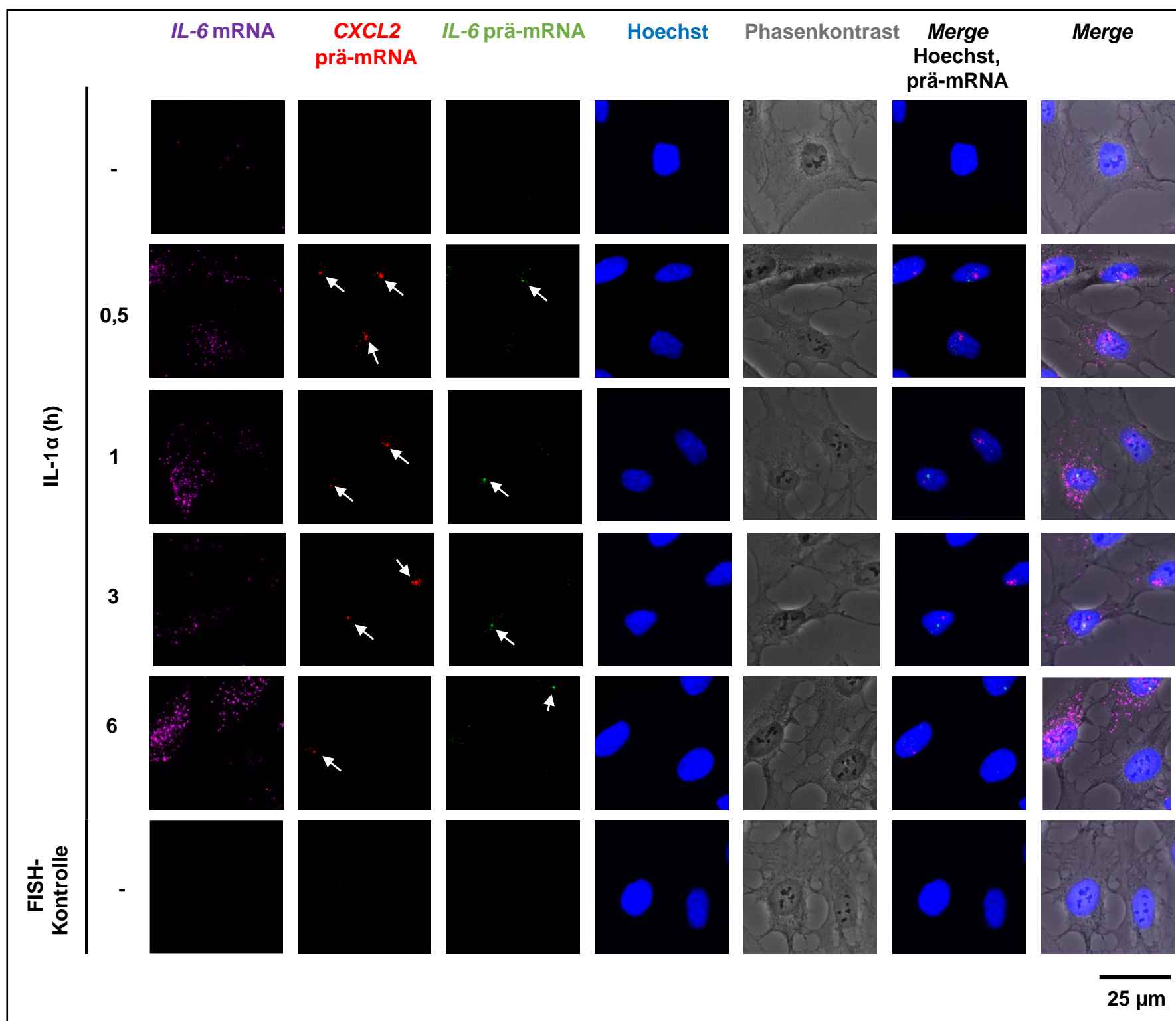


Abbildung 28: Darstellung der Zytokin-regulierten *IL6* mRNA, der Lokalisation von aktiven *CXCL2*- und *IL6*-Genen und der ATS von *IL6*.

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL6* mRNA (#VA6-612712; Cy5), und *IL6* prä-mRNA (#VA4-6001007; DL488) und *CXCL2* prä-mRNA (#VA1-6001011; Cy3) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Markierung der prä-mRNA Signale mit weißen Pfeilen. Messbalken: 25 μ m.

In Abbildung 27A ist der Anteil der Zellen mit aktiven *CXCL2*- oder *IL6*-Genloci in Prozent von der Gesamtpopulation für die unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. In 8,96 % der unbehandelten Zellen wurden *CXCL2*- oder *IL6*-prä-mRNA-Signale detektiert. Nach 0,5h einer Stimulation mit IL-1 erhöhte sich die Menge der Zellen in denen *CXCL2* oder *IL6* prä-mRNA-Signale vorlagen auf 46,78 %. Zu späteren Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation nahm der Anteil der Zellen mit aktiven Genloci nach und nach ab und entsprach nach 6h Stimulation mit IL-1 31,25 % der Gesamtpopulation. Insgesamt ist der Anteil der Zellen, in denen zum Zeitpunkt der Fixierung nach IL-1 Behandlung *CXCL2* oder *IL6* Genloci aktiv waren, geringer als der Anteil der Zellen in denen *IL8* oder *IL6* prä-mRNAs detektiert wurden. Die relative Häufigkeit des Auftretens der unterschiedlichen Kombinationen der Genaktivität von *CXCL2* oder *IL6* innerhalb der einzelnen Zellen ist in Abbildung 27B veranschaulicht. In 5,6 % der unbehandelten Zellen lag *IL6* und in 3,36 % der Zellen *CXCL2* prä-mRNA vor. Im Gegensatz dazu waren nach IL-1 Stimulation häufiger die *CXCL2*-Genloci als *IL6*-Genloci aktiv. Die meisten aktiven *CXCL2* Genloci kamen in den Zellen nach 0,5h IL-1-Stimulation vor (38,46% aller Zellen). Die meisten aktiven *IL6* Genloci waren in diesem Ansatz nach dreistündiger IL-1-Stimulation zu detektieren (25,28 % aller Zellen). Die Häufigkeit biallelischer Genaktivität unterschied sich zwischen den Genen von *IL6* und *CXCL2* nach 0,5h Stimulation mit IL-1 kaum. Nach 3h und 6h der IL-1-Stimulation stieg der Anteil der Zellen in denen 2 *IL6*-Allele aktiv waren, von 1,66 % auf 3,04 bzw. 3,44 %, was auf eine verzögerte Aktivierung der *IL6*-Transkription hinweisen könnte. Nach 0,5h IL-1-Stimulation konnten in 8,77 % der Zellen nur aktive *IL6*-Genloci detektiert werden, in 12,57 % der Zellen dagegen aktive *CXCL2*- und *IL6*-

Genloci. Zu späteren Zeitpunkten nach IL-1 Stimulation ist dieser Unterschied nicht oder nur geringfügig zu beobachten, sodass eine Koregulation der beiden Genorte eher unwahrscheinlich erscheint.

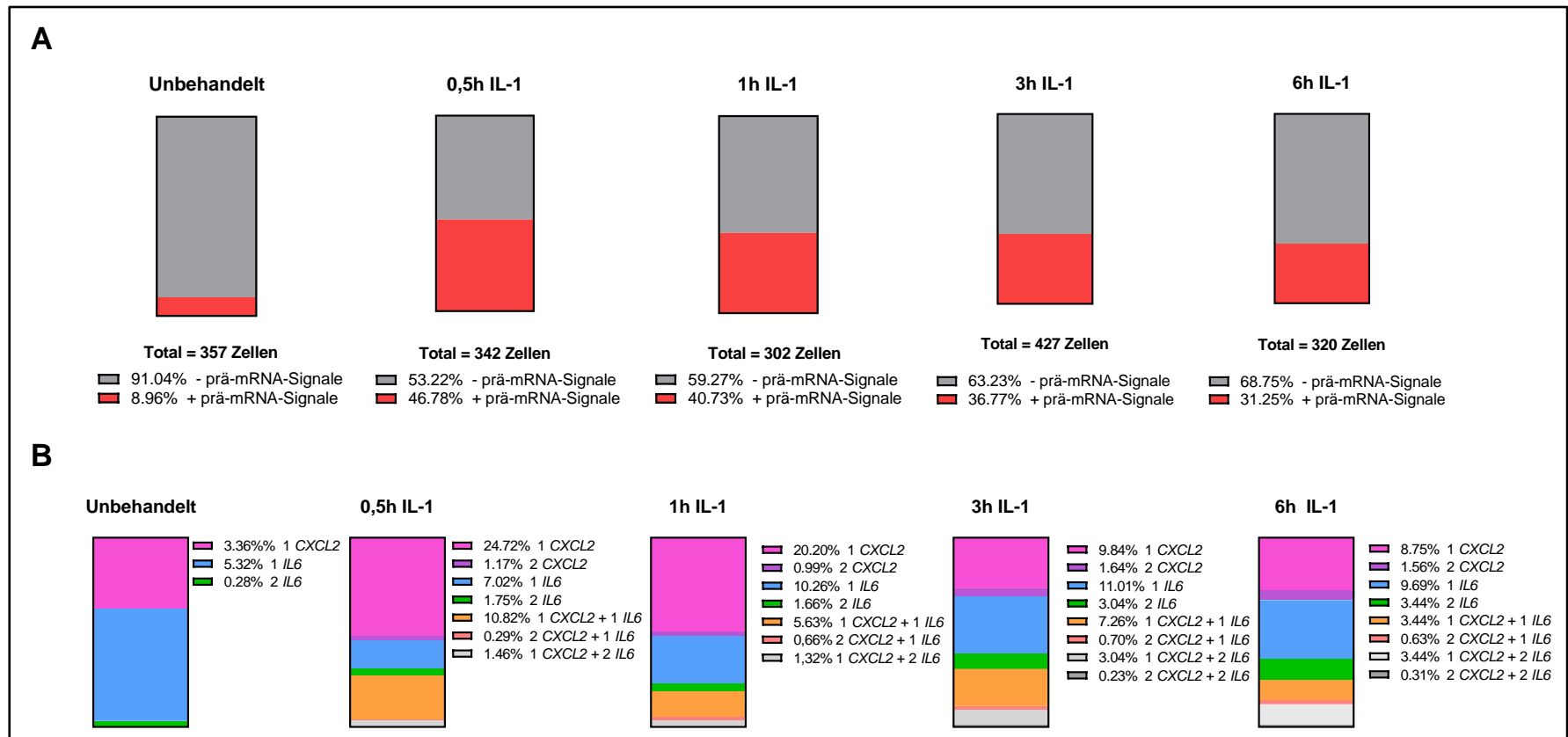


Abbildung 29: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Genloci für CXCL2 und IL6 relativ zur Gesamtpopulation.

A: Darstellung des relativen Anteils (%) der Zellen mit (+) und ohne (-) prä-mRNA-Signale für CXCL2 oder IL6 in Bezug auf die Gesamtpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation aus 3 unabhängigen Experimenten für Gesamtpopulationen von mindestens 302 Zellen. **B:** Darstellung des Vorkommens verschiedener Kombinationen aktiver CXCL2- und IL6- Genloci innerhalb einer Zelle als Anteil von der Gesamtpopulation (%)

Zusätzlich wurden Kolokalisationen der prä-mRNA und der mRNA desselben Genes identifiziert. Diese zeigten sich im ersten Ansatz für IL8 als große violette-rote Punkte und im zweiten Ansatz für IL6 als weiße Punkte (vergleiche Abbildung 10A). Das gleichzeitige Vorkommen der beiden RNA-Spezies am selben Ort deutet auf eine aktive Transkriptionsstelle (ATS) hin, da dort aktiv prä-mRNA transkribiert und zu maturaer mRNA prozessiert wird (Wada et al. 2009) In Abbildung 28A sind die relativen Häufigkeiten der ATS für das IL8-Gen dargestellt. In unbehandelten Zellen konnte in 100 % der Zellen keine ATS für IL8 dargestellt werden, da zu diesem Zeitpunkt weder IL8 mRNA noch IL8 prä-mRNA in den Zellkernen vorlagen. Nach IL-1 Stimulation nahm die Menge der detektierten ATS stark zu: nach 0,5h IL-1-Behandlung besaßen 47 % der Zellen keine, 35 % eine und 18 % zwei ATS des IL8-Genes. Der Anteil der Zellen mit biallelischer Transkription erhöhte sich nach 1h IL-1-Behandlung nochmals auf 21 % der Gesamtpopulation. Nach dreistündiger IL-1-Stimulation nahm zunächst der Anteil der Zellen mit biallelischen ATS des IL8-Genes auf 14 % der Zellen ab, während der Anteil der Zellen mit einer ATS konstant blieb. Nach 6h nahm auch der Anteil der Zellen mit einer ATS auf 20 % ab, sodass zu diesem Zeitpunkt noch in 34 % der Zellen ATS des IL8-Genes vorlagen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkription am IL8-Gen nach 0,5h und 1h IL-1 besonders stark induziert wurde, und dass die aktive Transkription dieses Chemokin-Genes auch für mehrere Stunden während der IL-1-Stimulation aufrechterhalten wird.

Abbildung 28B zeigt den Anteil der Zellen mit und ohne ATS für die IL6 für verschiedene Zeitpunkte der IL-1 Stimulation und in unstimulierten Zellen. Auch für IL6 gab es in 99% der unbehandelten Zellen keine ATS. Nach dreißigminütiger IL-1-Stimulation zeigten 16 % der Zellen eine ATS für das IL6-Gen. Im Gegensatz zum IL8-Gen konnten aber nur in 0,6 % der Zellen zwei ATS detektiert werden. Der Anteil der Zellen mit monoallelischen ATS blieb bis nach 3h der IL-1-Stimulation konstant bei 14-15 % und nahm nach 6h der IL-1-Behandlung leicht auf 10 % der Gesamtpopulation ab. Auffällig war weiterhin, dass nach 3h und 6h der Stimulation 4 % der Zellen zwei ATS pro Zelle zeigten. Diese Verteilung deutet auf eine schwächere und möglicherweise verzögerte Induktion der IL6-Transkription durch IL-1 hin.

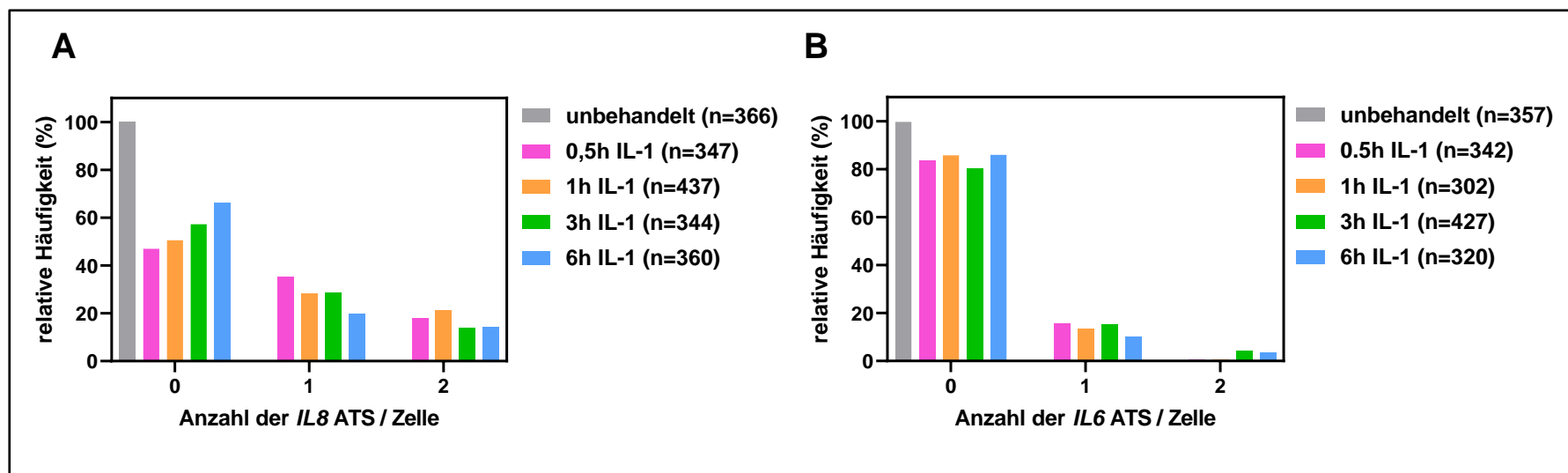


Abbildung 30: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Transkriptionsstellen (ATS) für die Genloci von *IL8* und *IL6*.

A: Darstellung der relativen Häufigkeiten der ATS des *IL8*-Gens pro Zelle aus 3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt mindestens 347 Zellen pro Bedingung als Säulendiagramm. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der Anzahl der ATS des *IL6*-Gens pro Zelle aus 3 unabhängigen Versuchen mit insgesamt mindestens 302 Zellen pro Bedingung als Säulendiagramm

Die Quantifizierung der prä-mRNA-Signale und ATS zeigte insgesamt, dass in unstimulierten hTERT-RPE1-Zellen IL-1-Zielgene nur in geringen Maßen aktiv waren. Dementsprechend lag keine Voraktivierung der Zellen vor. Am häufigsten fand die Transkription im Ruhezustand am *IL6*-Gen statt. Nach IL-1-Stimulation wurde die Transkription an allen drei Zielgenen auf unterschiedliche Weise induziert. Die *IL8*-Genloci waren am häufigsten und häufig auch biallelisch aktiv. Aktive Transkription an *IL6*-Genloci wurde seltener und erst nach 3h und 6h für zwei Allele einer Zelle detektiert, was auf eine schwächere und verzögerte Induktion der *IL6*-Expression durch IL-1 hindeuten kann. Weiterhin kann die häufigere Aktivität des *IL6*-Genlocus, in Zellen in denen gleichzeitig *IL8*-Genloci aktiv waren ein Hinweis auf eine interchromosomale Koregulation sein.

4.3.3 mRNA-Expression auf Einzelzellebene

Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale von RNA-Sonden für *IL8* und *IL6* mRNA gibt Aufschluss über das Ausmaß der mRNA-Expression auf Einzelzellebene.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Anzahl einzelner mRNA-Signale oder die kumulative Fluoreszenzintensität aller Signale für die Quantifizierung der mRNA-Menge pro Zelle der geeignetere Parameter war. Dafür wurde die Anzahl der detektierten Signale pro Zelle mit der Fluoreszenzintensität im Cy5-Kanal korreliert (Anhang Abb. 58). In Abbildung 58A sind die *Scatter Plots* der Korrelationen für die *IL8* mRNA-Menge für alle Zeitpunkte dargestellt. Abbildung 58C zeigt die dazugehörige Korrelationstabelle, in der die verschiedenen Korrelationskoeffizienten r miteinander verglichen wurden. Für die *IL8* mRNA ergab sich für alle Zeitpunkte ein sehr starker gleichsinniger Zusammenhang zwischen der Signalanzahl und der Cy5-Gesamtintensität mit signifikanten Korrelationskoeffizienten zwischen 0,78 und 0,9 (t-Test für den Korrelationskoeffizienten; $p < 0,05$). Daher konnten beide Parameter als gleichwertig betrachtet werden. Abbildung 58B zeigt die *Scatter Plots* der Korrelation der *IL6* mRNA-Signalanzahl mit der Cy5-Gesamtintensität pro Zelle und Abbildung 58D die dazugehörige Korrelationstabelle. Nach 0,5h, 1h, 3h und 6h IL-1-Stimulation ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle und der Cy5-Intensität mittel stark bis stark positiv (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,41 und 0,71) und unterscheidet sich signifikant von 0 (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p < 0,05$). In unbehandelten Zellen bestand kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern. Da die Anzahl der mRNA-Signale der anschaulichere Parameter ist, wurde entschieden, ihre Menge als Marker für die Transkriptionsaktivität der einzelnen Zellen heranzuziehen.

Die Anzahl der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1 Stimulation sind in Abbildung 29A gezeigt. In unbehandelten Zellen waren im Mittel 6 Signale und im Median 0 Signale detektierbar, was in dem *Violin Plot* aufgrund der an die starke Geninduktion angepassten Skalierung nicht zu sehen ist. Die Darstellung der Anzahl der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle als Häufigkeitsverteilung (Abbildung 29B) macht deutlich, dass in unbehandelten Zellen 98 % der Zellen keine *IL8* mRNA-Signale enthalten. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen insgesamt wenig vorstimuliert waren.

0,5h bis 6h nach der IL-1-Behandlung erhöhte sich die *IL8*-mRNA-Menge pro Zelle signifikant (Dunnett's Test, $p < 0,05$): nach 0,5h IL-1-Behandlung konnten pro Zelle im Mittel 167 *IL8* mRNA-Signale detektiert werden (Median: 167, IQA: 225). Nach 1h der IL-1-Stimulation stieg die Menge der *IL8* mRNA pro Zelle weiter an, so enthielten die Zellen im Mittel 456 *IL8* mRNA Signale pro Zelle (Median: 476, IQA: 256). Danach sank die mittlere *IL8* mRNA-Menge pro Zelle wieder ab, auf im Mittel 307 Signale pro Zelle nach 6h (Median: 253, IQA: 443). Zu den späteren Zeitpunkten nach IL-1 Stimulation deuteten der große Unterschied zwischen Median und Mittelwert, sowie der große Interquartilsabstand auf eine starke Streuung, und damit auf eine Inhomogenität innerhalb der Zellpopulation hin.

Bei der Betrachtung der Form der *Violin Plots* fällt auf, dass es zu jedem Zeitpunkt nach IL-1 Stimulation eine Gruppe von Zellen gab, die weniger *IL8* mRNA Signale enthielt als die anderen Zellen. Einen genaueren Einblick in die Aufspaltung der Gesamtpopulation in Subpopulationen bietet die Darstellung als relative Häufigkeitsverteilung (Abbildung 31B): Nach halbstündiger IL-1-Stimulation ist die Aufteilung der Gesamtpopulation in zwei Subpopulationen zu sehen, von der die eine unter 100, und die andere 100 bis 500 *IL8* mRNA-Transkripte enthielt. 27 % der Zellen stellen die Subpopulation mit wenigen Transkripten dar, die Population mit 100-500 Transkripten machen die restlichen 72 % der Gesamtpopulation aus. Nach einstündiger IL-1-Stimulation enthielten nur noch 8 % der Zellen weniger als 100 Transkripte, der Rest der Zellen zeigte eine symmetrische Häufigkeitsverteilung. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in der untersuchten Zellpopulation die homogenste Transkriptionsaktivität nach IL-1-Stimulation. Nach einer dreistündigen Behandlung mit IL-1 zerfiel die Gesamtpopulation in eine dreigipflige Häufigkeitsverteilung, wobei 24 % der Zellen unter 100 *IL8* mRNA-Signale, 59 % der Zellen zwischen 100 und 700 *IL8* mRNA Signale und 17 % der Zellen zwischen 700 und 1164 *IL8* mRNA-Transkripte besaßen. Auch nach sechsstündiger IL-1-Stimulation zeigte die Häufigkeitsverteilung eine zweigipflige Form, mit dem ersten Gipfel unter 100 *IL8* mRNA-Signale pro Zelle und dem zweiten Gipfel zwischen 100 und 1100 *IL8* mRNA-Signale.

Die „*low expressing*“-Subpopulation war nach einstündiger IL-1-Behandlung am kleinsten. Darum wäre es vorstellbar, dass es bei der *low expressing*-Subpopulation um Zellen handelt, in denen noch keine *IL8* mRNA-Transkripte nach einem Stimulationszeitraum von 0,5h hergestellt wurden. 3h und 6h nach der IL-1-Stimulation wurde die *low expressing* Subpopulation wieder größer und könnte sich aus Zellen zusammensetzen, die noch nie oder nicht mehr *IL8* mRNA exprimierten. Im Kontrast zu den Zellen mit unter 200 *IL8* mRNA-Signalen stand die Gruppe von Zellen, die nach 3h und 6h IL-1-Behandlung besonders viele (nach 3h bis zu 1164) *IL8* mRNA-Transkripte enthielt.

In Abbildung 31C sind der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der *IL6* mRNA Signale, die pro Zelle detektiert wurden als *Violin Plot* visualisiert. In unbehandelten hTERT-RPE1-Zellen kamen im Mittel 9 *IL6* mRNA-Signale vor (Median: 7, IQA: 8). Nach halbstündiger Stimulation mit IL-1 nahm die *IL6* mRNA-Menge pro Zelle im Mittel auf 34 Signale zu (Median: 15, IQA: 35). Die maximale mittlere *IL6* mRNA-Menge pro Zelle wurde nach 3h mit dem IL-1-Stimulus erfasst und lag bei 82 Signalen pro Zelle (Median: 41; IQA: 105). Durch 6h IL-1-Behandlung sanken die mittleren *IL6* mRNA-Signale pro Zelle wieder leicht auf 73 Signale pro Zelle (Median: 28; IQA: 93). Der Unterschied zwischen Mittelwert und Median, sowie der große Interquartilsabstand deuten auf eine starke Streuung und viele Ausreißer mit großen *IL6* mRNA-Mengen hin. Auch in der Form der *Violin Plots* zeigte sich, dass es eine große Subpopulation an Zellen gab, die moderate Mengen *IL6* exprimierten und eine Subpopulation, die sich aus Ausreißern mit starker *IL6* Expression zusammensetzte. Die relative Häufigkeitsverteilung stellt die Subpopulationen genauer dar (Abb. 31D). In unbehandeltem Zustand wurden in den meisten Zellen (62 %) unter 20 *IL6* mRNA-Signale detektiert und mehr als 60 Signale kamen in keiner Zelle vor. Nach 0,5h der IL-1-Stimulation wurden ebenfalls in den meisten Zellen unter 20 *IL6* mRNA Signale gefunden, allerdings war die Verteilung nach rechts verschoben, was unter anderem daran ersichtlich ist, dass nur noch 39 % der Zellen weniger als 20 Signale enthielten. 1h, 3h und 6h der IL-1-Behandlung führten zu einer noch weiter nach rechts verschobenen Verteilung, die ihren Häufigkeitsgipfel bei 20 bis 40 *IL6* mRNA-Transkripten pro Zelle hatte. Dabei hatte die Häufigkeitsverteilung der IL-1 Stimulation eine sehr linksgipflige Form, mit einer starken Streuung in die Richtung größerer *IL6* mRNA-Mengen. So enthielten 1h nach dem IL-1 Stimulus etwa 24 % der Gesamtpopulation zwischen 100 und 720 *IL6* mRNA-Signale.

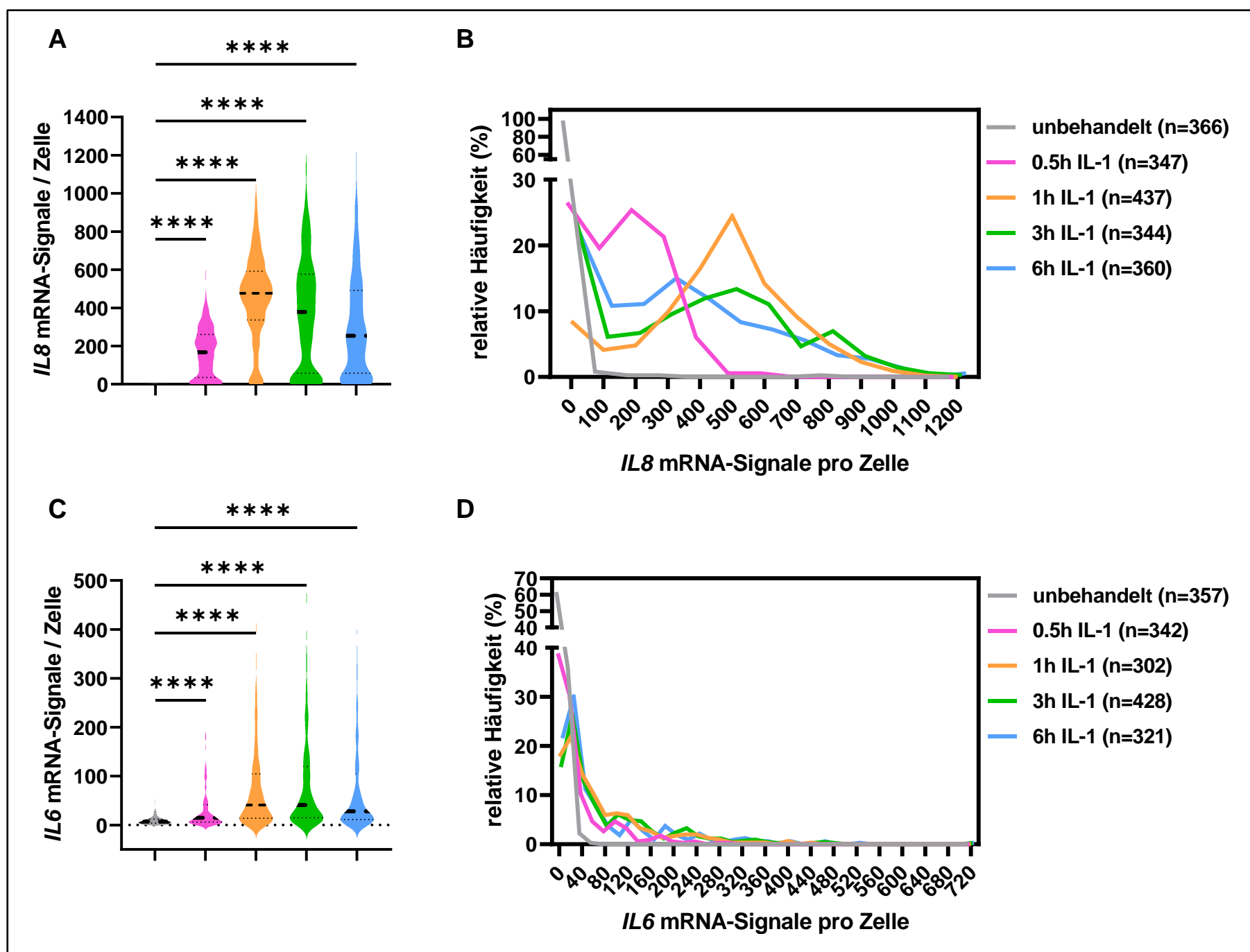


Abbildung 31: Quantifizierung der *IL8* und *IL6* mRNA-Signale pro Zelle in IL-1 stimulierten hTERT-RPE1-Zellen .

A: Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 344 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet. ****: $p<0,0001$. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle. **C:** Darstellung der Mediane, Interquartilsabstände und der Häufigkeitsverteilung der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle in einem *Violin Plot* aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 302 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $\alpha =0,05$ getestet. ****: $p<0,0001$. **D:** Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle.

Allgemein ist festzuhalten, dass in unbehandelten hTERT-RPE1-Zellen kaum mRNA für *IL8* oder *IL6* vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nicht voraktiviert waren, was zur Verfälschung der Ergebnisse der Untersuchungen intranukleärer Distanzen hätte führen können. Die Expression von *IL8* wurde durch IL-1 auf ein Vielfaches des Ausgangswertes induziert, wohingegen die Transkriptionsaktivität der einzelnen Zellen für *IL6* meist nur leicht erhöht wurde. Der Ablauf und die Stärke der *IL-8* und *IL6* mRNA-Induktion entspricht bereits beobachteten Mustern für diesen Zelltyp (Maßmann 2021) und kann somit als normal eingeordnet werden. Aus diesem Grund konnten diese Versuche für weitere Analysen verwendet werden. Weiterhin ist festzustellen, dass die Transkription von *IL8* und *IL6* in der isogenen Zellpopulation nicht homogen zu erfolgen scheint, sondern sich vor allem nach 0,5h, 3h und 6h IL-1-Behandlung Subpopulationen bildeten, die als *low expressors* und *high expressors* beschrieben werden könnten.

4.4 Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivität und dem Vorkommen aktiver Transkriptionsstellen

Die im letzten Abschnitt dargelegten Beobachtungen warfen die Frage auf, ob die Inhomogenität der Transkriptionsaktivität der Zellen mit dem Vorkommen oder der Abwesenheit aktiver Transkriptionsstellen zusammenhing. Für die Beantwortung dieser Frage, wurde die Gesamtpopulation der mit der *IL8* mRNA-Sonde markierten Zellen in zwei Gruppen - Zellen ohne *IL8* prä-mRNA-Signal und Zellen mit ein oder zwei *IL8* prä-mRNA Signalen - geteilt. Ebenso wurde mit den mit der *IL6* mRNA-Sonde inkubierten Zellen verfahren, und somit die

Gesamtpopulation dieses Ansatzes in die Gruppen „kein“ und „ein bis zwei *IL6* prä-mRNA-Signale“ unterteilt. Die Anzahl der *IL8* und *IL6* mRNA-Transkripte pro Zelle wurde anschließend für die beiden Subpopulationen getrennt als *Violin Plot* dargestellt (Abb. 32A und E).

In den unstimulierten Zellen waren keine *IL8* prä-mRNA-Signale detektierbar (vergleiche Kapitel 4.3.3.). Daher konnte für diese Bedingung kein Vergleich zwischen Zellen mit und ohne prä-mRNA-Signalen durchgeführt werden. In Abbildung 30A-D wurden die unbehandelten Zellen aus diesem Grund nicht mitaufgeführt. Nach ein-, drei-, und sechsständiger IL-1-Stimulation konnten im Mittel signifikant mehr *IL8* mRNA-Signale pro Zelle in Zellen mit *IL8* prä-mRNA-Signalen ermittelt werden als in Zellen ohne (Sidaks-Test, $p < 0,05$) (Abb. 32A).

Weiterhin waren die Häufigkeitsverteilungen der beiden Subpopulationen unterschiedlich (Abb. 32 A, C, D): In der Gruppe ohne aktive *IL8* Genloci konnten nach halbstündiger IL-1-Behandlung 40 % der Zellen der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen *low expressing* Subpopulation zugeteilt werden, da sie unter 100 *IL8* mRNA-Transkripte enthielten. In den Zellen mit aktiven *IL8* Genloci war diese Subpopulation nach 0,5h IL-1 nur 16 % der Zellen stark und damit viel kleiner. Dieser Unterschied blieb im Zeitverlauf bestehen, so enthielten nach einstündiger IL-1-Behandlung 15 % der Zellen ohne prä-mRNA-Signale weniger als 100 *IL8* mRNA-Transkripte, in den Zellen mit prä-mRNA-Signalen dagegen nur 2% der Zellen. Auch nach dreistündiger IL-1-Stimulation war die *low expressing* Subpopulation in Zellen mit *IL8* prä-mRNA-Signalen kleiner (16 % der Zellen) als in Zellen ohne (31 % der Zellen). Dagegen enthielt die *high expressing* Subpopulation, in deren Zellen mehr als 100 *IL8* mRNA Signale pro Zelle detektiert werden konnten, nach 3h IL-1-Stimulation in der Gruppe mit aktiven Genloci mit 84 % der Zellen mehr Zellen als in der Gruppe ohne aktive Genloci (69 % der Zellen). Nach 6h IL-1-Stimulation gab es in der Subpopulation mit prä-mRNA-Signalen mit 2 % der Zellen besonders wenige Zellen mit unter 100 *IL8* mRNA-Signalen, aber viele Zellen (98 %) mit mehr als 100.

So kann insgesamt festgehalten werden, dass die *IL8* mRNA-Menge, damit zusammenhängend, ob zum Zeitpunkt der Fixierung gerade aktive Transkription in der jeweiligen Zelle stattfand. Insbesondere zeigte sich eine prolongierte *IL8* mRNA-Synthese in den Zellen mit ebenfalls aktiven Genen, worauf geschlossen werden kann, dass eher prä- und -transkriptionelle und nicht posttranskriptionelle Veränderungen für eine heterogene und prolongierte Reaktion auf IL-1. Allerdings zeigte der Vergleich der mittleren *IL8* mRNA-Menge in Zellen mit monoallelischer Transkription mit der mittleren *IL8* mRNA-Menge in Zellen mit biallelischer *IL8* mRNA-Transkription nur nach sechsständiger IL-1-Behandlung einen signifikanten Unterschied (Sidaks-Test, $p = 0,05$) (Abbildung 30B). Also schien die biallelische im Vergleich zur monoallelischen Genaktivierung für die Menge der *IL8* mRNA nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Abbildung 30E stellt den Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle in Zellen mit ein oder zwei und in Zellen ohne *IL6* prä-mRNA-Signale für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation dar. Auch für dieses Zytokin waren signifikant größere Mengen mRNA in Zellen mit prä-mRNA-Signalen als in den Zellen ohne prä-mRNA zu detektieren (Sidaks-Test, $p < 0,05$). Des Weiteren streute die *IL6* mRNA-Menge in den Zellen mit *IL6* prä-mRNA-Signalen weiter. Auch die Dynamik der mRNA-Transkription unterschied sich zwischen den beiden Gruppen: Die Zellen ohne *IL6* prä-mRNA-Signale zeigten die maximale mittlere *IL6* mRNA-Expression nach 1h der IL-1-Behandlung (Mittelwert: 62). Zu späteren Zeitpunkten war die *IL6* mRNA-Expression wieder gesunken. In den Zellen mit prä-mRNA Signalen war die maximale mittlere *IL6* mRNA-Expression mit im Mittel 160 Signalen deutlich größer und wurde erst nach sechsständiger IL-1-Stimulation erreicht.

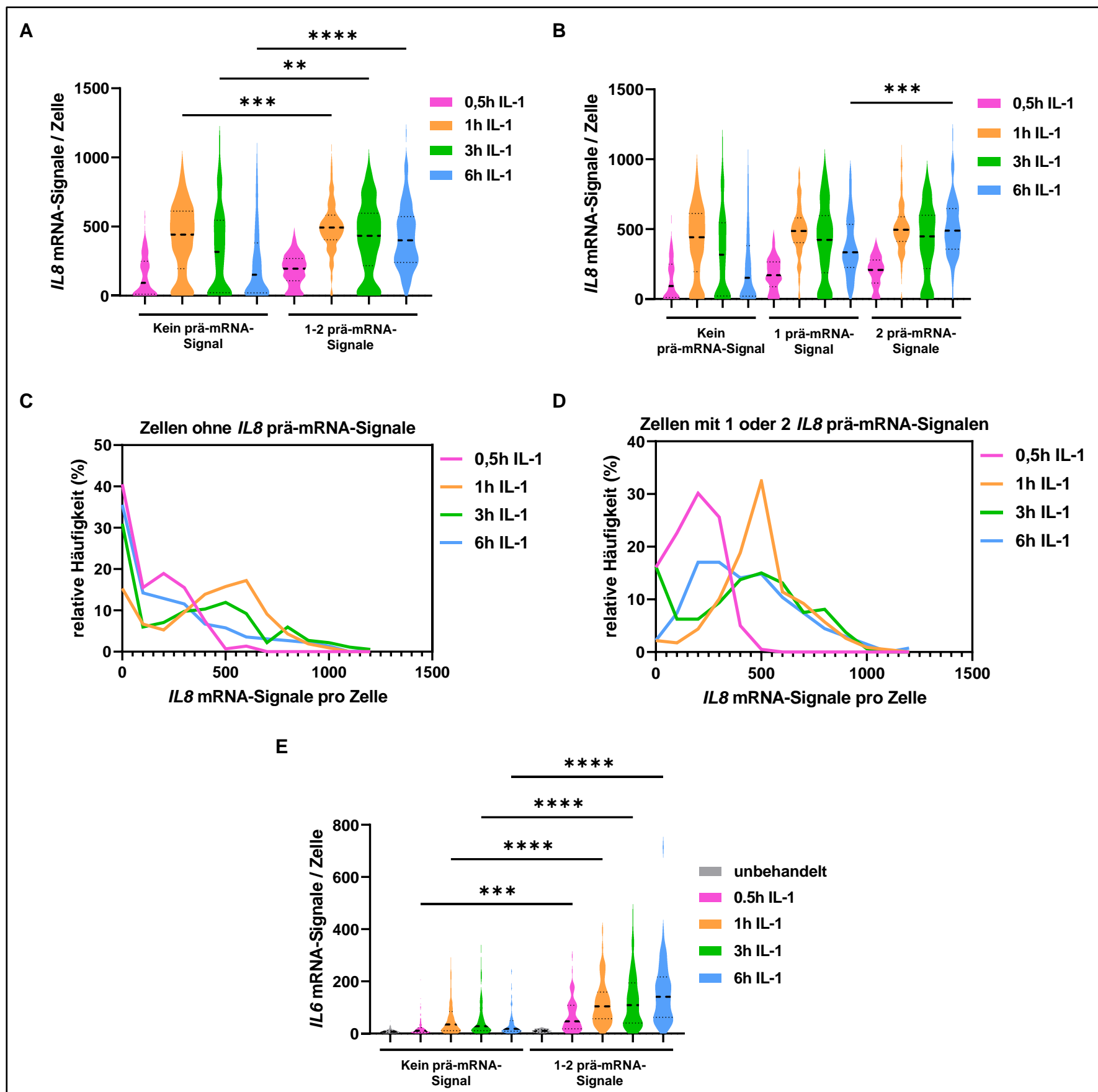


Abbildung 32: Quantifizierung der *IL8* und *IL6* mRNA-Menge in einzelnen Zellen in Abhängigkeit des Vorliegens aktiver Transkriptionsorte.

A: Aufteilung der Gesamtpopulation des Ansatzes mit *IL8* mRNA in zwei Subpopulationen: „mit 1 oder 2“ und „ohne“ *IL8* prä-mRNA-Signale. Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der *IL8* mRNA-Menge in den beiden Subpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation. Vergleich der mittleren *IL8* mRNA-Mengen mit und ohne *IL8* prä-mRNA-Signale derselben Zeitpunkte nach IL-1 mit dem Sidaks-Test mit dem Signifikanzniveau 0,05. Einschluss von mindestens 135 Zellen pro Bedingung. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. **B:** Aufteilung der Gesamtpopulation des Ansatzes mit *IL8* mRNA in drei Subpopulationen: „mit 1 *IL8* prä-mRNA-Signal“, „mit 2 *IL8* prä-mRNA-Signale“ und „ohne *IL8* prä-mRNA-Signale“. Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der *IL8* mRNA-Menge den Subpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation. Vergleich der mittleren *IL8* mRNA-Mengen mit und ohne *IL8* prä-mRNA-Signale derselben Zeitpunkte nach IL-1 mit dem Sidaks-Test mit dem Signifikanzniveau 0,05. Einschluss von mindestens 64 Zellen pro Bedingung. ***: $p < 0,001$. **C:** Relative Häufigkeitsverteilung (%) der *IL8* mRNA pro Zelle in der Subpopulation „ohne *IL8* prä-mRNA-Signal“. Einschluss von mindestens 135 Zellen pro Bedingung. **D:** Relative Häufigkeitsverteilung (%) der *IL8* mRNA pro Zelle in der Subpopulation „mit 1 oder 2 *IL8* prä-mRNA-Signale“. Einschluss von mindestens 135 Zellen pro Bedingung. **E:** Aufteilung der Gesamtpopulation des Ansatzes mit *IL6* mRNA in zwei Subpopulationen: „mit 1 oder 2“ und „ohne“ *IL6* prä-mRNA-Signale. Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der *IL6* mRNA-Menge in den beiden Subpopulationen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation. Vergleich der mittleren *IL6* mRNA-Mengen mit und ohne *IL6* prä-mRNA-Signale derselben Zeitpunkte nach IL-1 mit dem Sidaks-Test mit dem Signifikanzniveau 0,05. ****: $p < 0,0001$, ***: $p < 0,001$. Einschluss von 20 unbehandelten Zellen, bzw. mindestens 59 behandelten Zellen pro Bedingung. In Abbildung A-D erfolgte keine Analyse der unbehandelten Zellen, da in unbehandelten Zellen keine *IL8* prä-mRNA-Signale detektiert werden konnten, und somit kein Vergleich möglich war (vergleiche Kapitel 4.3.3.).

Zusammengefasst zeigte diese Analyse, dass die Anzahl der *IL8* und *IL6* mRNA-Transkripte damit zusammenhing, ob in der Zelle zeitgleich die entsprechenden Genorte aktiv waren, wobei die Anzahl der aktiven Gene eine eher untergeordnete Rolle zu spielen schien. Ferner gab die Untersuchung einen Hinweis darauf, dass auch nach sechsständiger Aktivierung des IL-1-Signalweges IL-1-Zielgene aktiv waren, deren Transkription in diesen Zellen zu großen Mengen an Transkripten führte.

4.5 Räumliche Regulation von aktiven Transkriptionsorten für die IL-1-Zielgene *IL8*, *CXCL2* und *IL6*

Die Verteilung der Chromosomen und einzelner Chromatinabschnitte innerhalb des Zellkernes nach der Zellteilung erfolgt innerhalb einer Zellpopulation probabilistisch (Dekker und Misteli 2015). Daher sind für die Beurteilung des Einflusses von IL-1 auf die Position einzelner Chromatinabschnitte besonders die für eine Bedingung häufigste und damit wahrscheinlichste Position von Bedeutung. Um dieser Eigenschaft gerecht zu werden, wurden die ermittelten radialen Positionen der aktiven Transkriptionsorte, sowie die Distanzen zwischen verschiedenen aktiven Transkriptionsorten, als Häufigkeitsverteilungen dargestellt. Je größer die untersuchte Stichprobe aus aktiven Transkriptionsorten war, umso mehr ähnelten die Häufigkeitsverteilungen der Log-Normalverteilung. Wenn dagegen nur die Betrachtung weniger aktiver Transkriptionsorte und intergenetischer Distanzen möglich war, wich die Häufigkeitsverteilung jedoch davon ab, wurde unübersichtlich und schwer beurteilbar. Wurde in diesen Fällen, um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, die Verteilung in das Modell der Log-Normalverteilung eingepasst, gingen allerdings Informationen verloren. Für die Erleichterung der Interpretation, werden im Ergebnisteil dieser Arbeit an die Log-Normalverteilung angepasste Häufigkeitsverteilungen gezeigt. Diese wurden jeweils unter Berücksichtigung der im Anhang ergänzten *ungefitteten* Häufigkeitsverteilungen interpretiert, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

4.5.1 Radiale Position von aktiven Transkriptionsorten

Aus bislang unveröffentlichten DNA-FISH Daten der Arbeitsgruppe Kracht ging hervor, dass sich die mittlere Distanz des *IL8*- und des *IL6*-DNA-Locus zum Kernzentrum in hTERT-RPE-1-Zellen nach einstündiger IL-1-Behandlung signifikant verringerte. Für verschiedene Gene wie den proneuronalen Regulator *Achaete-Scute-Homolog 1* (Williams et al. 2006), die *glial fibrillary acidic protein*-Gene (Takizawa et al. 2008), *INO1* und *GAL1* (Brickner und Walter 2004), das *major histocompatibility complex*-Gencluster und dem *epidermal differentiation complex* (Volpi et al. 2000; Williams et al. 2002) wurde eine Assoziation zwischen transkriptioneller Aktivierung und ihrer radialen Position gezeigt. Aktive Gene befinden sich demnach eher im Zentrum des Zellkerns bzw. bewegen sich in diese Richtung (Takizawa et al. 2008; Brickner und Walter 2004; Williams et al. 2006; Williams et al. 2002). Inwieweit dieses Phänomen auch für hochaktive Zytokin- bzw. Chemokingene zutrifft und einer IL-1-abhängigen Regulation unterliegt, ist unbekannt.

Es ergab sich daher die Fragestellung, ob ein solcher Zusammenhang auch für IL-1-induzierte Gene feststellbar ist. Daher wurden in dieser Arbeit die radialen Positionen der aktiven Genloci und der aktiven Transkriptionsstellen für *IL8*, *CXCL2* und *IL6* in unbehandelten hTERT-RPE-1 Zellen sowie nach 0,5h, 1h, 3h und 6h IL-1-Stimulation untersucht. Hierzu wurde die radiale Position der in der RNA-FISH (Abb. 26, 28) detektierten prä-mRNA-Signale beziehungsweise der Kollokationen aus prä-mRNA und mRNA desselben Genes durch die Icy Bioimaging Software gemessen und als Wert zwischen 0 und 1 angegeben, wobei 0 für das Kernzentrum und 1 für die Kernperipherie stand (siehe Kapitel 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6).

In Abbildung 33A sind der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der radialen Position der *IL8* prä-mRNA-Signale als *Violin Plot* dargestellt. In unbehandelten Zellen wurden keine *IL8* prä-mRNA-Signale detektiert, weswegen auch keine radialen Positionen ermittelt werden konnten (vergleiche Kapitel 4.3.2). Ein Vergleich der Genposition in unbehandelten Zellen mit der Position der aktiven Genloci in behandelten Zellen war daher nicht möglich. Nach halbstündiger und dreistündiger Stimulation mit IL-1 waren die prä-mRNA-Signale im Mittel bei 0,6 lokalisiert, nach 1h und 6h der IL-1-Stimulation bei 0,7. Damit waren die aktiven Genloci im Mittel nach 1h signifikant peripherer lokalisiert als nach 0,5h IL-1-Behandlung (Tukey-Test, $p < 0,05$). Zwischen den übrigen Inkubationsintervallen bestand kein signifikanter Unterschied. Die Abbildung 33B zeigt die, in die Log-Normalverteilung eingepassten, Häufigkeitsverteilungen genauer (vergleiche Abb. 59A). Die Häufigkeitsverteilungen waren für alle Bedingungen rechtsgipflig und zeigten die häufigste Ausprägung nach 0,5h, 1h und 6h IL-1-Behandlung zwischen 0,7 und 0,8 (30 %, 25 % und 26 % der Zellen), und nach dreistündiger IL-1-Stimulation bei zwischen 0,8 und 0,9 (26 % der Zellen). Zwischen 0,1 und 0,9 kamen alle Genpositionen vor, wobei zwischen 0 und 0,5 11 % der Genloci und zwischen 0,5 und 1 89 % der Genloci lokalisiert waren. Daraus kann geschlossen werden, dass die *IL8* prä-mRNA-Signale nach IL-1-Behandlung mit höherer Wahrscheinlichkeit in der peripheren Kernhälfte lokalisiert waren.

Bei der Betrachtung des Medians, der Quartile und des Mittelwerts der radialen Position der ATS für *IL8* nach IL-1-Stimulation über verschiedene Intervalle (Abb. 33C) fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen auf (Tukey-Test, $p > 0,05$). Allerdings erschienen die Kurven der, in die Log-Normalverteilung eingepassten, sowie der *ungefitteten* Häufigkeitsverteilung (Abb. 33D und Anhang Abb. 59B) nach halbstündiger IL-1-Stimulation im Verhältnis zu den anderen Zeitpunkten tendenziell nach links verschoben. Dies kann ein Hinweis, darauf sein, dass die ATS für *IL8* nach 0,5h IL-1-Behandlung mit einer geringfügig höheren Wahrscheinlichkeit näher beim Kernzentrum positioniert waren als zu anderen Zeitpunkten der Stimulation.

Sowohl die signifikant peripherere mittlere Position des aktiven *IL8* Genlocus nach einstündiger im Vergleich zu halbstündiger IL-1-Stimulation, als auch die tendenzielle Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der ATS für *IL8* nach halbstündiger Stimulation wiesen auf eine Bewegung der aktiven *IL8* Genloci innerhalb des Zellkerns nach IL-1-Stimulation hin. Aufgrund

der fehlenden Daten aus unbehandelten Zellen kann nicht gesagt werden, ob es sich dabei um eine Bewegung der Genloci nach 0,5h zum Kernzentrum hin, um ihre Bewegung vom Kernzentrum weg nach 1h und 3h IL-1-Stimulation oder um zufällige Unterschiede handelte. Für die zufälligen Unterschiede sprechen die häufigen Tests im Rahmen des Tukey-Tests und dass jeweils kein Unterschied für die 6h-Probe vorlag.

Der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der radialen Position der aktiven *CXCL2*-Genloci wird in Abbildung 33E als *Violin Plot* dargestellt. Auch für *CXCL2* wurden in unbehandelten Zellen nur 11 prä-mRNA-Signale detektiert, sodass die Position dieser Genloci nur vorsichtig auf die Grundgesamtheit bezogen werden kann. Der Mittelwert von 0,7, sowie die Lokalisation der mittleren 50% der aktiven *CXCL2*-Loci zwischen 0,55 und 0,80, zeigten, dass sich die aktiven *CXCL2*-Loci in den unbehandelten Zellen eher in der peripheren Kernhälfte befanden. Die mittlere radiale Position der unbehandelten Zellen und aller Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $p > 0,05$), wobei die Mittelwerte mit 0,6 minimal kleiner waren als in der unbehandelten Population. Die relative Häufigkeitsverteilung der radialen Position des *CXCL2*-Locus ist in Abbildung 33F sowie im Anhang Abbildung 59C. gezeigt. In beiden Darstellungsformen stellte sich die radiale Position nach IL-1-Behandlung symmetrisch dar und hatte nach halbstündiger IL-1-Stimulation die häufigste Position zwischen 0,7 und 0,8 sowie zu den anderen Zeitpunkten zwischen 0,6 und 0,7. In der, an die Log-Normalverteilung angepassten Darstellung erschienen die Häufigkeitsverteilungen nach 1h, 3h und 6h IL-1-Behandlung im Vergleich zu den Häufigkeitsverteilungen der unbehandelten Zellen und nach halbstündiger Behandlung geringfügig nach links verschoben. Diese Verschiebung der *CXCL2*-Genloci Richtung Zentrum zeigte sich in Abbildung 59C jedoch nicht.

Eine signifikante Änderung der mittleren Position des aktiven *CXCL2*-Gens nach einer Behandlung mit IL-1 oder in ihrem Zeitverlauf konnte nicht gezeigt werden. Die häufigste Position der *CXCL2*-Genloci nach halbstündiger IL-1-Stimulation war peripherer als für die anderen Zeitpunkte. Erschwert wurde die Auswertung auch für dieses Gen dadurch, dass in unbehandelten Zellen kaum aktive Genloci erfasst werden konnten.

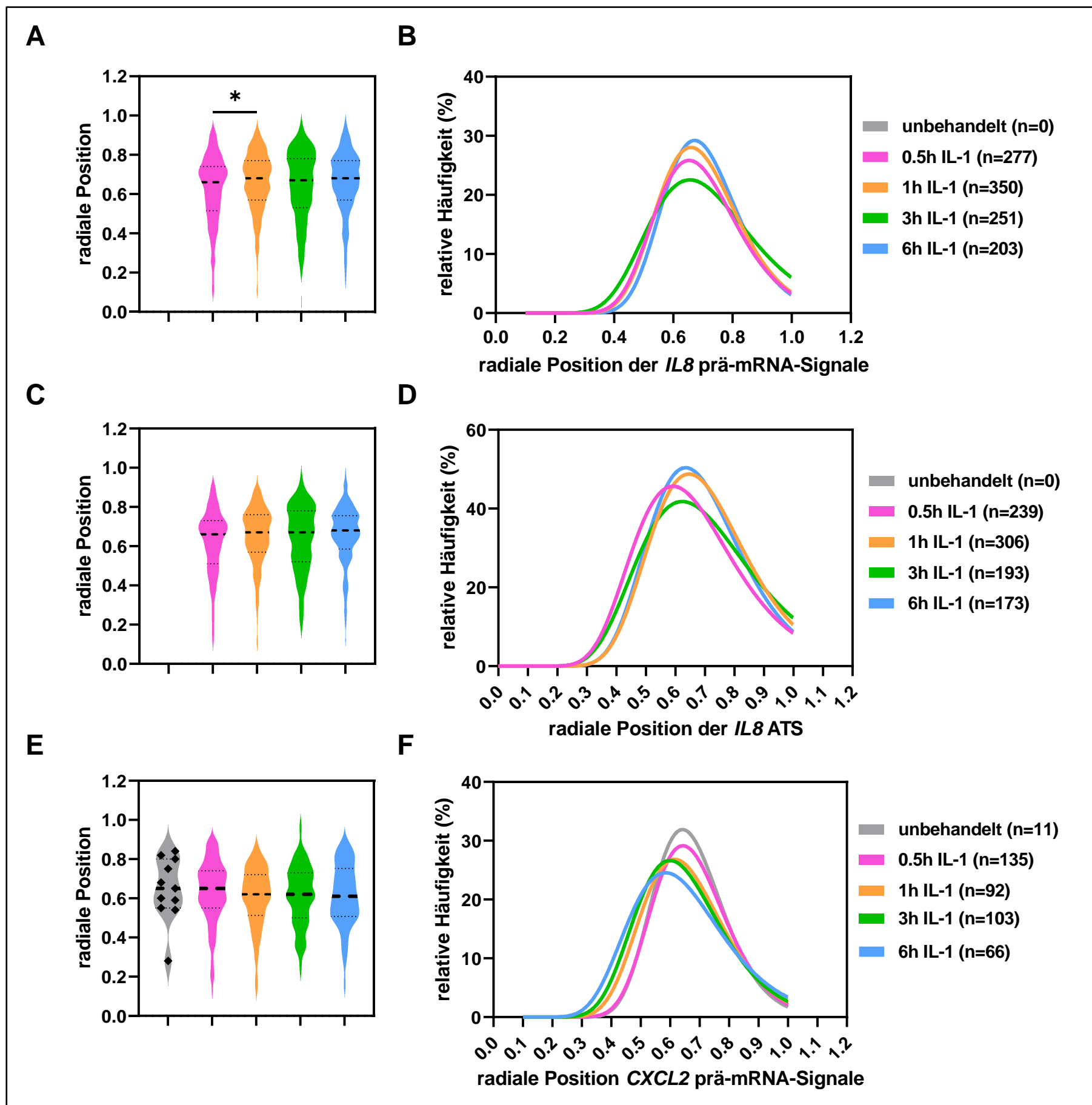


Abbildung 33: Untersuchung radialer Positionen von aktiven Genen und aktiven Transkriptionsstellen (ATS) auf Chromosom 4.

Angabe der radialen Position als dimensionslose Größe, dabei markiert 0 das Kernzentrum und 1 die Kernperipherie. **A:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der radialen Position der aktiven *IL8*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 203 gemessenen Distanzen nach IL-1-Stimulation. Statistischer Vergleich der Mittelwerte aller Populationen miteinander mithilfe des Tukey-Tests mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. *: $p < 0,05$. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der aktiven *IL8*-Genloci angepasst an die Log-Normalverteilung. Für die unangepasste Häufigkeitsverteilung siehe Anhang unter Abbildung 59A. **C:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der radialen Position der ATS für *IL8* (d.h. Kolokalisation eines *IL8* prä-mRNA-Signals mit einem Signal der korrespondierenden mRNA in der RNA-FISH) mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 173 gemessene Distanzen nach IL-1-Stimulation. **D:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der ATS für *IL8* angepasst an die Log-Normalverteilung. Für die unangepasste Häufigkeitsverteilung siehe Anhang unter Abbildung 59B. **E:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der radialen Position der aktiven *CXCL2*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 11 gemessene Distanzen, bei weniger als 15 Werten wurden alle Einzelwerte im *Violin Plot* markiert. **F:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der *CXCL2* prä-mRNA-Signale angepasst an die Log-Normalverteilung. Für die unangepasste Häufigkeitsverteilung siehe Anhang unter Abbildung 56 C.

In Abbildung 34A werden der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der radialen Position von *IL6* prä-mRNA-Signalen als *Violin Plot* gezeigt. In unbehandelten Zellen wurden insgesamt nur 33 *IL6* prä-mRNA-Signale detektiert, welche im Mittel bei 0,6 positioniert waren. Nach IL-1-Behandlung konnten deutlich mehr *IL6* prä-mRNA-Signale detektiert werden, deren Position für alle Zeitpunkte im Mittel ebenfalls bei 0,6 lag, womit sich die Positionen der verschiedenen Bedingungen nicht signifikant voneinander unterschieden (Tukey-Test, $p > 0,05$).

Die dazugehörigen Häufigkeitsverteilungen (Abb. 34B) stellten sich rechtsgipflig dar, weil in jeder Bedingung mehr als 60 % der aktiven Genloci in der peripheren Kernhälfte (zwischen 0,5 und 1) lagen, obwohl im Bereich zwischen 0 und 0,9 alle Genpositionen detektiert werden konnten. In der Verteilung der unbehandelten Zellen waren drei Subpopulationen zu erkennen: in 21 % der Zellen (7 Zellen) lagen die aktiven *IL6* Genloci zwischen 0,4 und 0,5, in 21 % der Zellen (7) zwischen 0,6 und 0,7 und in 24 % der Zellen zwischen 0,8 und 0,9. Aufgrund der geringen Anzahl der analysierten aktiven Genloci wurde angenommen, dass diese Subpopulationen zufällig entstanden waren und auf der geringen Stichprobengröße beruhten. Die Stichprobengröße war in den unbehandelten Zellen so klein, da ohne Stimulus nur eine geringe *IL6*-Transkriptionsaktivität vorlag (vergleiche Kapitel 4.3.2. und 4.3.3.). In unbehandelten Zellen, sowie nach 0,5h, 3h und 6h IL-1-Behandlung lagen am meisten Zellen zwischen 0,8 und 0,9, nach 1h war die häufigste Genposition zwischen 0,7 und 0,8. Dies zeigt sich im Histogramm als geringfügige Verschiebung der zur einstündigen IL-1-Behandlung gehörenden Verteilung nach links im Vergleich zu den Verteilungen der anderen Zeitpunkte und könnte ein Hinweis auf eine zentralere Lage der *IL6* Genloci nach einstündiger IL-1-Stimulation sein. Auffällig war für diesen Zeitpunkt weiterhin eine kleine Subpopulation aus 7,43 % der Zellen (9 Zellen) mit deutlich zentralerer Position bei 0,3 bis 0,4. Diese könnte aufgrund ihrer geringen Größe auch zufällig entstanden sein.

Der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der ATS für *IL6* sind in Abbildung 34C als *Violin Plot* visualisiert. In unbehandelten Zellen konnte nur eine ATS detektiert werden, sodass nur die Positionen der ATS für *IL6* in behandelten Zellen verglichen wurden. Im Mittel hatten diese nach allen Zeitintervallen der IL-1-Behandlung eine Position bei 0,6 und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $p > 0,05$). Die Häufigkeitsverteilung aller Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung (Abb. 34D) war sehr rechtsgipflig und die häufigste Lokalisation war jeweils zwischen 0,8 und 0,9. Zu jedem Zeitpunkt waren mehr als 75 % der ATS in der peripheren Kernhälfte zwischen 0,5 und 1 lokalisiert, obwohl nach 0,5h, 1h und 3h der IL-1-Stimulation alle radialen Positionen zwischen 0,2 und 1, nach 6h alle zwischen 0 und 1 vorkamen. Auch für die ATS fiel nach einstündiger Stimulation mit IL-1 eine kleine Subpopulation aus 8,89 % der Zellen (4 Zellen) mit deutlich zentralerer Position bei 0,3 bis 0,4 auf, die auch hier so klein war, dass sie zufällig entstanden sein könnte. Beim Vergleich der Häufigkeitsverteilungen nach verschiedenen Zeitpunkten konnte beobachtet werden, dass die Verteilung nach 0,5h am stärksten links lag und die nach 3h und 6h eher weiter rechts. Dies könnte ein Hinweis auf eine Verschiebung der aktiven *IL6*-Transkriptionsstellen nach 0,5h IL-1-Stimulation in Richtung Kernzentrum oder nach 3h und 6h in Richtung Peripherie sein.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sowohl die aktiven Genloci als auch die ATS für *IL6* häufiger in der peripheren Kernhälfte lokalisiert waren. Auch für dieses Gen konnte keine signifikante Veränderung der mittleren Genposition in mit IL-1 stimulierten Zellen und im Zeitverlauf nach der Stimulation festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Histogramme der Positionen der *IL6* prä-mRNA-Signale und der *IL6* ATS stellten sich die Genloci nach halb- und einstündiger IL-1-Behandlung, im Vergleich zu den Verteilungen nach 3h und 6h, geringfügig nach links verschoben dar, was ein Hinweis auf eine leichte Zentralisierung der *IL6* Genloci nach 0,5h und 1h sein könnte. Weitere Hinweise auf eine solche Bewegung der *IL6* Genloci war die, im Vergleich zu den anderen Bedingungen, wahrscheinlichste zentralere Position der *IL6* Genloci nach einstündiger Stimulation mit IL-1, sowie die Subpopulation, die bei 0,3 bis 0,4 deutlich zentraler positioniert war als der Rest der Zellen und die nur zu diesem Zeitpunkt zu beobachten war.

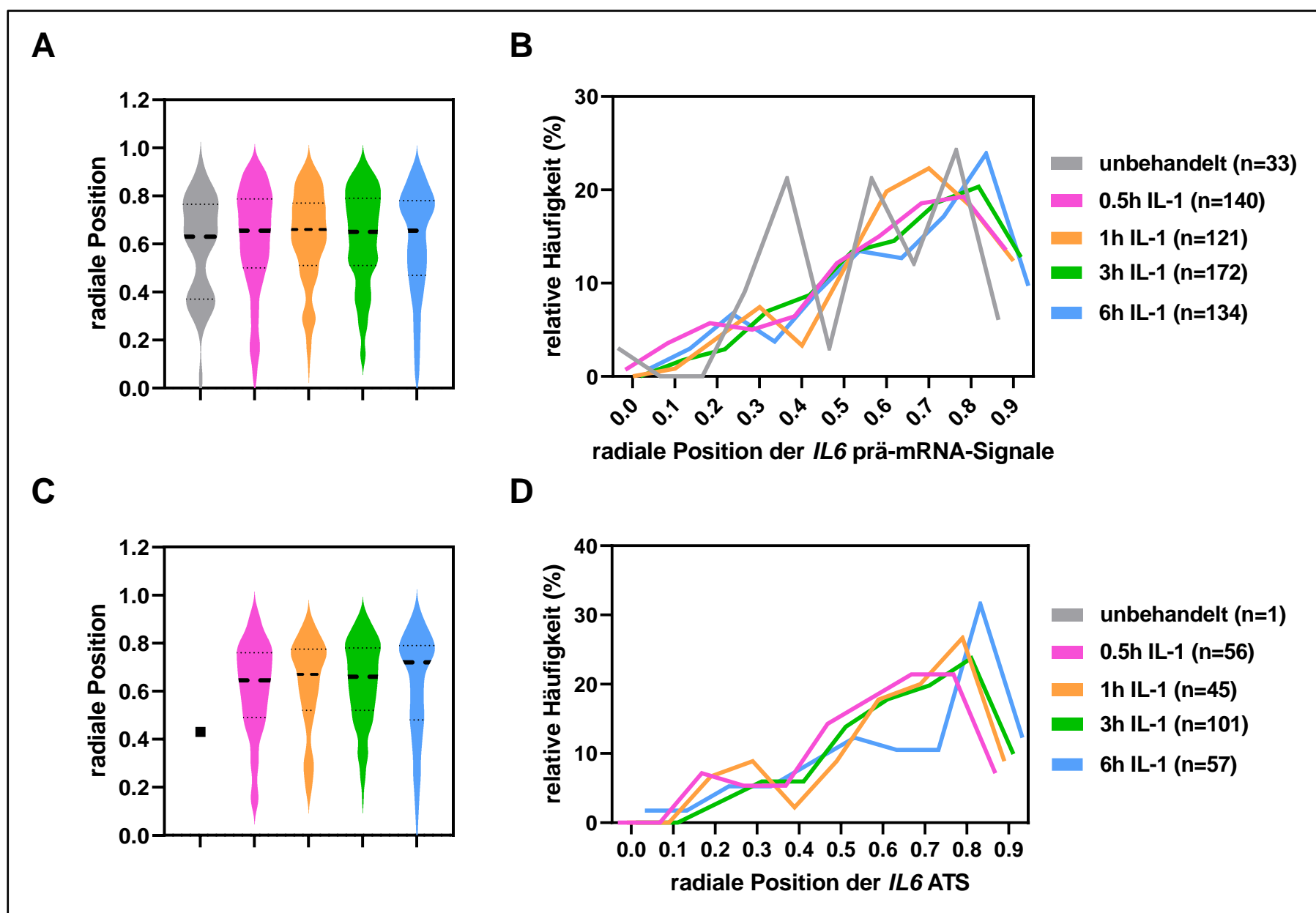


Abbildung 34: Radiale Position von aktiven Genen und ATS auf Chromosom 7.

A: Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der radialen Position der aktiven *IL6*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 33 gemessenen Distanzen. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der aktiven *IL6*-Genloci. **C:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der radialen Position der ATS für *IL6* (d.h. Kolokalisation eines *IL6* prä-mRNA-Signals mit einem Signal der korrespondierenden mRNA in der RNA-FISH) mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 45 gemessenen Distanzen nach IL-1-Stimulation. In der unbehandelten Probe konnte nur 1 Distanz gemessen werden, die als Einzelwert eingetragen wurde. **D:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der ATS für *IL6*.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aktive *IL8*-, *CXCL2*- und *IL6*-Genloci häufiger in der peripheren Kernhälfte lokalisiert waren. Damit waren alle drei durch IL-1 induzierbaren Gene in einem ähnlichen Abschnitt des Zellkerns positioniert. Der Vergleich der Genpositionen in unbehandelten Zellen mit denen in Zellen nach IL-1-Behandlung war aufgrund der geringen Zahl der aktiven Genorte in unstimulierten Zellen nicht möglich. Es ist daher denkbar, dass die Genloci in unbehandelten Zellen und im inaktiven Zustand weiter peripher lokalisiert sind, eine putative Änderung der Position der Genloci im Rahmen ihrer Aktivierung in den ersten 30 Minuten stattfindet und in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden kann. Signifikante Unterschiede ließen sich nur zwischen der Genposition des *IL8*-Locus in 0,5h und 1h mit IL-1 behandelten Zellen dokumentieren. Allerdings gab es Hinweise auf eine Bewegung der aktiven *IL8*-Genloci nach halbstündiger IL-1 Stimulation zum Kernzentrum hin bzw. ihre Bewegung vom Kernzentrum weg nach 1h und 3h IL-1 Stimulation. Weiter deuteten die Häufigkeitsverteilungen eine, im Vergleich mit den anderen Bedingungen, peripherere Lokalisation der aktiven *CXCL2*-Genloci nach 0,5h IL-1-Behandlung an. Für die aktiven Genloci von *IL6* ergaben die Häufigkeitsverteilungen verschiedene Hinweise auf eine Bewegung dieser nach halb- und einstündiger Behandlung mit IL-1 in Richtung Zentrum.

4.5.2 Interallelische Distanzen zwischen Transkriptionsorten in Zellen mit biallelischer Genexpression

Räumliche Nähe ist einer der wichtigsten Voraussetzungen für die Interaktion verschiedener Chromatinabschnitte miteinander (Finn et al. 2019). Weiterhin wurde die gleichzeitige Transkription mehrerer Gene in sogenannten Transkriptionsfabriken gezeigt (Maass et al. 2019; Rieder et al. 2012). In diesen Transkriptionsfabriken konzentrieren sich verschiedene koregulierte Gene mit mehreren Typ 2 Polymerasen, Transkriptionsfaktoren und Nukleotiden auf engstem Raum, sodass die für die Transkription benötigten Makromoleküle in hoher Konzentration und Aktivität vorliegen. Es wird vermutet, dass auf diese Weise die Effizienz und Synchronisation der Transkription gesteigert wird (Rieder et al. 2012). In diploiden Zellen, wie den hTERT-RPE1-Zellen, liegen zwei Allele eines Gens vor die, wie in Kapitel 4.3.2 gezeigt wurde, auch gleichzeitig, also biallelisch, exprimiert werden können.

Mit der Fragestellung, ob die Induktion der Transkription der Gene *IL-8*, *CXCL-2* und *IL-6* durch IL-1-Behandlung zu einer Annäherung beider Allele der jeweiligen Gene führt, was ein Hinweis auf eine Koregulation oder die gemeinsame Transkription in einer Transkriptionsfabrik sein könnte, wurde als Nächstes untersucht, ob und wie sich die Distanzen zwischen den Genloci nach IL-1-Stimulation verändern. Mittels DNA-FISH-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Distanz zwischen beiden Allelen von *IL8* und *IL6*-DNA-Loci nach einstündiger IL-1-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant verringerte (unveröffentlichte Daten AG Kracht). Für die Untersuchung des Einflusses der transkriptionellen Aktivierung der Gene auf diese Beobachtung sollte im Rahmen dieser Arbeit die Distanz zwischen zwei Allelen der aktiven Genloci für *IL8*, *CXCL2* und *IL6* untersucht werden. Als Marker für die aktiven Genloci wurden, wie in den vorhergehenden Analysen die jeweiligen prä-mRNA-Signale aus der RNA-FISH (Abb. 26 und 28) genutzt und deren Distanzen zueinander mit der *Icy Bioimaging Software* gemessen (siehe Kapitel 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6). Für den Vergleich von Distanzen, die in Zellkernen unterschiedlicher Größe gemessen worden waren, wurden die Distanzen als prozentualer Anteil der Kernfläche angegeben. In Abbildung 33A sind der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen zwei *IL8* prä-mRNA-Signalen relativ zur gesamten Kernfläche als *Violin Plot* dargestellt. In unbehandelten Zellen konnten keine interalleischen Distanzen erfasst werden, da die Gene nicht nennenswert exprimiert wurden. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation waren beide *IL8*-Allele im Mittel 6,19 % der Zellkernfläche voneinander entfernt. Nach 1h waren es 6,58 % der Kernfläche, nach 3h 6,61 % und nach 6h 5,77 %. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die Allele im Zeitverlauf der IL-1-Stimulation tendenziell voneinander entfernten und nach 6h wieder näher beieinander lokalisiert waren. Jedoch waren die Unterschiede extrem klein und nicht signifikant (Tukey-Test, $p > 0,05$).

In der Häufigkeitsverteilung der relativen Distanz zwischen den *IL8*-Allelen (Abb. 35B) stellte sich die Verteilung annähernd log-normalverteilt dar und erstreckte sich auf Distanzen zwischen 1 und 19 % der Kernflächen. Die meisten Distanzen (31 bis 34 % der Distanzen) waren zu jedem Zeitpunkt nach IL-1-Stimulation zwischen 5 und 7 % der Kernfläche groß. Beim Vergleich der Verteilungen der verschiedenen Zeitpunkte fiel auf, dass die Verteilung nach 0,5h im Verhältnis zu den anderen Zeitpunkten nach links verschoben war. Dies sprach ebenfalls für eine Entfernung der aktiven *IL8*-Genloci voneinander nach 1h, 3h und 6h IL-1-Stimulation oder eine Annäherung der *IL8*-Genloci nach 0,5h Stimulation aneinander.

In Abbildung 35C werden der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen beiden *CXCL2*-Genloci gezeigt. Abbildung 35D veranschaulicht die Häufigkeitsverteilung der interalleischen Distanzen im Detail. In erster Linie ist zu beachten, dass nur in sehr wenigen Zellen *CXCL2* biallelisch exprimiert wurde (vergleiche Kapitel 4.3.2), sodass für fast alle Bedingungen nur unter 10 interalleische Distanzen gemessen werden konnten. In unbehandelten Zellen war es nicht möglich interalleische Distanzen zu ermitteln, nach 0,5h IL-1-Stimulation waren *CXCL2*-Genloci im Mittel 3,22 % der Kernfläche voneinander entfernt. Nach 1h waren es 5,39 % der Kernfläche, nach 3h 2,87 % der Kernfläche und nach 6h 2,96 %. Wenngleich die Distanz zwischen zwei *CXCL2*-Loci nach einstündiger IL-1-Behandlung im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten stark zuzunehmen schien, war der Unterschied nicht signifikant (Tukey-Test, $p > 0,05$) und am ehesten die Folge der kleinen Stichprobe. In der Häufigkeitsverteilung (Abb. 35D) zeigt sich, dass verschiedene relative Distanzen zwischen 1 und 10 % der Kernfläche erfasst wurden, viele der Distanzen jedoch nur ein oder zweimal auftraten. Im Ganzen kann anhand dieser Daten keine valide Aussage über die Distanzen zwischen *CXCL2*-Allelen nach IL-1-Stimulation getroffen werden. Interessant war jedoch die Größenordnung der Distanzen, die teilweise deutlich kleiner war als die Distanzen zwischen aktiven *IL8*-Genloci.

In Abbildung 35E werden der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen zwei aktiven *IL6*-Genloci als *Violin Plot* dargestellt. Auch für *IL6* gab es selten zwei aktive Genloci in einer Zelle, sodass für alle Zeitpunkte unter 40 Distanzen gemessen werden konnten. In unbehandelten Zellen konnten nur zwei Distanzen gemessen werden, die 3,13 und 7,64 % der Kernfläche betrug. Nach halbstündiger Stimulation mit IL-1 war die mittlere interalleische Distanz 6,01 % der Kernfläche. Ähnlich groß war die mittlere Distanz nach 3h und 6h der IL-1-Behandlung mit 6,27 % und 5,49 % von der Kernfläche. Deutlich aber ebenfalls nicht signifikant geringer war die mittlere Distanz zwischen aktiven *IL6*-Genloci nach einstündiger IL-1-Behandlung mit 4,80 % von der Kernfläche (Tukey-Test, $p > 0,05$). Der Unterschied könnte ein Hinweis auf eine Bewegung der beiden *IL6*-Allele zueinander hin nach einstündiger IL-1-Behandlung darstellen, aber auch zufällig durch die geringe Stichprobe aufgetreten sein. Auch für dieses Gen wird die Häufigkeitsverteilung, die ebenfalls keiner Log-Normalverteilung entsprach, in Abbildung 35F gezeigt. Nach halbstündiger IL-1-Behandlung lagen mit 30 % der Gesamtpopulation die meisten Distanzen zwischen 9 und 10 % der Kernfläche, nach 1h IL-1-Behandlung zwischen 4 und 5 %, nach 3h und 6h zwischen 5 und 6 % der Kernfläche. Dieses Muster könnte auf eine Bewegung der aktiven *IL6*-Genloci nach 1h aufeinander zu und wieder voneinander weg hinweisen oder aus der geringen Stichprobe resultieren.

Die Messung der Distanzen zwischen zwei *IL8*-ATS und *IL6*-ATS ergab, unter anderem infolge weniger messbarer Distanzen keine weiteren Erkenntnisse. Daher sind die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

Insgesamt konnten für keinen Genlocus der Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* nach IL-1-Behandlung signifikante Änderungen der Distanz beider aktiven Allele zueinander beobachtet werden. Tendenziell gab es Hinweise, dass es sich die beiden *IL8*-Allele nach 1h und 3h IL-1-Stimulation voneinander entfernten um sich nach 6h wieder aufeinander zu bewegt zu haben. Ferner wiesen die Häufigkeitsverteilung sowie die Mittelwerte darauf hin, dass sich die beiden *IL6*-Allele nach einstündiger IL-1-Behandlung aneinander annäherten.

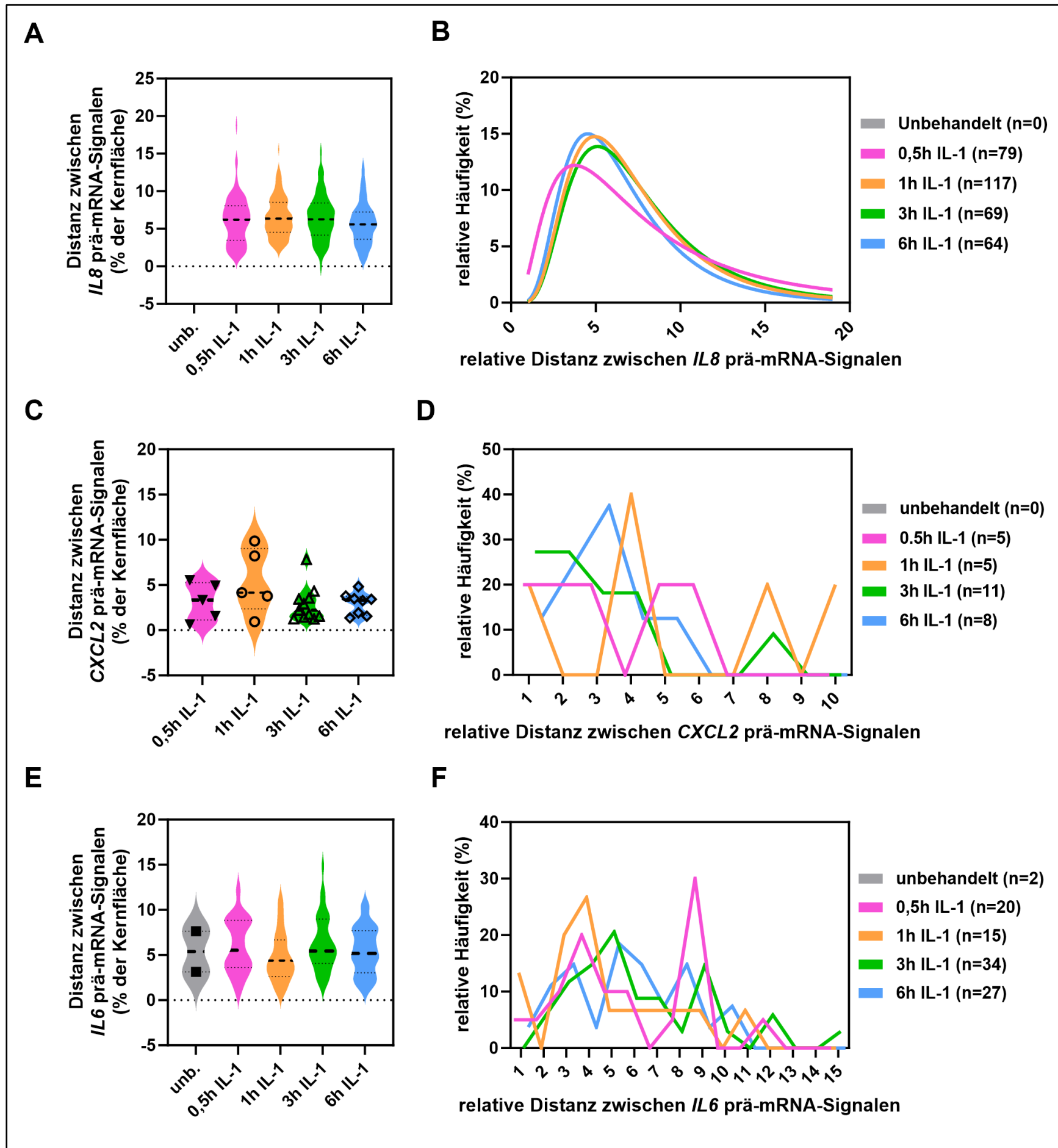


Abbildung 35: Untersuchung interalleler Distanzen in Zellen mit biallelischer Genexpression.

A: Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen zwei aktiven *IL8*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) als prozentualer Anteil der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 117 gemessenen Distanzen in mit IL-1 behandelten Zellen. **B:** In die Log-Normalverteilung angepasste relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen zwei aktiven *IL8*-Genloci (% der Kernfläche). Für die nicht angepasste Häufigkeitsverteilung siehe Abbildung 60A im Anhang. **C** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen zwei aktiven *CXCL2*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) als prozentualer Anteil der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 5 gemessenen Distanzen in mit IL-1 behandelten Zellen. Alle Einzelwerte wurden eingetragen. **D:** Relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen zwei aktiven *CXCL2*-Genloci (% der Kernfläche). **E** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen zwei aktiven *IL6*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) als prozentualer Anteil der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 15 gemessenen Distanzen in mit IL-1 behandelten Zellen. In unbehandelten Zellen konnten nur zwei Distanzen gemessen werden, die als Einzelwerte eingetragen wurden. **F:** Relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen zwei aktiven *IL6*-Genloci (% der Kernfläche).

4.5.3 Interchromosomale Distanzen zwischen Transkriptionsorten auf den Chromosomen 7 und 4

Unter interchromosomalen Interaktionen versteht man die Interaktion von Genloci, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, wie zum Beispiel putative Interaktionen zwischen dem *IL6*-Gen auf Chromosom 7 und dem *CXCL2*- oder *IL8* Gen auf Chromosom 4 (Maass et al. 2019). Im Zusammenhang mit interchromosomalen Interaktionen kann es zu der Bildung von Transkriptionsfabriken kommen (Maass et al. 2019). Ein Hinweis auf solche Interaktionen sind geringe Distanzen zwischen verschiedenen Genen, da diese die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der Gene erhöhen (Finn et al. 2019; Finn und Misteli 2019). Mit der Frage nach putativen Interaktionen zwischen *IL6* und *IL8* Genloci wurden im Vorfeld Distanzen zwischen diesen Genen mittels DNA-FISH-Experimenten untersucht, wobei eine signifikante Verringerung der Distanz zwischen *IL6*- und *IL8*-DNA-Loci nach einstündiger IL-1-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt wurde (unveröffentlichte Daten AG Kracht).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob dies auch für die aktiven Genloci beobachtet werden kann. Dafür wurden in oben beschriebenen RNA-FISH-Experimenten (Abb. 26 und 28) die Distanzen zwischen *IL8*- und *IL6*-prä-mRNA-Signalen bzw. zwischen *CXCL2*- und *IL6*-Signalen mit der Icy Bioimaging Software erfasst und, um die Distanzen, die in unterschiedlich großen Zellkernen gemessen wurden, miteinander zu vergleichen, als prozentuale Anteile der Kernfläche angegeben.

Abbildung 36A zeigt den Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci. In unbehandelten Zellen konnten infolge der geringen *IL8*-Genaktivität keine Distanzen gemessen werden (vergleiche Kapitel 4.3.2). Nach halbstündiger Stimulation mit IL-1 waren die beiden Genloci im Mittel 5,88 % der Kernfläche voneinander entfernt, nach 1h 5,54 %, nach 3h 5,68 % und nach 6h 4,95 %, wobei sich die mittleren Distanzen nicht signifikant voneinander unterschieden (Tukey-Test, $p > 0,05$). Die in Abbildung 36B gezeigten Häufigkeitsverteilungen der interchromosomalen Distanzen zwischen aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci, wurden an die Log-Normalverteilung angepasst, weil dieses Modell die tatsächliche Verteilung (Abb. 60B (Anhang)) gut wiedergab. Die Distanzen waren für alle Zeitpunkte nach der Stimulation rechtsgipflig verteilt und zwischen 0 und 19 % der Kernfläche groß. Die häufigste Distanz betrug nach halbstündiger Stimulation zwischen 6 und 7 %, nach 1h waren mit je 10 % der Zellen Distanzen zwischen 2 und 3%, 4 und 5 %, 6 und 7 % und 7 und 8% am häufigsten, nach 3h Distanzen zwischen 4 und 5 % und nach 6h Distanzen zwischen 5 und 6 % der Kernfläche. Dass die Distanzen nach 1h IL-1-Stimulation so stark in Richtung geringer Distanzen streuen, kann ein Hinweis auf eine Bewegung der zwei Genloci oder der geringen erreichten Stichprobengröße geschuldet sein.

In Abbildung 36C werden der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *CXCL2*- und *IL6*-Genloci gezeigt. In unbehandelten Zellen konnten, infolge der geringen Expression beider Gene, keine Distanzen gemessen werden. Nach halbstündiger Behandlung mit IL-1 waren aktive *CXCL2*- und *IL6*-Genloci im Mittel 5,90 % der Kernfläche voneinander entfernt. Die Distanz nahm im Mittel nach 1h und 3h IL-1-Stimulation auf 5,16 bzw. 5,27 % und stieg nach 6h wieder auf 5,5 % wenngleich diese Unterschiede nicht statistisch signifikant waren (Tukey-Test, $p > 0,05$). Die Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *CXCL2* und *IL6* Loci ist in Abbildung 36D dargestellt. Auch wenn sich die Distanzen im Durchschnitt kaum voneinander unterschieden, zeigte die Häufigkeitsverteilung, dass die häufigste Ausprägung und damit die Distanzen, die am wahrscheinlichsten auftraten, variierten. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation waren aktive *CXCL2*- und *IL6*-Genloci am häufigsten 5 bis 6 % der Kernfläche voneinander entfernt, während nach 1h die meisten aktiven Genloci 6 bis 7 % und nach 6h 4 bis 5 % Abstand hatten. Nach 3h war die Häufigkeitsverteilung am breitesten und schloss Werte zwischen 0 und 15 % der Kernfläche ein. Dies kann entweder zufällig verursacht worden sein, da die Stichprobe insbesondere für 1h nicht besonders groß war, oder auf eine Entfernung der Genorte nach 1h IL-1-Stimulation hindeuten.

Die Messung der Distanzen zwischen *IL6* prä-mRNA-Signalen und *IL8*-ATS und zwischen *CXCL2*-prä-mRNA-Signalen und *IL6*-ATS ergab, unter anderem infolge weniger messbarer Distanzen keine weiteren Erkenntnisse. Daher sind die Ergebnisse hier nicht dargestellt.

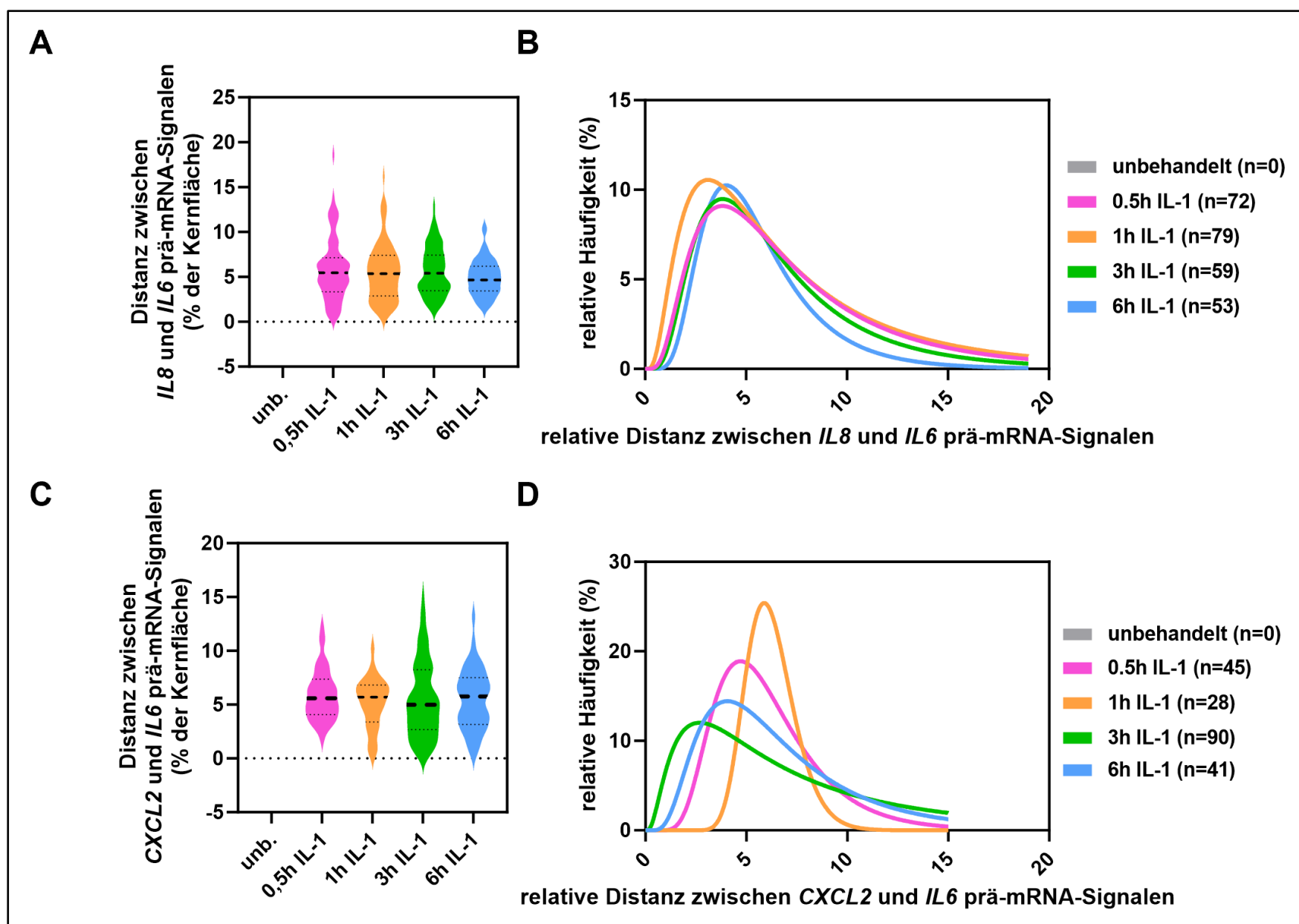


Abbildung 36: Untersuchung interchromosomaler Distanzen zwischen aktiven Genloci auf den Chromosomen 4 und 7.

A: Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) als prozentualer Anteil der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 53 gemessenen Distanzen in mit IL-1 behandelten Zellen. **B:** In die Log-Normalverteilung angepasste relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci (% der Kernfläche). Für die nicht angepasste Häufigkeitsverteilung siehe Abbildung 60B im Anhang **C:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen aktiven *CXCL2*- und *IL6*-Genloci (prä-mRNA-Signale in der RNA-FISH) als prozentualer Anteil der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mindestens 53 gemessenen Distanzen in mit IL-1 behandelten Zellen. **D:** In die Log-Normalverteilung angepasste relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *CXCL2*- und *IL6*-Genloci (% der Kernfläche). Für die nicht angepasste Häufigkeitsverteilung siehe Abbildung 60C im Anhang

Zusammenfassend konnte auch für die interchromosomalen Distanzen zwischen den auf Chromosom 4 lokalisierten Genen *IL8* und *CXCL2* und dem auf Chromosom 7 lokalisierten Gen für *IL6* keine signifikante Veränderung zu verschiedenen Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation gefunden werden. Eine tendenzielle Verringerung der Distanz zwischen den aktiven Genloci für *CXCL2* und *IL6* nach dreistündiger IL-1-Behandlung ist fraglich.

4.6 Phänotyp von Zelle und Zellkern im Zusammenhang mit der Reaktion der einzelnen Zellen auf IL-1 α

In Kapitel 4.3.3 wurde beschrieben, dass hTERT-RPE-1-Zellen inhomogen auf den IL-1-Stimulus reagierten und die Gesamtpopulation in Subpopulationen mit geringer und höherer Transkriptionsaktivität zerfiel. In 2D IF-Experimenten (Kapitel 4.2) konnte allerdings keine Veränderung der mittleren Kerngröße nach IL-1-Stimulation beobachtet werden. Aus diesen beiden Beobachtungen entstand die Fragestellung, ob und wie die unterschiedliche Transkriptionsaktivität der Zellen für *IL8* und *IL6* im Zusammenhang mit der Kerngröße oder Zellgröße in einzelnen Subpopulationen oder Zellen stehen könnte.

4.6.1 Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit dem Ausmaß der p65 Translokation in den Zellkern

Es konnte gezeigt werden, dass die Translokation von p65 und seine Bindung an die DNA mit Änderungen der Chromatinorganisation einhergehen, wobei unklar ist, durch welchen Mechanismus diese Änderungen vermittelt werden (Diermeier et al. 2014; Weiterer et al. 2020). Weiterhin ist bekannt, dass die Chromatinorganisation und die Kerngröße eng miteinander verbunden sind (Mohanta et al. 2021). Daher sollte an dieser Stelle untersucht werden, ob die Stärke der p65-Translokation in den Zellkern mit der Kernfläche zusammenhängt. Dafür wurde die, in 2D Immunfluoreszenz-Experimenten (Abb. 20) anhand der Markierung der Proteine der Kernlamina gemessene, Kernfläche mit der Gesamtfluoreszenzintensität des Cy3-Sekundärantikörpers, der p65 in dem entsprechenden Zellkern markierte,

korreliert. Für die Quantifizierung eines möglichen Zusammenhangs wurde der Korrelationskoeffizient r , sowie sein Konfidenzintervall berechnet und der t-Test für den Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Die *Scatter Plots* dieser Korrelationen zeigten in unbehandelten Zellen und nach 0,5h bis 3h IL-Stimulation eine schräg im Koordinatensystem liegende, nach rechts oben ansteigende Punktwolke, was für alle Bedingungen auf einen gleichsinnigen Zusammenhang von Kernfläche und absoluter p65-Menge im Zellkern hindeutete (Abb. 37A). In Abbildung 37B sind die Korrelationskoeffizienten aller Bedingungen vergleichend dargestellt. In unbehandelten Zellen und nach 0,5h, 3h und 6h IL-1 Stimulation konnte aufgrund der signifikanten Korrelationskoeffizienten von einem mittelstarken bzw. starken Zusammenhang der beiden Parameter ausgegangen werden. Nach einstündiger IL-1 Stimulation zeigte der Korrelationskoeffizient nur noch einen schwachen Zusammenhang mit geringerer Signifikanz an. Außerdem war hier 0,08 im Konfidenzintervall eingeschlossen, sodass r nicht mit 95 % Sicherheit über 0,1 lag. Der Zusammenhang war somit in unbehandelten Zellen am größten, wurde nach 30-minütiger und einstündiger IL-1 Behandlung zunächst kleiner und nahm im weiteren Verlauf der IL-1 Behandlung wieder zu. Bei einem IL-1-spezifischen Zusammenhang wäre nach einstündiger IL-1-Behandlung der stärkste Zusammenhang zu erwarten gewesen, weil zu diesem Zeitpunkt die im Mittel größte Menge p65 im Zellkern lokalisiert war. Der stärkste Zusammenhang zeigte sich jedoch in unbehandelten Zellen, in deren Zellkernen am wenigsten p65 zu detektieren war (vergleiche Kapitel 4.3.1). Daher erfolgten Subgruppenanalysen jeweils der Zellen, die 25 % der kleinsten und 25 % der größten Zellkerne enthielten (Abb. 37C: Quartil 1 der Kernflächen; Abb. 37D: Quartil 4 der Kernflächen). In diesen Subgruppen zeigte sich der einzige signifikante Zusammenhang, beim welchem die Konfidenzintervalle von r sicher über 0,3 lagen, in der unbehandelten Population der größeren Zellkerne. Aus diesem Grunde ist es wahrscheinlich, dass der Zusammenhang nicht spezifisch durch die IL-1-Behandlung induziert wurde. Stattdessen besteht die Möglichkeit, der Zusammenhang aus Kernfläche und Höhe der Gesamtintensität der Cy3-Fluoreszenz des p65-markierenden Sekundärantikörpers artifiziell dadurch entstand, dass es sich bei der Gesamtintensität um die addierte Intensität über der gesamten Kernfläche handelte, die bei größeren Flächen an sich höher zu erwarten wäre als bei kleineren.

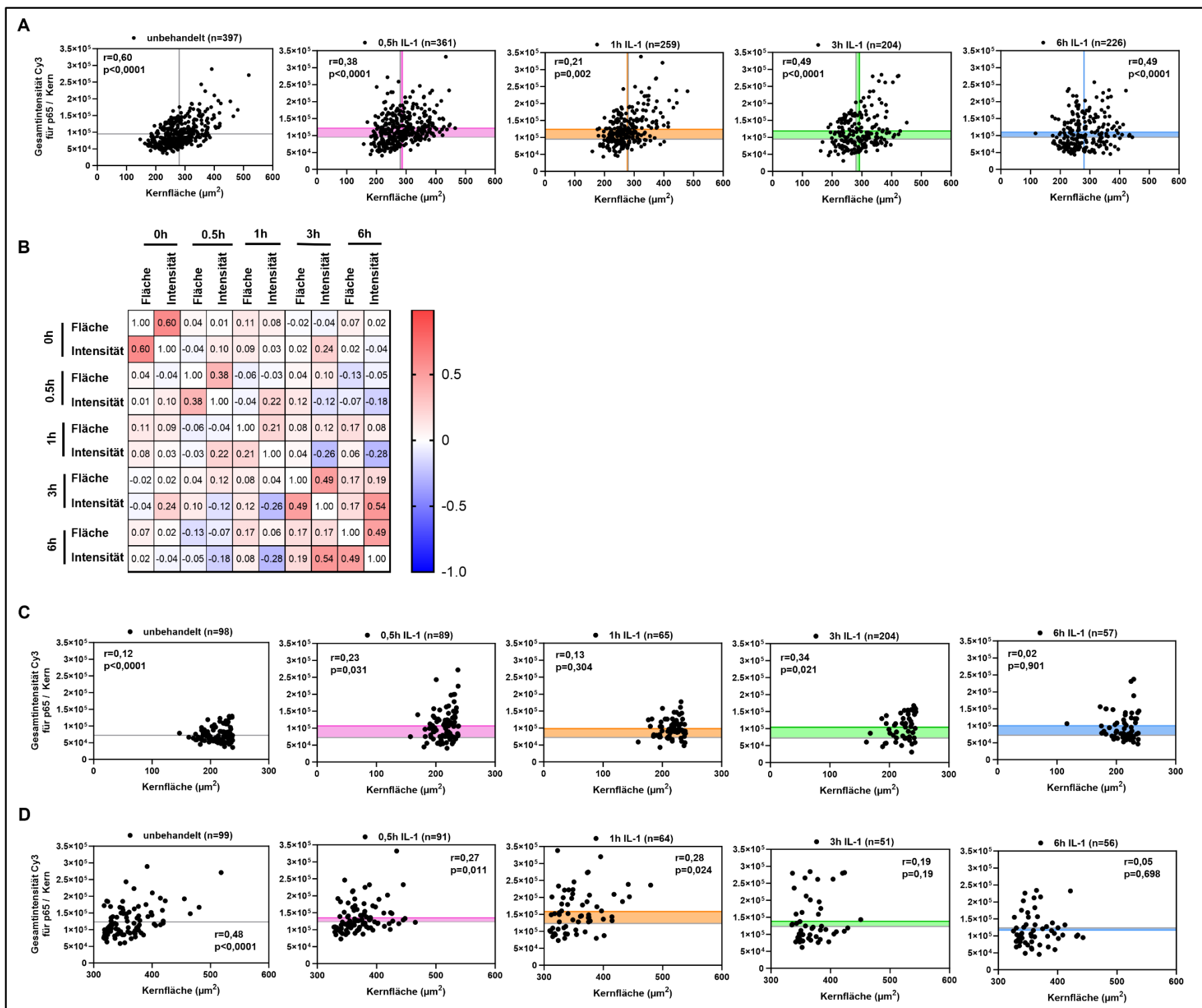


Abbildung 37: Untersuchung des Zusammenhangs der Stärke der p65 Translokation mit der Kernfläche nach IL-1 Stimulation

A: Darstellung der Korrelation der Gesamintensität der Cy3-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers der p65 Immunfluoreszenzanalysen pro Zellkern mit der Kernfläche in *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.}))= 0,52 - 0,67$, $CI(r(0,5h))=0,27 - 0,48$, $CI(r(1h))= 0,08 - 0,34$, $CI(r(3h))= 0,36 - 0,61$, $CI(r(6h))= 0,37 - 0,60$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha =0,05$. Farbliche Markierung des Mittelwertes der Kernflächen und der Gesamintensität sowie der Quartile 2 und 3. **B:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen, die für die Korrelation der Gesamintensität der Cy3-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers der p65 markierte pro Zellkern mit der Kernfläche berechnet wurden, in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. **C:** Subgruppenanalyse der Gruppe der 25 % der Zellen mit der kleinsten (Quartil 1) Kernflächen bezüglich der Korrelation der Gesamintensität der Cy3-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers der p65 Immunfluoreszenzanalysen pro Zellkern mit der Kernfläche. Darstellung in Form von *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.}))= - 0,08 - 0,31$, $CI(r(0,5h))= 0,02 - 0,42$, $CI(r(1h))= -0,12 - 0,36$, $CI(r(3h))= -0,01 - 0,52$, $CI(r(6h))= -0,25 - 0,28$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha =0,05$. Farbliche Markierung des Mittelwertes der Gesamintensität sowie der Quartile 2 und 3. **D:** Subgruppenanalyse der Gruppe der 25 % der Zellen mit der größten (Quartil 4) Kernflächen bezüglich der Korrelation der Gesamintensität der Cy3-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers der p65 Immunfluoreszenzanalysen pro Zellkern mit der Kernfläche. Darstellung in Form von *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 202 Zellen pro Bedingung. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.}))= 0,31 - 0,62$, $CI(r(0,5h))=0,06 - 0,45$, $CI(r(1h))= 0,04 - 0,50$, $CI(r(3h))= -0,09 - 0,44$, $CI(r(6h))= -0,21 - 0,31$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha =0,05$. Farbliche Markierung des Mittelwertes der Gesamintensität sowie der Quartile 2 und 3.

4.6.2 Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Transkriptionsaktivität der Zelle

Für die Darstellung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen der Kern- bzw. Zellgröße mit der Aktivität der Transkription von IL-1-Zielgenen wurden die in der RNA-FISH (Abb. 24 und 26) erhobenen Daten genutzt, um die, über die Hoechst-Färbung gemessene, Kernfläche mit der *IL8* bzw. *IL6* mRNA-Menge zu korrelieren. Weiterhin wurde der Korrelationskoeffizient r berechnet und ein t-Test für den Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Eine Regression wurde nicht berechnet, da nicht ausreichend Informationen vorlagen, um die Einflussgröße und das abhängige Merkmal zu benennen. Zuvor wurden, um sich ein Bild über die Verteilung der Kern- und Zellflächen der

Gesamtpopulation zu machen, der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung der Kern- und Zellflächen sowie das Kern-/Zytoplasma-Verhältnis (K-/Z-Verhältnis) aller in der RNA-FISH analysierten Zellen als *Violin Plot* dargestellt (Abb. 61A-C im Anhang). In Abbildung 61A ist zu erkennen, dass die Kerne der unbehandelten Zellen im Mittel $234,5 \mu\text{m}^2$ (Median: $224,6 \mu\text{m}^2$, IQA: $70 \mu\text{m}^2$) groß waren. Nach 0,5h, 3h und 6h IL-1-Stimulation waren die Zellkerne im Mittel signifikant größer als die unbehandelten Zellkerne, nach 1h zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Dunnett's-Test, $p > 0,05$). Nach einer halbstündigen IL-1-Stimulation lag die mittlere Kernfläche bei $241,7 \mu\text{m}^2$ (Median: $233,9 \mu\text{m}^2$, IQA: $76,7 \mu\text{m}^2$), nach 3h bei $245,4 \mu\text{m}^2$ (Median: $234,5 \mu\text{m}^2$, IQA: $80,5 \mu\text{m}^2$) und nach 6h bei $260 \mu\text{m}^2$ (Median: $255,7 \mu\text{m}^2$, IQA: $90,3 \mu\text{m}^2$). Die Form des *Violin Plots* nach 6h und der im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten große IQA deuten darauf hin, dass die Kerngröße zu diesem Zeitpunkt über einen größeren Bereich streute als zu den anderen. Die mittlere Zytoplasmafläche der unbehandelten Zellen lag bei $1445 \mu\text{m}^2$. Nach sechsständiger IL-1 Stimulation war die Zytoplasmafläche signifikant auf $1637 \mu\text{m}^2$ erhöht (Dunnett's-Test, $p = 0,05$). Für alle anderen Zeitpunkte lag kein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Zellflächen behandelte und unbehandelte Zellen vor. Um zu überprüfen, ob nach IL-1-Stimulation nur die Kernflächen und nicht die Flächen der Zellen zugenommen hatten, wurde das K-/Z-Verhältnis gebildet und dessen Median, Quartile und Häufigkeitsverteilung als *Violin Plot* dargestellt (Abb. 61C). In unbehandelten Zellen war das mittlere K-/Z-Verhältnis 0,17. Es zeigte sich nur 3h nach IL-1-Stimulation ein signifikanter Unterschied des K-/Z-Verhältnisses behandelte und unbehandelte Zellen (Dunnett's-Test, $p < 0,05$). Wenn eine durch IL-1 induzierte Veränderung des Phänotyps der Zellen nach 0,5h und 6h stattgefunden hat, hat sich diese demnach in gleichen Maßen für Kern und Zytoplasma ereignet. Um einen genaueren Einblick in die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Flächen zu erhalten, wurden diese als relative Häufigkeitsverteilungen dargestellt (Abb. 61D-F), die einer Log-Normalverteilung glichen und daher an dieses Verteilungsmodell angepasst wurden. Die Häufigkeitsverteilungen der Kernfläche waren symmetrisch (Abb. Anhang 61D). Die Kurven der Kernfläche der behandelten Zellen waren im Vergleich zu denen der unbehandelten Zellen nach rechts verschoben, was anzeigt, dass in den behandelten Zellen häufiger größere Kernflächen gemessen wurde. Am deutlichsten nach rechts verschoben war die Kurven der 6h mit IL-1 behandelten Population. In Abbildung 61E ist die Häufigkeitsverteilung der Zytoplasmaflächen der untersuchten Zellen dargestellt. Die Verteilungen der Zytoplasmaflächen aller Bedingungen waren symmetrisch. Die Kurven für die unbehandelte Population und die Zellen nach 0,5h, 1h und 3h IL-1-Stimulation lagen übereinander. Die Kurve für die Population 6h nach IL-1-Stimulation war nach rechts verschoben und zeigte damit, dass in dieser Population eine Streuung der Zytoplasmaflächen hin zu höheren Werten vorhanden war. In Abbildung 61F ist die Häufigkeitsverteilung des Kern-/ Zytoplasmaverhältnisses gezeigt. Auch das Kern- / Zytoplasmaverhältnis war ein symmetrisch verteiltes Merkmal, wobei die Kurven der verschiedenen Bedingungen fast alle übereinander liegen. Eine Ausnahme dabei war die Kurve für die Population, die nach 3h IL-1-Stimulation fixiert wurde, welche leicht nach rechts verschoben ist. In dieser Population hatten die Zellen also ein etwas höheres K-/ Z-Verhältnis, als in den anderen Populationen. Durch diese RNA-FISH-Experimente wurden in den mit IL-1 behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, größere Zellkern- und Zytoplasmaflächen gemessen. Dabei waren, außer nach 3h IL-1 sowohl die Kernflächen als auch das Zytoplasma in gleichen Maßen vergrößert, sodass das K-/ Z-Verhältnis annähernd konstant blieb.

In Abbildung 38A sind die *Scatter Plots* für die Korrelation der *IL8* mRNA-Signale mit der Kernfläche für die verschiedenen Versuchsbedingungen gezeigt. Die Mittelwerte der Anzahl der mRNA-Signale und der Kernfläche der jeweiligen Bedingung sind ebenfalls in die *Scatter Plots* eingetragen. Um die Veränderung der Mittelwerte nach IL-1-Behandlung im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte der mRNA-Signal-Anzahl und der Kernfläche in unbehandelten Zellen in den *Scatter Plots* für die behandelten Zellen ergänzt und die Differenz beider Mittelwerte als farbige Fläche eingezeichnet.

In den unbehandelten Zellen verteilte sich die bivariate Punktwolke parallel entlang der X-Achse, was sich dadurch erklären lässt, dass in diesem Zustand in Zellen mit verschiedenen Kernflächen kaum *IL8* mRNA-Transkripte vorlagen. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation war die Punktwolke oval und lag schräg im Koordinatensystem, was ein Hinweis für einen gleichsinnigen Zusammenhang zwischen *IL8* mRNA-Menge und Kernfläche war. Zusätzlich zu der ovalen Punktwolke war weiterhin eine Gruppe von Punkten zu sehen, die sich entlang der X-Achse über verschiedene Kernflächen verteilte. Diese wurde als Korrelat der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen „*low expressing*“ Subpopulation betrachtet. Auch nach 1h, 3h und 6h IL-1-Behandlung lag die Punktwolke oval und schräg im Koordinatensystem, was auch für diese Bedingungen auf einen gleichsinnigen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern hinwies. Am homogensten verteilt war die Punktwolke nach einstündiger Stimulation mit IL-1, auch lagen zu dem Zeitpunkt am wenigsten Punkte entlang der X-Achse. Nach 3h und 6h nahm die Streuung der Punkte insbesondere in Richtung größerer Flächen und mRNA-Signal-Anzahlen wieder zu und auch die Zahl der Punkte entlang der X-Achse erhöhte sich. Um den Zusammenhang zwischen *IL8* mRNA-Signal-Anzahl und Kernfläche zu quantifizieren, wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, sowie das Konfidenzintervall von r berechnet. Des Weiteren wurde anhand des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten überprüft, ob sich der Korrelationskoeffizient signifikant von 0 unterschied (Abb. 38A). Die

Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen wurden in einer Korrelationstabelle miteinander verglichen (Abb. 38C). Daraus war ersichtlich, dass es in den unbehandelten Zellen keinen signifikanten Zusammenhang gab. Nach IL-1 Stimulation konnte zu allen Zeitpunkten ein signifikanter, mittel starker bis starker Zusammenhang zwischen der *IL8* mRNA-Menge und der Kernfläche festgestellt werden. Im Übrigen wurden in der Korrelationstabelle die Korrelationskoeffizienten weiterer unspezifischer Korrelationen, wie zum Beispiel von der Anzahl der *IL8* mRNA-Signale nach 3h IL-1-Stimulation mit der Kernfläche nach 1h IL-1-Stimulation, eingetragen. Diese sind deutlich kleiner als die Korrelationskoeffizienten für die Korrelation der Kernfläche mit der entsprechenden *IL8* mRNA-Signal-Menge eines Zeitpunkts, was als Zeichen für die Spezifität des Zusammenhangs gewertet werden kann.

Weiterhin ist die Verschiebung der gesamten Punktwolke nach IL-1-Behandlung nach rechts oben daran zu erkennen, dass die Fläche zwischen den Mittelwerten der unbehandelten Zellen und den Mittelwerten der behandelten Zellen immer größer wird und nach 6h IL-1 am größten ist. Dies spiegelt die signifikant größeren Zellkerne nach 6 h IL-1-Stimulation, die bereits weiter oben beschrieben wurden in dieser Darstellungsform wieder.

Genau wie für *IL8* wurde für *IL6* der Zusammenhang zwischen der *IL6* mRNA-Menge und der Kernfläche untersucht. Abbildung 38B zeigt die Korrelation der *IL6* mRNA-Menge mit der Kernfläche. In unbehandelten Zellen war die Punktwolke entlang der X-Achse verteilt, was sich wieder damit erklären lässt, dass in unbehandelten Zellen wenig *IL6* mRNA detektiert wurde. In den behandelten Zellen zeigte die Punktwolke zu allen Zeitpunkten eine dreieckige Form, bei der die Basis der Dreiecke entlang der X-Achse verlief. Dieses Verteilungsmuster war zu erwarten, da die *IL6* mRNA linksgipflig verteilt war (Kapitel 4.3.3) und es sich bei der Kernfläche um ein symmetrisch verteiltes Merkmal handelte (Kapitel 4.6.2). Nach 1h, 3h und 6h IL-1-Stimulation war eine Zunahme der Streuung der Punktwolke zu beobachten, jedoch nicht im Sinne eines Zusammenhangs zwischen den beiden Parametern. Auch die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten ergab für keinen Zeitpunkt einen signifikanten Zusammenhang zwischen *IL6* mRNA-Menge und Kernfläche (Abb. 38B, D, t-Test für den Korrelationskoeffizienten).

Insgesamt konnte mit dieser Analyse gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivität einer Zelle für *IL8* und ihrer Kernfläche gab. Im Kontrast dazu konnte ein entsprechender Zusammenhang für *IL6* nicht gezeigt werden.

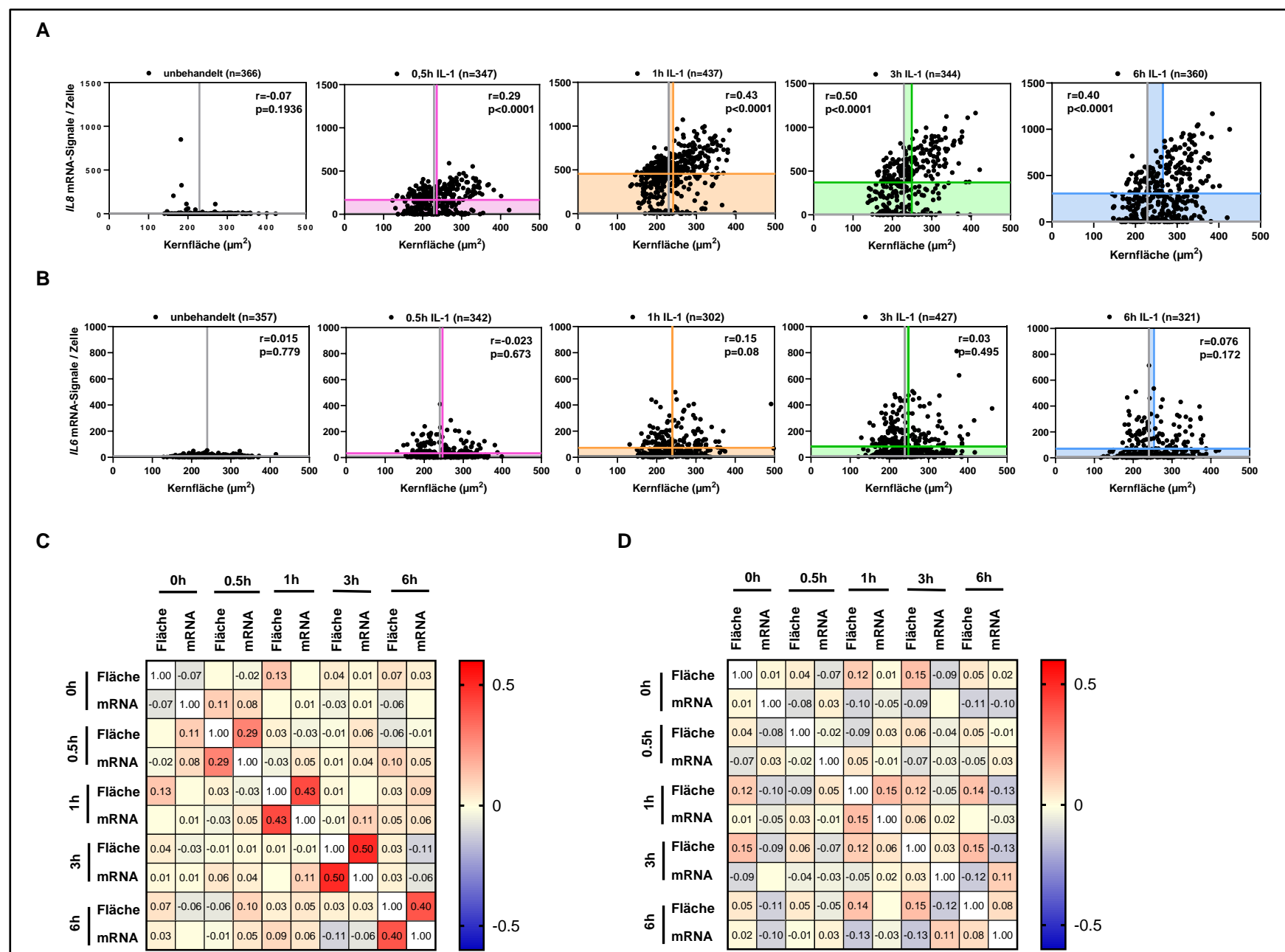


Abbildung 38: Untersuchung des Zusammenhangs von Kernfläche und mRNA-Menge in Zytokin-stimulierten Zellen.

A: Darstellung der Korrelation der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle mit der Kernfläche in *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 344 Zellen pro Bedingung. Farbige Markierung der Mittelwerte der behandelten Zellen. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen (grau) eingetragen und die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten jeweils als bunte Fläche markiert. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.})) = -0,17 - 0,03$, $CI(r(0,5h)) = 0,19 - 0,38$, $CI(r(1h)) = 0,35 - 0,50$, $CI(r(3h)) = 0,42 - 0,58$, $CI(r(6h)) = 0,33 - 0,50$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Darstellung der Korrelation der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle mit der Kernfläche in *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 302 Zellen pro Bedingung. Farbige Markierung der Mittelwerte der behandelten Zellen. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen (grau) eingetragen und die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten jeweils als bunte Fläche markiert. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.})) = -0,04 - 0,17$, $CI(r(0,5h)) = -0,12 - 0,09$, $CI(r(1h)) = 0,03 - 0,26$, $CI(r(3h)) = -0,11 - 0,08$, $CI(r(6h)) = -0,04 - 0,18$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **C:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen, die für die Korrelation der *IL8* mRNA-Signal-Anzahl (mRNA) mit der Kernfläche (Fläche) berechnet wurden in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. **D:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen, die für die Korrelation der *IL6* mRNA-Signal-Anzahl (mRNA) mit der Kernfläche (Fläche) berechnet wurden in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle.

Da in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, dass sich die Kernfläche und die Zytoplasmafläche nach IL-1-Behandlung sehr ähnlich verhielten, stellte sich die Frage, ob auch für die Zytoplasmafläche eine Korrelation mit der Menge der *IL8* mRNA pro Zelle feststellbar sei. Daher wurden die Zytoplasmafläche und die Anzahl der *IL8* bzw. *IL6* mRNA-Signale pro Zelle miteinander korreliert (Abb. 39). Die *Scatter Plots* der Korrelation der Zytoplasmafläche mit den *IL8* mRNA-Signalen pro Zelle werden in Abbildung 39A gezeigt, die dazugehörige Korrelationstabelle in Abbildung 39C. Weiterhin sind in Abbildung 37A die Mittelwerte der *IL8* mRNA-Signal-Menge und der Zytoplasmafläche der behandelten Zellen, sowie die der unbehandelten Zellen und die Differenz der Mittelwerte der unbehandelten und behandelten Zellen, wie oben beschrieben eingezeichnet. Die Punktwolke lag für die mit IL-1 behandelten Zellen oval und schräg im Koordinatensystem, was auf einen gleichsinnigen Zusammenhang zwischen der *IL8* mRNA-Menge einer Zelle und ihrer Zytoplasmafläche hindeutete. Dies wurde durch die hohen Korrelationskoeffizienten für die ein-, drei- und sechsstündige IL-1 Stimulation bestätigt. Obwohl der Korrelationskoeffizient des 0,5h-Zeitpunkts mit 0,13 zunächst auf einen leichten Zusammenhang hindeutete, konnte bei Berücksichtigung des großen Konfidenzintervall dieses Korrelationskoeffizienten nicht mit Sicherheit von einem Zusammenhang ausgegangen werden. Im Gegensatz zur Korrelation mit der Kernfläche verschob sich die Punktwolke der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe nur nach oben und nur 6h nach IL-1 nach rechts oben.

In Abbildung 39B werden die *Scatter Plots* der Korrelation der Zytoplasmafläche und der Anzahl der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle gezeigt. Abbildung 39D zeigt die dazugehörige Korrelationstabelle. Die Form der Punktwolke ähnelte stark der Punktwolke der Korrelation von Kernfläche und *IL6* mRNA-Menge. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten und die Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten deuteten auf signifikante leichte Zusammenhänge zwischen der *IL6* mRNA-Menge pro Zelle und der Zytoplasmafläche hin. Jedoch war das Konfidenzintervall nur für das 3h-Inkubationsintervall so klein, dass sicher von einem Zusammenhang ausgegangen werden kann.

Insgesamt konnte hiermit gezeigt werden, dass es nach 1h, 3h und 6h ebenfalls einen mittelstarken, signifikanten Zusammenhang zwischen der Zytoplasmafläche und der *IL8* mRNA-Menge einer Zelle gab. Für *IL6* ließ sich dagegen nur ein leichter signifikanter Zusammenhang zwischen der Zytoplasmafläche und der Transkriptionsaktivität der Zelle nach dreistündiger Stimulation zeigen.

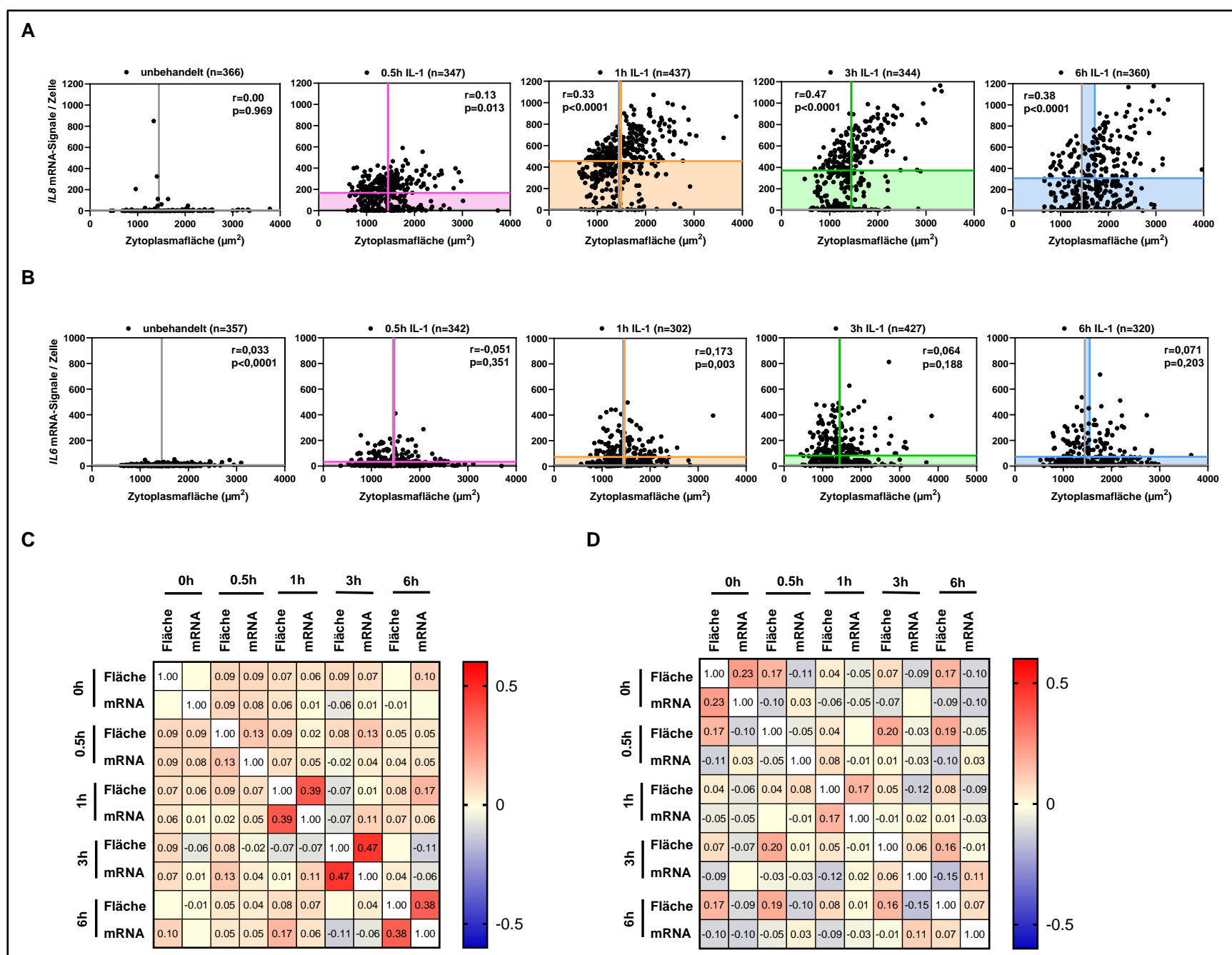


Abbildung 39: Untersuchung des Zusammenhangs von Zytoplasmfläche und mRNA-Menge.

A: Darstellung der Korrelation der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle mit der Zytoplasmfläche in *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 344 Zellen pro Bedingung. Farbige Markierung der Mittelwerte für die behandelten Zellen. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen (grau) in alle *Scatter Plots* eingetragen und die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten jeweils als bunte Fläche markiert. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.})) = -0,10 - 0,10$, $CI(r(0,5h)) = 0,03 - 0,23$, $CI(r(1h)) = 0,31 - 0,47$, $CI(r(3h)) = 0,40 - 0,55$, $CI(r(6h)) = 0,29 - 0,46$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Darstellung der Korrelation der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle mit der Zytoplasmfläche in *Scatter Plots* für die unbehandelten Zellen und für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Behandlung aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten in den Gesamtpopulationen von mindestens 302 Zellen pro Bedingung. Farbige Markierung der Mittelwerte für die behandelten Zellen. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der unbehandelten Zellen (grau) in alle *Scatter Plots* eingetragen und die Differenz zwischen den beiden Mittelwerten jeweils als bunte Fläche markiert. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und ihrer Konfidenzintervalle: $CI(r(\text{unb.})) = 0,13 - 0,33$, $CI(r(0,5h)) = -0,16 - 0,06$, $CI(r(1h)) = 0,06 - 0,28$, $CI(r(3h)) = -0,03 - 0,16$, $CI(r(6h)) = -0,04 - 0,18$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **C:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen, die für die Korrelation der *IL8* mRNA-Signale (mRNA) mit der Zytoplasmfläche (Fläche) berechnet wurden, in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. **D:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Bedingungen, die für die Korrelation der *IL6* mRNA-Signale (mRNA) mit der Zytoplasmfläche (Fläche) berechnet wurden, in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle.

Im Folgenden stellte sich die Frage, wie es zu diesem Zusammenhang zwischen *IL8* mRNA-Menge und Kern- bzw. Zytoplasmagröße kam. Mögliche Mechanismen bestanden auf den verschiedenen Ebenen, die die mRNA-Menge eines Zielgens nach IL-1-Stimulation beeinflussen, also die Rezeptorbindung, die zytoplasmatische Signalkaskade, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, die Initiation der Transkription und die Elongation, die mRNA-Prozessierung, die mRNA-Stabilisierung bzw. der mRNA-Abbau und der nukleozytoplasmatische Transport der mRNA (Priester et al. 2022). Für die Planung weiterer Untersuchungen sollten die möglichen Mechanismen auf ein Kompartiment (Zytoplasma oder Zellkern) eingeschränkt werden. Dazu wurden die, in der RNA-FISH (Abb. 26, 28) detektierten, *IL8* mRNA-Transkripte getrennt nach ihrer Lokalisation im Zellkern oder im Zytoplasma quantifiziert. In Abbildung 40A ist die Anzahl der *IL8* mRNA-Signale im Zellkern relativ zu allen *IL8* mRNA-Signalen der Zelle in Prozent als *Violin Plot* dargestellt. In unbehandelten Zellen lagen so wenige *IL8* mRNA-Signale vor, dass häufig 100 % oder 0 % aller *IL8* mRNA-Signale im Kern vorlagen. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation befanden sich im Mittel 50 % der mRNA-Signale im Zellkern. Nach 1h IL-1-Stimulation lag der Anteil der mRNA-Signale im Kern nur noch bei im Mittel 27 % und blieb zu den späteren Zeitpunkten relativ konstant bei 24 %. Diese Kinetik spiegelte die Kompartimentierung der Transkription und Translation wider. Im Anschluss wurden die in den jeweiligen Kompartimenten lokalisierten

IL8 mRNA-Mengen mit der Kernfläche und der Zytoplasmafläche korreliert und die Korrelationskoeffizienten in Tabellen verglichen, um zu erfassen, ob die mRNA-Menge in beiden Kompartimenten im gleich starken Zusammenhang mit der Fläche dieser Kompartimente stand (Abb. 40B-E). Zu erkennen war, dass nach 1h, 3h und 6h der IL-1-Stimulation ein ähnlich starker signifikanter Zusammenhang zwischen der nukleären *IL8* mRNA-Menge und der Kernfläche, der nukleären *IL8* mRNA-Menge und der Zytoplasmafläche, der Menge zytosolischer *IL8* mRNA und der Zytoplasmafläche und der Menge zytosolischer *IL8* mRNA und der Kernfläche bestand. Nach halbstündiger IL-1-Stimulation bestand ein signifikanter, mittel starker Zusammenhang zwischen der *IL8* mRNA-Menge im Kern und der Kernfläche und ein signifikanter, leichter Zusammenhang zwischen der Zahl der *IL8* mRNA-Signale im Kern und der Zytoplasmafläche, sowie ein signifikanter, schwacher Zusammenhang zwischen den *IL8* mRNA-Signalen im Zytosol und der Kernfläche. Kein Zusammenhang bestand allerdings zwischen der *IL8* mRNA-Menge im Zytosol und der Zytoplasmafläche. Dies gab einen Hinweis darauf, dass die Ursache, die hinter dem Zusammenhang von Fläche von Kern und Zytoplasma und der *IL8* mRNA-Menge eher im Zellkern zu suchen war, und daher möglicherweise mit Prozessen wie der Chromatin-Organisation, der Transkription, der prä-mRNA-Stabilisierung oder dem mRNA-Export zusammenhing. Weiterhin ist das Fehlen des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der *IL8* mRNA-Signale im Zytosol und der Zytoplasmafläche besonders interessant, da sich nach halbstündiger IL-1-Stimulation 50 % der *IL8* mRNA-Signale im Kern befanden. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass der Zusammenhang mit der mRNA-Menge und Verteilung und damit mit der Dichte der mRNA-Moleküle im Raum zusammenhing.

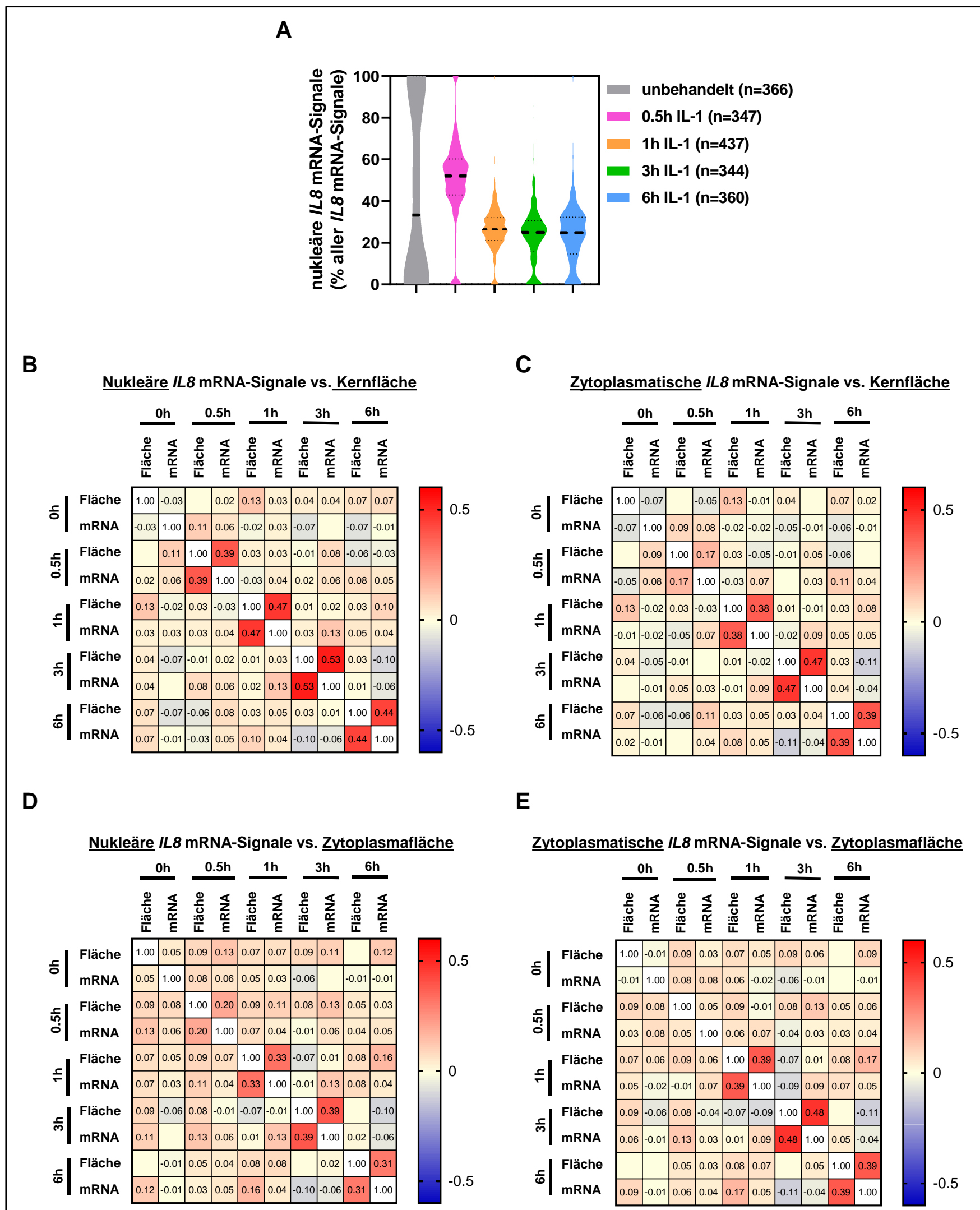


Abbildung 40: Untersuchung des Einflusses der Lokalisation der *IL8* mRNA-Signale auf den Zusammenhang von *IL8* mRNA-Menge und der Zellfläche.

Quantifizierung der *IL8* mRNA-Signale im Kern, im Zytoplasma und in der gesamten Zelle. **A:** Berechnung der relativen Anzahl an *IL8* mRNA-Signalen im Kern als Anteil von der Gesamtmenge der *IL8* mRNA-Signale in der Zelle in Prozent. Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung des relativen Anteils der nukleären *IL8* mRNA-Signale für die verschiedenen Bedingungen aus 2 unabhängigen Experimenten für Gesamtpopulationen von mindestens 344 Zellen. **B-E:** Korrelation der *IL8* mRNA-Signal-Anzahl im Kern oder im Zytoplasma mit der Kernfläche bzw. der Zytoplasmafläche und Berechnung der Korrelationskoeffizienten r , sowie der Konfidenzintervalle für r . Darstellung der Korrelationskoeffizienten aller Zeitpunkte nach IL-1 Stimulation und der unbehandelten Zellen in Korrelationstabelle. Farbige Markierung der Korrelationskoeffizienten entsprechend ihrer Größe nach der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Korrelation der nukleären *IL8* mRNA-Signal-Anzahl mit der Kernfläche. CI: CI(r (unb.))= -0,13 – 0,08, CI(r (0,5h))= 0,30 – 0,48, CI(r (1h))= 0,39 – 0,54, CI(r (3h))= 0,45 – 0,60, CI(r (6h))= 0,36 – 0,52. T-Test: p (unb.)=0,63, p (0,5h)<0,0001, p (1h)<0,0001, p (3h)<0,0001, p (6h)<0,0001. **C:** Korrelation der zytoplasmatischen *IL8* mRNA-Signale-Anzahl mit der Kernfläche. CI: CI(r (unb.))= -0,17 – 0,03, CI(r (0,5h))= 0,06 – 0,27, CI(r (1h))= 0,30

- 0,46, CI(r(3h))= 0,39 - 0,55, CI(r(6h))= 0,30 - 0,48. T-Test: p(unb.)= 0,19, p(0,5h)=0,002, p(1h)<0,0001, p(3h)<0,0001, p(6h)<0,0001. **D:** Korrelation der nukleären *IL8* mRNA-Signal-Anzahl mit der Zytoplasmafläche. CI: CI(r(unb.))= -0,13 - 0,08, CI(r(0,5h))= 0,30 - 0,48, CI(r(1h))= 0,39 - 0,54, CI(r(3h))= 0,45 - 0,60, CI(r(6h))= 0,36 - 0,52. t-Test: p(unb.)= 0,63, p(0,5h)<0,0001, p(1h)<0,0001, p(3h)<0,0001, p(6h)<0,0001. **E:** Korrelation der zytoplasmatischen *IL8* mRNA-Signal-Anzahl mit der Zytoplasmafläche. CI: CI(r(unb.))= -0,12 - 0,09, CI(r(0,5h))=-0,05 - 0,16, CI(r(1h))= 0,30 - 0,46, CI(r(3h))= 0,39 - 0,57, CI(r(6h))= 0,30 - 0,47. t-Test: p(unb.)=0,81, p(0,5h)=0,33, p(1h)<0,0001, p(3h)<0,0001, p(6h)<0,0001.

Insgesamt wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass die Kernfläche und die Zytoplasmafläche nach IL-1-Stimulation mit der Transkriptionsaktivität einer Zelle für *IL8* zusammenhing. Im Gegensatz dazu konnte dieser Zusammenhang für die Transkriptionsaktivität von *IL6* nicht gezeigt werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass der Zusammenhang zwischen der Kernfläche und der Anzahl der im Kern lokalisierten *IL8* mRNA-Signale am stärksten war. Besonders auffällig war der Unterschied zwischen der Stärke der Zusammenhänge der Menge der zytoplasmatischen *IL8* mRNA mit der Zytoplasmafläche und der Menge der nukleären *IL8* mRNA mit der Kernfläche nach halbstündiger IL-1-Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt war noch die Hälfte der *IL8* mRNA-Signale im Kern lokalisiert, was darauf hindeutete, dass die Ursache für den Zusammenhang zwischen Transkriptionsaktivität und Phänotyp der Zelle im Zellkern lokalisiert war.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Kernfläche und die Zytoplasmafläche der Gesamtpopulation, die in der RNA-FISH untersucht wurde, nach IL-1-Stimulation zunahm, und nach sechsständiger Behandlung am größten war, was den zuvor mittels 2D Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnissen (Kapitel 4.2) widersprach.

4.6.3 Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Anzahl der aktiven Gene in einer Zelle

In Kapitel 4.6.2 wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Kernfläche und der Transkriptionsaktivität für *IL8* bestand und dass der Mechanismus dahinter am ehesten im Zellkern lokalisiert sein könnte. In Kapitel 4.4 wurde gezeigt, dass die mRNA-Menge in einer Zelle damit zusammenhing, ob gerade aktiv Transkription an den entsprechenden Genen stattfand. Daher stellte sich die Frage, ob der Transkriptionsaktivität-Flächen-Zusammenhang ebenfalls mit dem gleichzeitigen Vorliegen aktiver *IL8*-Gene zusammenhing. Um dies zu überprüfen, wurde die Gesamtpopulation, entsprechend der Anzahl der *IL8* prä-mRNA-Signale, die die Zellen enthielten, wieder in zwei Subpopulationen (Zellen mit und ohne *IL8* prä-mRNA-Signale) eingeteilt. Anschließend wurden die Kernfläche und die Anzahl der *IL8* mRNA-Signale innerhalb der Subpopulationen miteinander korreliert, die Korrelationskoeffizienten berechnet und der T-Test für den Korrelationskoeffizienten durchgeführt (Abb. 41A). In Abbildung 41A ist zu sehen, dass die Punktwolke für alle Zeitpunkte in beiden Subpopulationen nach IL-1-Stimulation oval war und schräg im Koordinatensystem lag. Dies deutete darauf hin, dass sowohl in der Subpopulation ohne aktive Transkriptionsorte als auch in der Subpopulation mit aktiven Transkriptionsorten ein signifikanter, gleichsinniger Zusammenhang zwischen der Kernfläche und der *IL8* mRNA-Menge einer Zelle bestand. Dabei konnte zwischen den beiden Subpopulationen kein Unterschied in der Form und Lage der Punktwolke beobachtet werden. Der Vergleich der Korrelationskoeffizienten in Korrelationstabellen zeigte, dass diese für beide Subpopulationen zu jedem Zeitpunkt der Stimulation für einen mittleren bis großen Zusammenhang sprachen und eine ähnliche Größe hatten, wenngleich die Korrelationskoeffizienten in der Subpopulation mit prä-mRNA-Signalen tendenziell ein bisschen höher waren (Abb. 41B, C).

Insgesamt lässt sich aus diesen Daten nicht schließen, dass der Transkriptionsaktivität-Flächen-Zusammenhang von der gerade in der Zelle stattfindenden Transkription abhängig war.

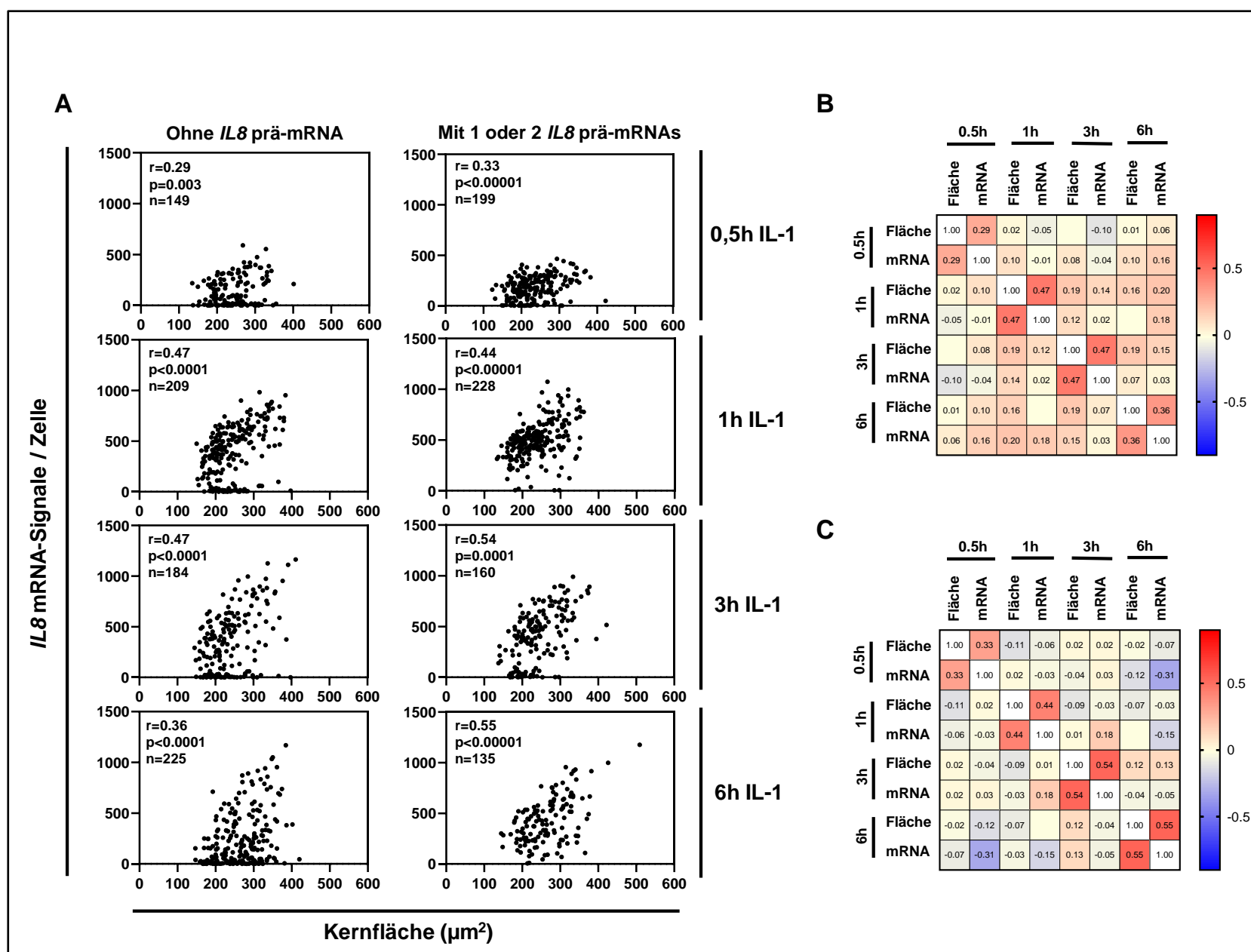


Abbildung 41: Untersuchung des Einflusses der aktiver Transkriptionsstellen auf den Zusammenhang von *IL8* mRNA-Menge und der Kernfläche.

Aufteilung der Gesamtpopulation der Zellen, in denen *IL8* mRNA detektiert wurde, aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit insgesamt mindestens 344 Zellen pro Bedingung in 2 Subpopulationen: Zellen die *IL8* prä-mRNA-Signale enthielten, und Zellen ohne *IL8* prä-mRNA-Signale. **A:** Darstellung der Korrelation von Kernfläche und *IL8* mRNA-Signale pro Zelle als *Scatter Plots* getrennt für die beiden Subpopulationen. Berechnung der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und deren Konfidenzintervall. Durchführung des T-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Vergleich der zu A gehörigen Korrelationskoeffizienten aller Zeitpunkte für die Subpopulation ohne prä-mRNA-Signale in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. CI: $CI(r(0,5h)) = 0,14 - 0,44$, $CI(r(1h)) = 0,36 - 0,57$, $CI(r(3h)) = 0,35 - 0,58$, $CI(r(6h)) = 0,24 - 0,47$. **C:** Vergleich der zu A gehörigen Korrelationskoeffizienten aller Zeitpunkte für die Subpopulation mit ein oder zwei prä-mRNA-Signale in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts neben der Korrelationstabelle. CI: $CI(r(0,5h)) = 0,20 - 0,45$, $CI(r(1h)) = 0,33 - 0,54$, $CI(r(3h)) = 0,42 - 0,64$, $CI(r(6h)) = 0,42 - 0,66$.

4.6.4 Die Kerngröße und die Zellgröße im Zusammenhang mit der Position aktiver Gene im Zellkern

In den vorherigen Kapiteln wurden im Rahmen einer Stimulation mit IL-1 ein Zusammenhang zwischen der Kernfläche und der Transkriptionsaktivität der Zelle (Kapitel 4.6.2) und ein Zusammenhang zwischen der Transkriptionsaktivität und dem Vorkommen aktiver Genloci (Kapitel 4.4) beschrieben. Im Zeitverlauf der IL-1-Stimulation konnten keine signifikanten Änderungen der mittleren radialen Position ermittelt werden (Kapitel 4.5.1). Allerdings stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der radialen Position der aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci und der Kernfläche feststellbar sei. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden die beiden Parameter miteinander korreliert, der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, sowie dessen Konfidenzintervall bestimmt und der t-Test für den Korrelationskoeffizienten r durchgeführt. In Abbildung 42A sind die *Scatter Plots* der Korrelation zwischen der radialen Position der *IL8*-Genloci für alle Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation dargestellt. Auf die Korrelation der in unbehandelten Zellen erhobenen Parameter wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße verzichtet. Einhergehend mit Beobachtungen in Kapitel 4.5.1 war anhand der Verteilung der Punktwolke zu erkennen, dass die aktiven *IL8*-Genloci zu allen Zeitpunkten nach IL-1-Stimulation hauptsächlich in der peripheren Kernhälfte lokalisiert waren. Die Punktwolke war eher kreisförmig im oberen Abschnitt des Koordinatensystems lokalisiert, was bei der Korrelation zweier nicht miteinander zusammenhängender Parameter, von denen einer symmetrisch und der andere rechtsgipflig verteilt ist, zu erwarten war. Die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten ergab für keinen Zeitpunkt eine signifikante Korrelation (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p > 0,05$). Abbildung 42B veranschaulicht die Korrelation der radialen Position der *IL6*-Genloci mit der Kernfläche in *Scatter Plots*. Auch diese Korrelation zeigte eine kreis- bis bandförmige Punktwolke, die am dichtesten im oberen Teil des Koordinatensystems war. Dies deutete darauf hin, dass zwischen den beiden Parametern kein Zusammenhang bestand und dass die *IL6*-Genloci unabhängig von der Kernfläche

häufiger in der peripheren Kernhälfte lokalisiert waren als in der zentralen. Bestätigt wird diese Annahme dadurch, dass die Berechnung der Korrelationskoeffizienten kein signifikantes Ergebnis erbrachte (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p > 0,05$). Darüber hinaus wurden die interallelichen und interchromosomalen Distanzen mit der Kernfläche korreliert, was ebenfalls keine signifikanten Korrelationen aufzeigte (Daten nicht gezeigt).

Ein Zusammenhang der radialen Position von aktiven *IL8* und *IL6* Genloci und der Kernfläche ergab sich also nicht. Gleiches galt für die untersuchten Zusammenhänge zwischen interallelichen und interchromosomalen Distanzen zwischen den aktiven Genloci von *IL8*, *IL6* und *CXCL2* und der Kernfläche.

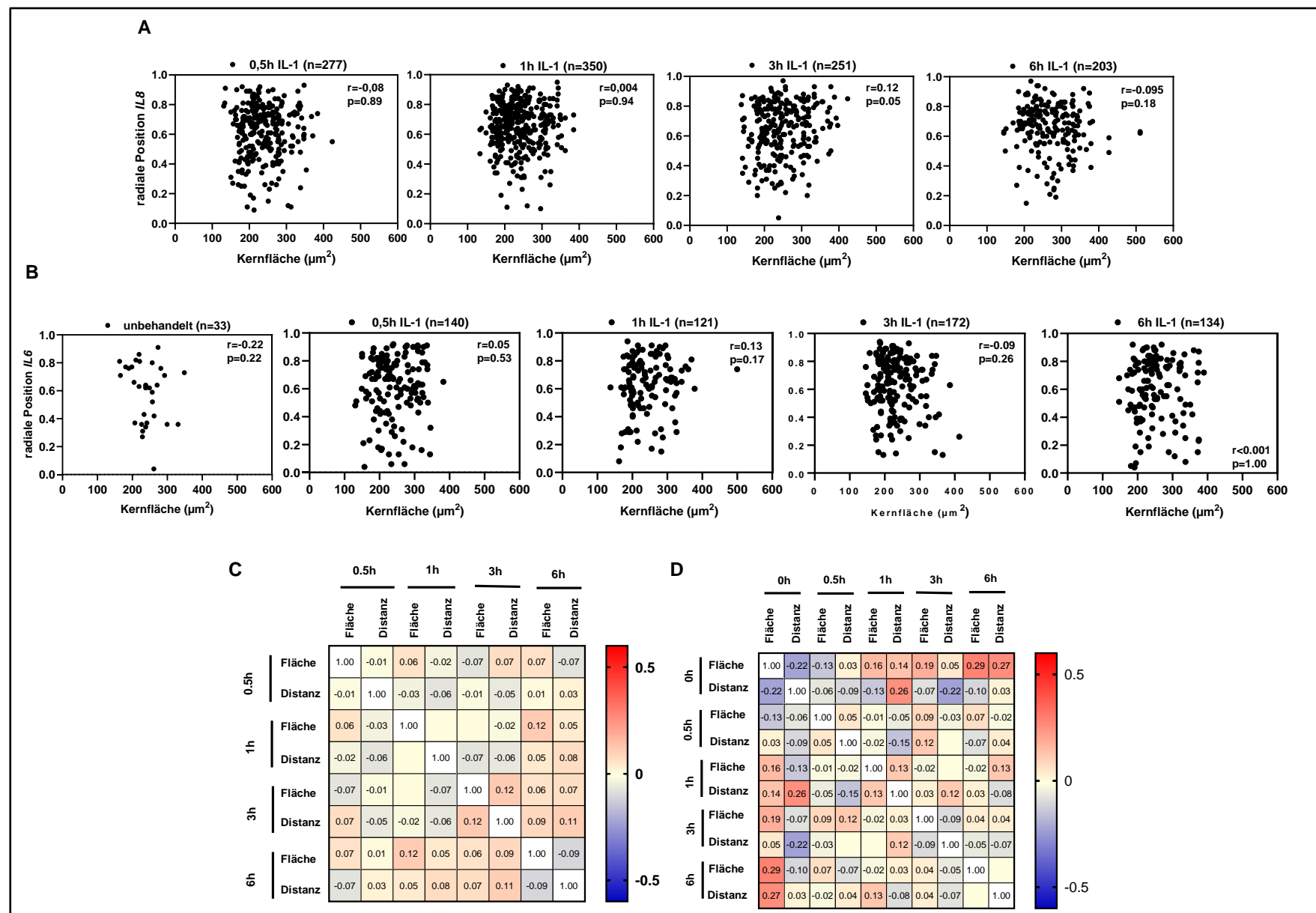


Abbildung 42: Untersuchung des Zusammenhangs von Kernfläche und Position der aktiven Genloci von *IL8* und *IL6* im nukleären Raum.

A: Korrelation der radialen Position der aktiven *IL8*-Genloci mit der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten für die mit IL-1 behandelten Populationen und mit mindestens 203 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r , Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Korrelation der radialen Position der aktiven *IL6*-Genloci mit der Kernfläche mit Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten und mit mindestens 33 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r , Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **C:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson der Korrelation der radialen Position der aktiven *IL8*-Genloci mit der Kernfläche in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts. Felder in denen keine Korrelationskoeffizienten eingetragen wurden haben den Wert $< \pm 0,01$. $CI(r(0,5h)) = -0,13 - 0,11$; $CI(r(1h)) = -0,10 - 0,11$; $CI(r(3h)) = 0 - 0,24$; $CI(r(6h)) = -0,23 - 0,04$. **D:** Vergleich der Korrelationskoeffizienten r nach Pearson der Korrelation der radialen Position der aktiven *IL6*-Genloci mit der Kernfläche in einer Korrelationstabelle. Farbliche Markierung der Korrelationskoeffizienten nach ihrer Größe entsprechend der Legende rechts. Felder in denen keine Korrelationskoeffizienten eingetragen wurden haben den Wert $< \pm 0,01$. $CI(r(unb.)) = -0,52 - 0,14$; $CI(r(0,5h)) = -0,11 - 0,21$; $CI(r(1h)) = -0,05 - 0,30$; $CI(r(3h)) = -0,23 - 0,06$; $CI(r(6h)) = -0,17 - 0,17$.

4.7 Validierung der gewonnenen Erkenntnisse in 2D Immuno-RNA-FISH und 3D RNA-FISH

Mithilfe von RNA-FISH-Experimenten konnte in Kapitel 4.6.2 gezeigt werden, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der *IL8* mRNA-Menge und der indirekt über die Hoechst-Färbung gemessenen Kernfläche sowie der Zytoplasmfläche gab. Dieser Zusammenhang konnte nicht für die *IL6* mRNA gezeigt werden. Allerdings wichen die Ergebnisse, die über die Hoechst-Färbung gemessenen Kernfläche (Kapitel 4.6.2) tendenziell von den Ergebnissen der Messung der Kernfläche über die Antikörper-basierte Anfärbung der Kernlamina (Kapitel 4.2) ab.

4.7.1 Validierung der Ergebnisse mittels 2D Immuno-RNA-FISH

Durch die Kombination von Immunfluoreszenz und RNA-FISH wurden sowohl Proteine der Kernlamina als auch RNA in einer Probe angefärbt, um eventuelle Veränderungen der Kerngröße zu untersuchen und den Kernflächen-Transkriptionsaktivitäts-Zusammenhang und

dessen Spezifität für *IL8* mit einer zweiten Färbemethode zu validieren. Insgesamt wurden drei unterschiedliche technische Replikate angefertigt in denen jeweils Sonden für *IL8*, *IL6* und *CXCL2* mRNA und deren korrespondierende prä-mRNA mit einem Primärantikörper, der Kernlamine der Gruppen A und C markierte, kombiniert wurden (Abb. 43 - 45). Weiterhin wurden die Zellen in diesem Versuch unbehandelt belassen oder über 0,25h, 0,5h, 1h und 3h mit IL-1 stimuliert, mit dem Ziel auf diese Weise die Lokalisation der aktiven Genloci möglichst früh nach IL-1-Stimulation zu erfassen und so einen besseren Einblick in die Dynamik der Genloci im Raum zu erhalten.

In allen drei Replikaten konnten in allen Bedingungen im Phasenkontrast adhärente, morphologisch unauffällige und mäßig dichte hTERT-RPE1-Zellen ausgemacht werden (Abb. 43 - 45). Sowohl durch die Markierung der Kernlamine A und C als auch durch die Hoechstfärbung konnten für alle Bedingungen ovale Zellkerne sichtbar gemacht werden, die sich subjektiv in ihrer Größe und Form nicht voneinander unterschieden.

In dem Ansatz mit Sonden für *IL8* mRNA und prä-mRNA (Abb. 43) konnten wie zuvor in unbehandelten Zellen fast keine *IL8* mRNA oder prä-mRNA-Signale entdeckt werden. Nach viertelstündiger IL-1-Stimulation konnten vereinzelte *IL8* mRNA und prä-mRNA-Signale beobachtet werden, die besonders in der Nähe der Zellkerne lokalisiert waren. Die mRNA-Menge steigerte sich allmählich, bis die Zellen nach 1h zum Großteil stark gefüllt mit *IL8* mRNA waren. Nach dreistündiger IL-1-Behandlung zeigte sich wieder eine heterogene Zellpopulation, die sich aus Zellen mit wenigen und mit sehr vielen *IL8* mRNA-Signalen zusammensetzte. Die prä-mRNA Signale stellten sich als ein bis zwei helle grüne Punkte pro Zelle dar, die teilweise von weniger intensiven, kleinen Punkten umgeben waren und gehäuft nach 0,5h und 1h IL-1-Stimulation vorkamen.

Auch für *IL6* konnten in unbehandelten Zellen weder *IL6* mRNA- noch *IL6* prä-mRNA-Signale beobachtet werden (Abb. 44). Nach 0,25h und 0,5h IL-1-Stimulation kamen geringfügig mehr *IL6* mRNA-Signale als in unbehandelten Zellen vor, und nach 1h und 3h waren gleichmäßig über die Zelle verteilte *IL6* mRNA-Signale sichtbar, die in ihrer Zahl deutlich der *IL8*-mRNA-Menge unterlagen. Auch die *IL6* prä-mRNA-Signale, welche sich ebenfalls als helle grüne Punkte zeigten, waren insgesamt seltener als die *IL8* prä-mRNA-Signale. Die *CXCL2* mRNA konnte im dritten Replikat ebenfalls als violette Punkte erkannt werden (Abb. 45). Sie war in unbehandelten Zellen nicht zu erkennen und erreichte ihre größte Menge nach dreistündiger IL-1-Stimulation, wobei sie besonders zellkernnah lokalisiert war. *CXCL2* prä-mRNA-Signale waren nach der IL-1-Stimulation, besonders nach 0,25h, 0,5h und 1h, häufig als grüne helle Punkte zu erkennen.

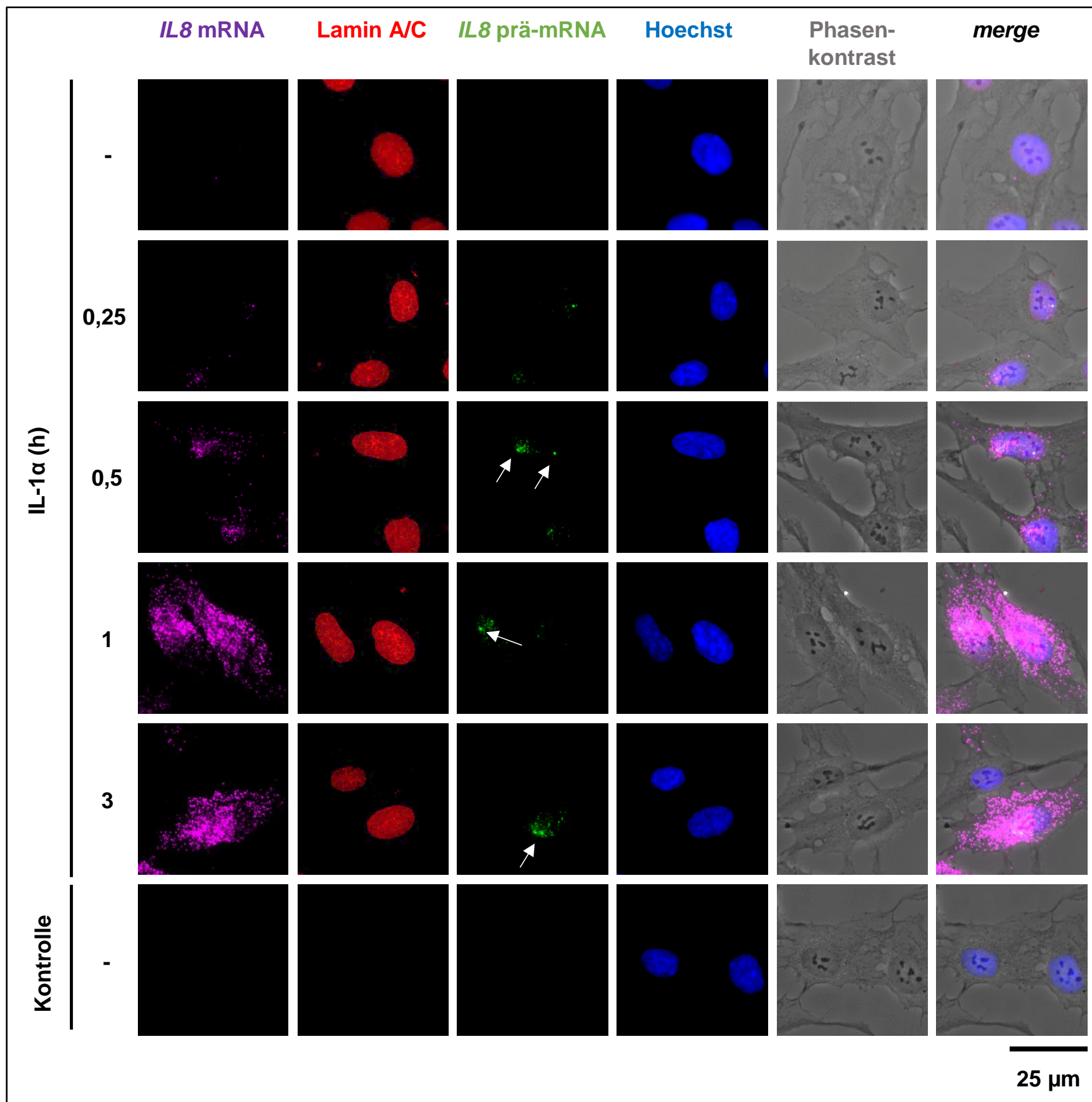


Abbildung 43: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.

hTERT-RPE-1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine Immuno-RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL8* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) und ein Primärantikörper gegen Lamin A/C (ms) der Firma Santa Cruz Biotechnology (#sc-3762418) (markiert mit Sekundärantikörper DL488 der Firma Immuno Reagent #DKxMu003D488NHSX) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden und Primärantikörper inkubiert wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software unter der Verwendung von Falschfarben, für die bessere Visualisierung der Kolo-kalisationen aus mRNA und prä-mRNA, sodass die Lamine A/C rot und die *IL8* prä-mRNA grün dargestellt wurde. Messbalken: 25 μ m.

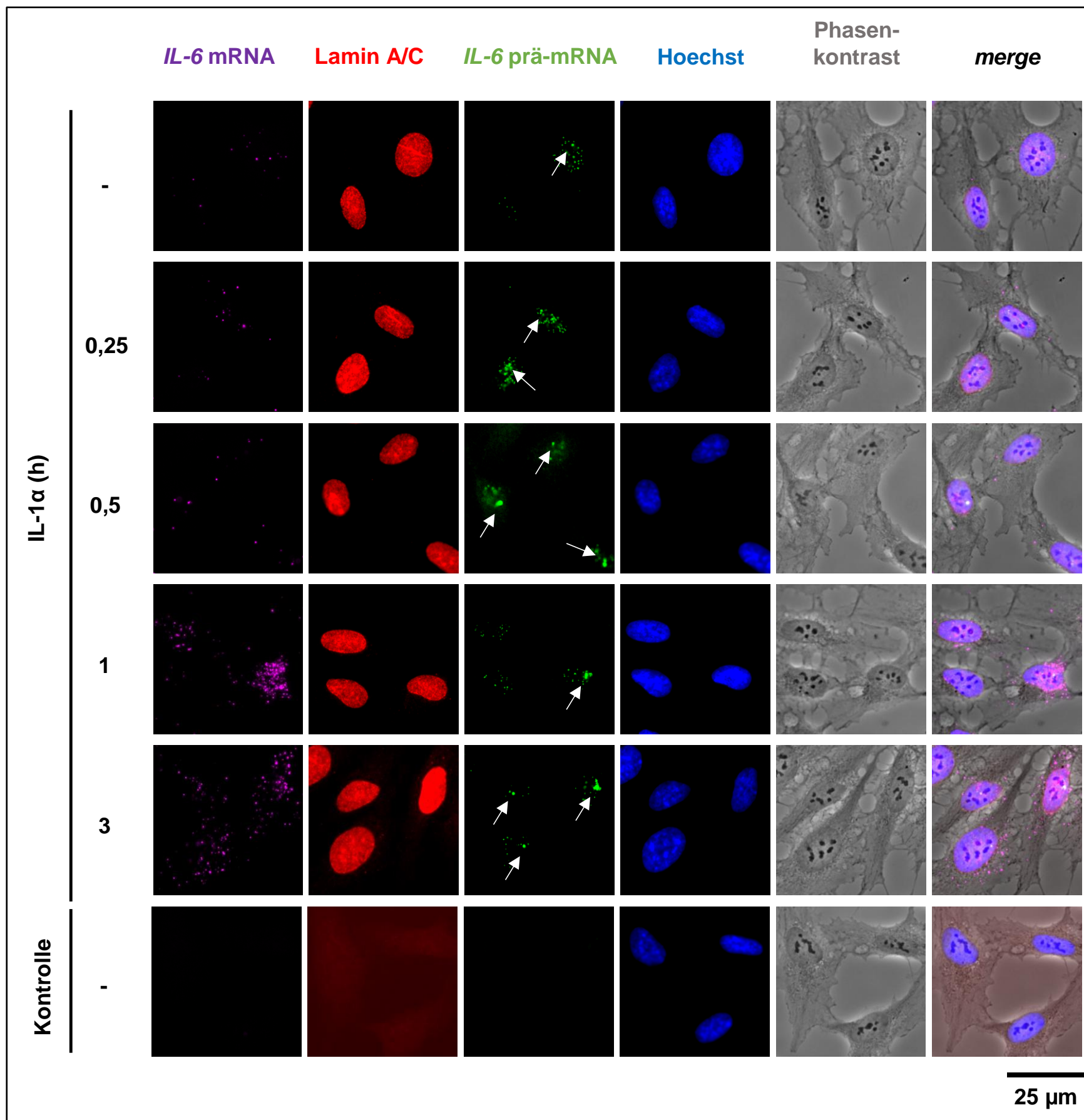


Abbildung 44: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für *IL6* mRNA, *IL6* prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.

hTERT-RPE-1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine Immuno-RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL6* mRNA (#VA6-612712; type 6), und *IL6* prä-mRNA (#VA4-6001007; type 4) und ein Primärantikörper gegen Lamin A/C (ms) der Firma Santa Cruz Biotechnology (#sc-3762418) (markiert mit Sekundärantikörper DL488 der Firma Millipore #AP192C) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden und Primärantikörper inkubiert wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Messbalken: 25 μ m.

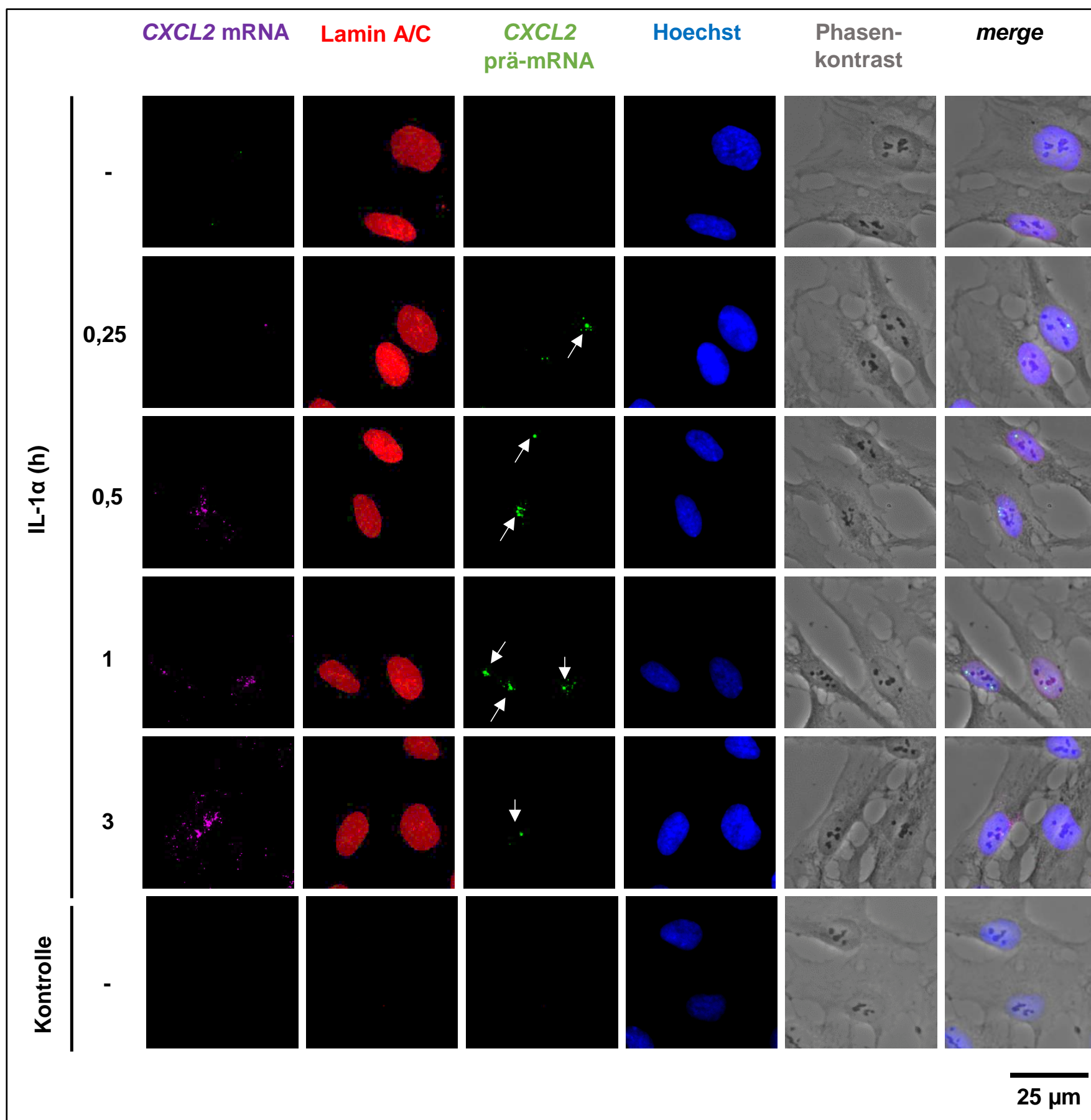


Abbildung 45: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für CXCL2 mRNA, CXCL2 prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.

hTERT-RPE-1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine Immuno-RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für CXCL2 mRNA (#VA4-3086648, type 4), und CXCL2 prä-mRNA (#VA6-6000438, type 6) und ein Primärantikörper gegen Lamin A/C (ms) der Firma Santa Cruz Biotechnology (#sc-3762418) (markiert mit Sekundärantikörper DL488 der Firma Millipore #AP192C) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden und Primärantikörper inkubiert wurden. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software. Messbalken: 25 μ m.

Im Ganzen stimmten die Morphologie, die Ergebnisse der Quantifizierung der IL8 und IL6 mRNA und prä-mRNA-Menge und die radialen Positionen der prä-mRNA-Signale mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen überein und werden daher nicht noch einmal genauer erläutert (vergleiche Kapitel 4.3.2, 4.3.3, 4.5.1, 4.5.2). Der Median, die Quartile sowie die Häufigkeitsverteilung der CXCL2-mRNA-Menge werden im Anhang unter Abbildung 62A,B als Violin Plot und Häufigkeitsverteilung dargestellt. In unbehandelten Zellen konnten im Mittel 0,9 CXCL2 mRNA-Signale pro Zelle detektiert werden. Nach IL-1-Stimulation stieg die mittlere CXCL2 mRNA-Menge zunächst leicht, auf 7 (Median: 2) nach 0,25h und 16 (Median: 6) nach 0,5h, und nach 1h signifikant auf im Mittel 67 Signale (Median: 69) pro Zelle (Dunnetts-Test, $p < 0,05$). Nach dreistündiger IL-1-Behandlung sank die mittlere CXCL2 mRNA-Menge wieder auf 41 Signale pro Zelle (Median: 23), war aber im Vergleich zu den unbehandelten Zellen weiterhin signifikant erhöht (Dunnetts-Test, $p < 0,05$). Damit war die durch IL-1 induzierte Expression

der mRNA für *CXCL2* deutlich geringer als für *IL8*. Jedoch war die Allgemeingültigkeit der Daten aufgrund der teilweise sehr kleinen Stichprobe fraglich.

Der zusätzliche Zeitpunkt nach 0,25h IL-1-Stimulation erbrachte keine weiteren Ergebnisse, die auf eine Veränderung der radialen Position der aktiven *IL8*-, *IL6*- und *CXCL2*-Genloci nach IL-1 schließen lassen würden und daher wird die radiale Position an dieser Stelle nicht weiter beleuchtet.

Ferner wurde die Kernfläche anhand der Markierung der Kernlamina A und C und der Hoechstfärbung erfasst (Abbildung Abb. 62C, D im Anhang). Die mittlere über die Markierung der Kernlamina A und C gemessene Kernfläche betrug $225,9 \mu\text{m}^2$ und unterschied sich, übereinstimmend mit den Versuchen in Kapitel 4.2 und abweichend von den Ergebnissen dargestellt in Kapitel 4.6.2, nicht signifikant von der Kernfläche der IL-1 behandelten Zellen (Dunnetts-Test, $p > 0,05$).

In Abbildung 46 werden die *Scatter Plots* der Korrelationen der Mengen der verschiedenen mRNAs mit der Kernfläche, die über die Markierung der Kernlamina ermittelt wurde, gezeigt, wobei darin die entsprechenden Korrelationskoeffizienten r nach Pearson vermerkt wurden. Abbildung 46A zeigt dabei die Korrelationen der *IL8* mRNA mit der Kernfläche, aus denen ein signifikanter mittelstarker Zusammenhang zwischen der Kernfläche und der *IL8* mRNA-Menge einer Zelle nach halbstündiger, einstündiger und dreistündiger IL-1-Stimulation hervorging (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p > 0,05$). In Abbildung 46B und C sind die *Scatter Plots* für die Korrelationen der *IL6* bzw. *CXCL2* mRNA gezeigt, woraus für beide Gene keine signifikanten Zusammenhänge erkennbar waren, wobei fraglich ist ob, dies für *CXCL2* auch an der kleinen Stichprobe gelegen haben könnte (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p < 0,05$). Der Nachweis des Zusammenhangs zwischen der *IL8* mRNA-Menge einer Zelle und ihrer, anhand markierter Kernlamina gemessenen, Kernfläche deutete darauf hin, dass der in Kapitel 4.6 beschriebene Zusammenhang nicht nur dadurch entstand, dass in der gesamten Zellpopulation nach IL-1-Behandlung anhand der Hoechst-Färbung größere Kernflächen gemessen wurden. Ferner wurde hiermit bestätigt, dass der Zusammenhang nur für die *IL8* mRNA zu beobachten war, während er bei der *IL6* oder der *CXCL2* mRNA nicht auftrat. Eine mögliche Erklärung für die putative Genspezifität dieses Zusammenhangs könnte die Größenordnung der mRNA-Menge sein. Dafür spricht, dass nach 1h, 3h und 6h IL-1-Stimulation im Mittel mehr als 200 *IL8* mRNA-Signale pro Zelle und für *IL6* und *CXCL2* deutlich weniger (im Mittel unter 100 mRNA-Signale) gezählt wurden.

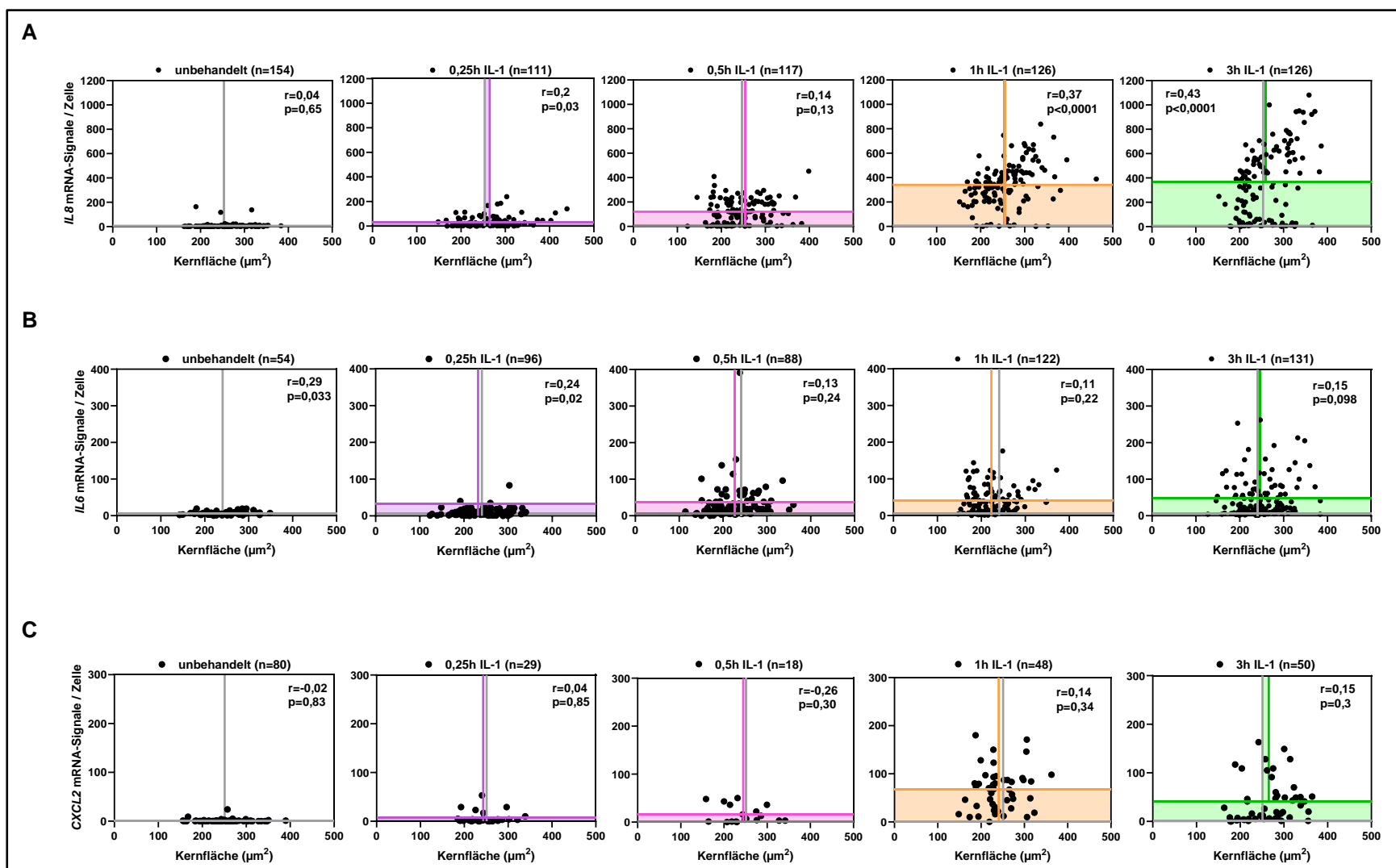


Abbildung 46: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Kernfläche und mRNA-Menge einer Zelle mittels Immuno-RNA-FISH.

A: Korrelation der *IL8* mRNA-Menge mit der Kernfläche mit Daten aus einem initialen Experiment für die mit IL-1 behandelten Populationen und mit mindestens 111 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = -0,12 - 0,19$; $CI(r(0,25\text{h})) = 0,02 - 0,38$; $CI(r(0,5\text{h})) = -0,04 - 0,32$; $CI(r(1\text{h})) = 0,21 - 0,51$; $CI(r(3\text{h})) = 0,28 - 0,56$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. **B:** Korrelation der *IL6* mRNA-Menge mit der Kernfläche mit Daten aus einem initialen Experiment mit mindestens 54 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = 0,2 - 0,52$; $CI(r(0,25\text{h})) = 0,04 - 0,42$; $CI(r(0,5\text{h})) = -0,09 - 0,33$; $CI(r(1\text{h})) = -0,07 - 0,29$; $CI(r(3\text{h})) = -0,03 - 0,31$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $p = 0,05$. **C:** Korrelation der *CXCL2* mRNA-Menge mit der Kernfläche mit Daten aus einem initialen Experiment mit mindestens 80 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = -0,12 - 0,19$; $CI(r(0,25\text{h})) = 0,02 - 0,38$; $CI(r(0,5\text{h})) = -0,04 - 0,32$; $CI(r(1\text{h})) = 0,21 - 0,51$; $CI(r(3\text{h})) = 0,28 - 0,56$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

der Kernfläche mit Daten aus einem initialen Experiment mit mindestens 18 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = -0,24 - 0,20$; $CI(r(0,25\text{h})) = -0,33 - 0,40$; $CI(r(0,5\text{h})) = -0,65 - 0,24$; $CI(r(1\text{h})) = -0,15 - 0,40$; $CI(r(3\text{h})) = -0,14 - 0,40$. Durchführung des t-Test für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $p=0,05$.

4.7.2 Validierung der Ergebnisse mittels 3D RNA-FISH

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse bezüglich der Kerngröße nach IL-1-Stimulation, sowie um die gesammelten Befunde zu stützen, wurden abschließend 3D RNA-FISH-Experimente mit Sonden für *IL8* mRNA und prä-mRNA, *IL6* mRNA und prä-mRNA sowie für *CXCL2* prä-mRNA durchgeführt, wobei das Kernvolumen anhand der in die DNA interkalierenden Hoechst-Färbung gemessen wurde. Auch in diesen Versuchen wurden die Zellen, mit dem Ziel mehr Informationen über die Position der aktiven Genloci und ihre Distanzen zueinander zu erhalten, zuvor über 0,25h, 0,5h, 1h und 3h mit IL-1 α stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Erstellung dreidimensionaler Mikroskopaufnahmen erfolgte mit dem Dmi8 *automated* Mikroskop von Leica und der LASX-Software, welche pro Bild eine Sequenz aus 60 Aufnahmen im Abstand von 500 nm über eine vertikale Strecke von 30 μm erzeugte und diese Einzelschichten zu einem z-Stapel zusammensetzte. Die durch Streulicht verursachte Unschärfe wurde durch die Anwendung der *blind deconvolution* reduziert.

In Abbildung 47 sind repräsentative Zellen aller Bedingungen und für beide Sondenkombinationen gezeigt, anhand derer die Analyse der mRNA-Menge pro Zelle mit der Icy Bioimaging Software aus der schärfsten Ebene erfolgte. Diese Auswertemethode wurde gewählt, da die dreidimensionalen Zellumrisse in der LASX-Software nicht gut zu erkennen waren und die Anzahl, Größe und Form der mRNA-Signale durch die, für die Auswertung der prä-mRNA-Signale und Kerngröße benötigte, *deconvolution* stark verändert wurde. Die hTERT-RPE1-Zellen zeigten in beiden Ansätzen einen unauffälligen Phänotyp und waren adhärent und mäßig dicht gewachsen. Die *IL8* mRNA stellt sich als violette kleine Punkte dar. In den unbehandelten Zellen sowie nach viertelstündiger IL-1 Behandlung kam so gut wie keine *IL8* mRNA vor. In den Zellen, die über 0,5h mit IL-1 behandelt worden waren, waren geringe Mengen *IL8* mRNA-Signale zu sehen, die sich vor allem in der Nähe der Zellkerne befanden. Nach einstündiger IL-1 Behandlung war *IL8* mRNA in den meisten Zellen über die gesamte Fläche der Zelle verteilt und erreichte ihr Maximum. Nach 3h IL-1 Stimulation nahm die *IL8* mRNA-Menge insgesamt wieder ab, war aber immer noch über die gesamte Zelle verteilt. Außerdem zeigte die Gesamtpopulation ein inhomogeneres Muster aus Zellen mit mehr oder weniger *IL8* mRNA-Signalen. Im Ansatz mit der Sonde für *IL6*-mRNA zeigte sich auch diese mRNA als violette Punkte, die sowohl in den Zellen, die unbehandelt belassen, als auch in denen die 0,25h mit IL-1 behandelt worden waren kaum vorkamen. Nach 0,5h IL-1 Stimulation stieg die Zahl der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle an und blieb auch zu späteren Zeitpunkten relativ ähnlich. Die FISH-Kontrolle zeigte keine unspezifischen violetten Signale.

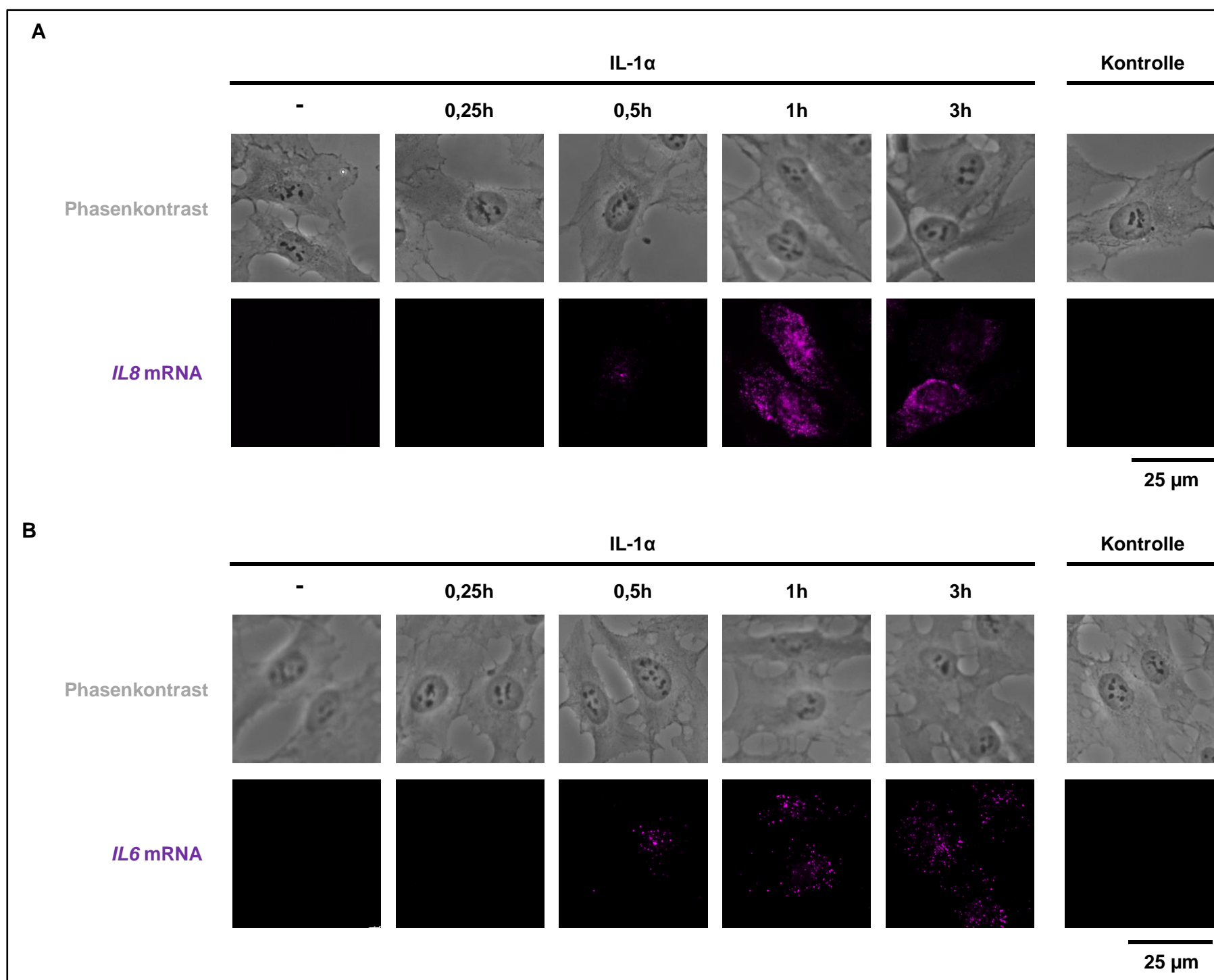


Abbildung 47: Repräsentative Zellen angefärbt mit RNA-FISH, mikroskopiert in 3D und dargestellt in der schärfsten Ebene

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Sondenkombinationen verwendet: **A:** Sonden der Firma Affymetrix für *IL8* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) und *CXCL2* prä-mRNA (#VA4-6001010, type 4) verwendet. **B:** Sonden der Firma Affymetrix für *IL6* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL6* prä-mRNA (#VA4-6001007; type 4) und *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) verwendet. In beiden Replikaten wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienen unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der 3D-Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software entlang der z-Achse über eine Strecke von 30 μ m im Abstand von je 500nm. Dargestellt sind repräsentative Zellen und ihre mRNA-Signale in der schärfsten Ebene für beide Sondenkombinationen. Messbalken: 25 μ m.

In den Abbildungen 48 bis 49 werden repräsentative, mit Hoechst angefärbte Zellkerne, sowie die dazugehörigen *IL8* mRNA-, *IL8* prä-mRNA- und *CXCL2* mRNA-Signale für verschiedene Bedingungen aus unterschiedlichen Perspektiven gezeigt. Die Zellkerne zeigten sowohl ohne als auch nach IL-1-Behandlung eine flache, ovale Form, wobei die Intensität der Hoechstfärbung zwischen einzelnen Kernen einer Aufnahme sichtlich variierte. In unbehandelten Zellen konnten weder *IL8* mRNA- noch prä-mRNA-Signale beobachtet werden. Nach IL-1-Behandlung wurden *IL8* mRNA-Signale für alle Zeitpunkte sichtbar, traten jedoch in geringerer Zahl auf als in 2D Darstellung ohne *deconvolution*. Besonders nach 0,25h und 0,5h IL-1-Behandlung konnten *IL8* und *CXCL-2* prä-mRNA-Signale detektiert werden, wobei pro Zelle ein bis zwei größere und hellere sowie multiple kleinere und schwächere Signale zu sehen waren. Für die Auswahl der spezifischen prä-mRNA-Signale (und damit aktiven Genorte) wurde die Fluoreszenzintensität und die Größe (Voxel) der Fluoreszenzsignale herangezogen. In der FISH-Kontrolle, für die unbehandelte Zellen ohne Sonden inkubiert worden waren, waren meist keine und selten sehr kleine FISH-Signale zu sehen.

In Abbildung 50 und 51 werden repräsentative Zellkerne, sowie die dazugehörigen *IL6* mRNA, *IL6* prä-mRNA und *IL8* prä-mRNA-Signale für alle Bedingungen aus unterschiedlichen Perspektiven gezeigt. Auch in diesem Fall zeigten sich die Zellkerne flach und oval für alle Bedingungen. In der unbehandelten Population waren fast keine *IL6* mRNA- und *IL6* prä-mRNA-Signale und keine *IL8* prä-mRNA-Signale zu sehen. Nach der IL-1-Behandlung traten häufiger, wenige *IL6* mRNA-Signale auf. Auch *IL6* und *IL8* prä-mRNA-Signale konnten in den mit IL-1 behandelten Zellkernen beobachtet werden, wobei abermals maximal zwei große helle Signale und multiple kleinere Signale pro

Zelle zu erkennen waren. Auch für die Bestimmung der spezifischen *IL6* prä-mRNA-Signale war die Fluoreszenzintensität und die Signalgröße (Voxel) entscheidend. Für die Kontrolle wurden unbehandelte Zellen ohne Sonden inkubiert, woraufhin meist keine oder selten sehr kleine FISH-Signale erkannt werden konnten.

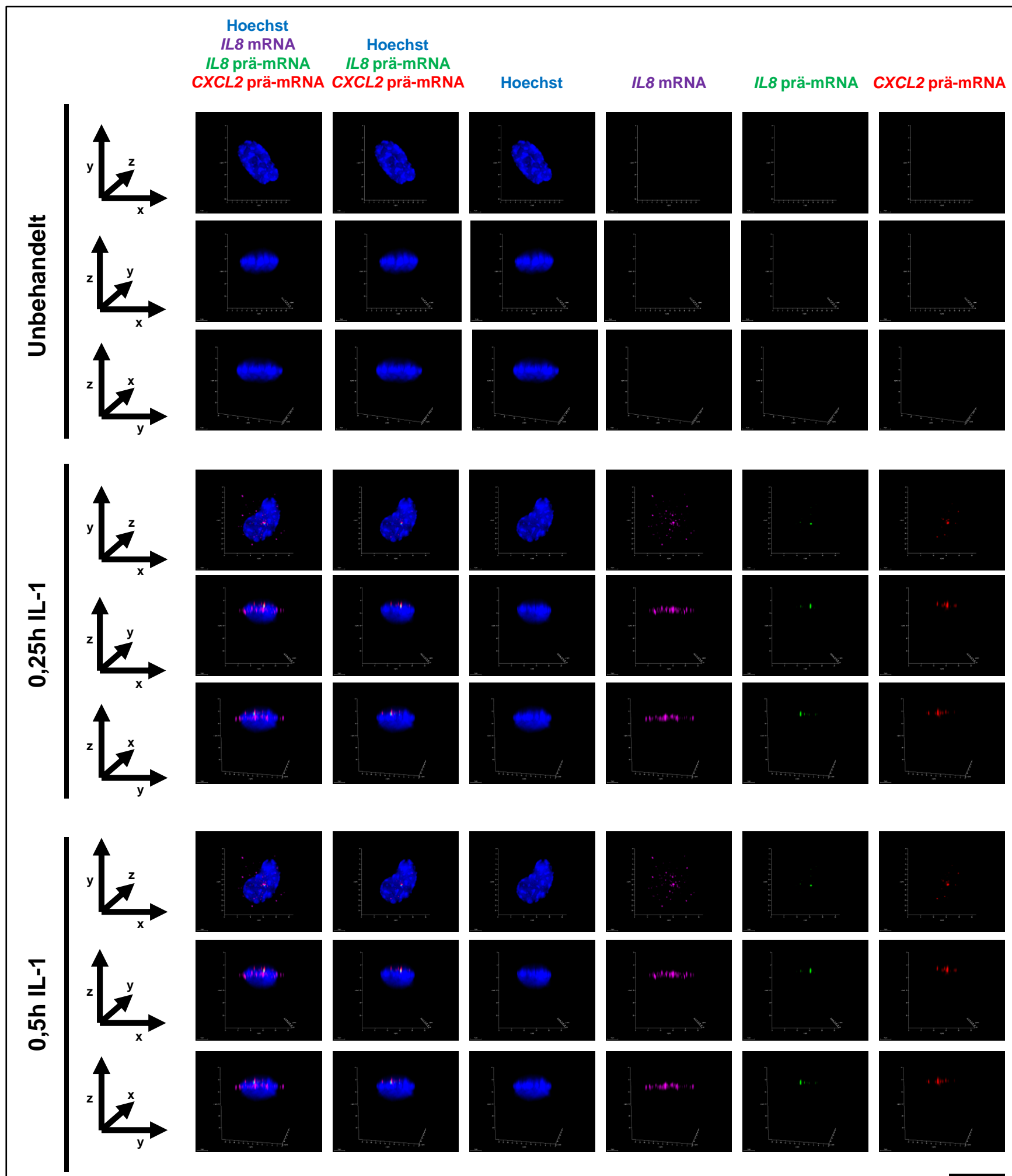


Abbildung 48: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA und *CXCL2* prä-mRNA I

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL8* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) und *CXCL2* prä-mRNA (#VA4-6001010, type 4) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der 3D-Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software entlang der z-Achse über eine Strecke von 30 μ m im Abstand von je 500nm. Es wurden Falschfarben verwendet, sodass die *IL8* mRNA violett, die *IL8* prä-mRNA grün und die *CXCL2* prä-mRNA rot erschien, um Kollokalisierungen der *IL8* prä-mRNA mit der korrespondierenden mRNA leichter erkennen zu können. Dargestellt sind die Zellkerne repräsentativer Zellen aus den links angezeigten Perspektiven für die ersten drei Bedingungen (unbehandelt, 0,25h IL-1, 0,5h IL-1). Messbalken: 25 μ m.

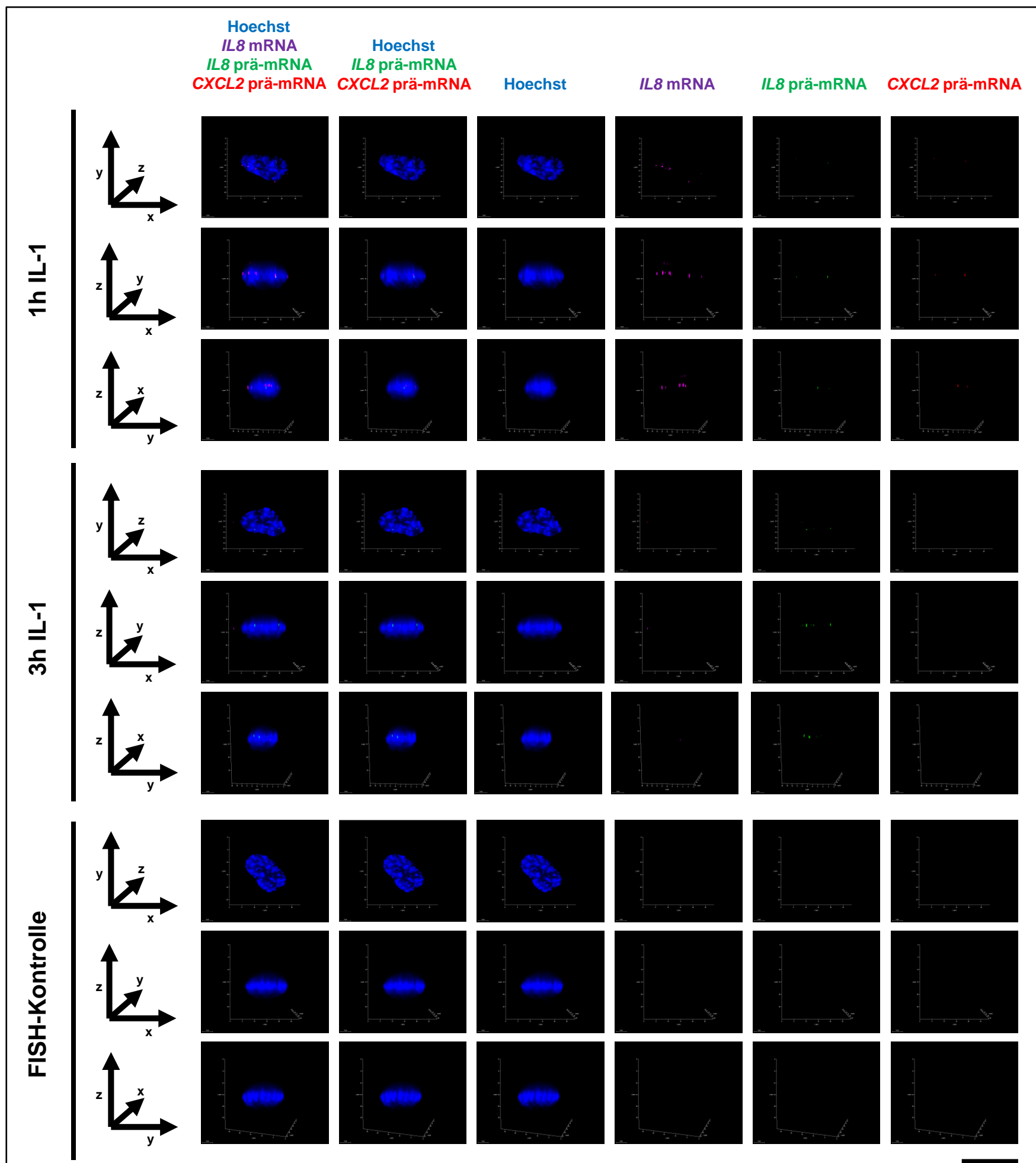


Abbildung 49: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL8* mRNA, *IL8* prä-mRNA und *CXCL2* prä-mRNA II

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL8* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) und *CXCL2* prä-mRNA (#VA4-6001010, type 4) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der 3D-Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software entlang der z-Achse über eine Strecke von 30 μ m im Abstand von je 500nm. Es wurden Falschfarben verwendet, sodass die *IL8* mRNA violett, die *IL8* prä-mRNA grün und die *CXCL2* prä-mRNA rot erschien, um Kolkalisationen der *IL8* prä-mRNA mit der korrespondierenden mRNA leichter erkennen zu können. Dargestellt sind die Zellkerne repräsentativer Zellen aus den links angezeigten Perspektiven für die letzten beiden Bedingungen (1h IL-1, 3h IL-1). Messbalken: 25 μ m.

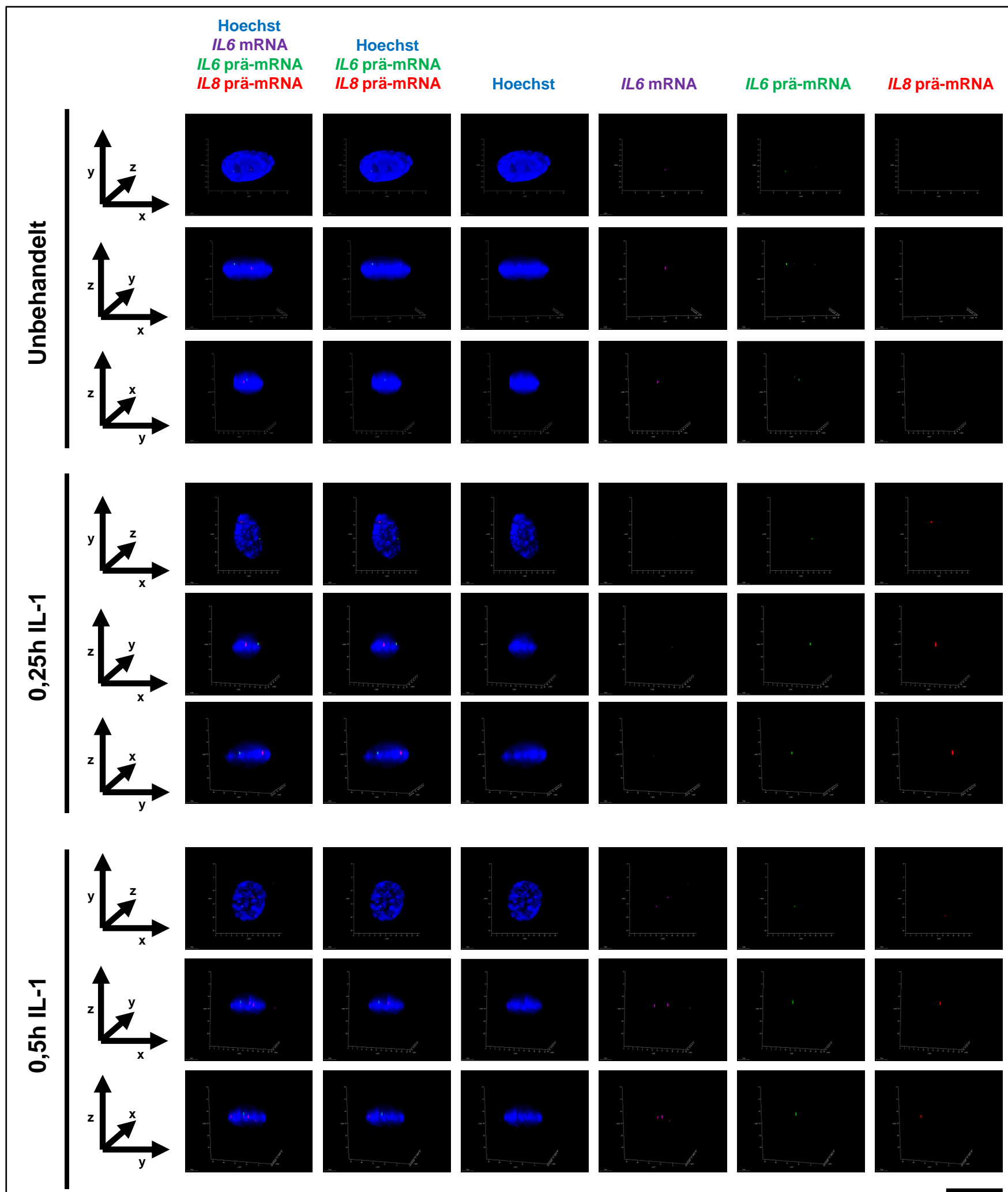


Abbildung 50: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL6* mRNA, *IL6* prä-mRNA und *IL8* prä-mRNA I

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL6* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL6* prä-mRNA (#VA4-6001007; type 3) und *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienen unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der 3D-Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software entlang der z-Achse über eine Strecke von 30 μ m im Abstand von je 500nm. Dargestellt sind die Zellkerne präsentativer Zellen aus den links angezeigten Perspektiven für die ersten drei Bedingungen (unbehandelt, 0,25h IL-1, 0,5h IL-1). Messbalken: 25 μ m.

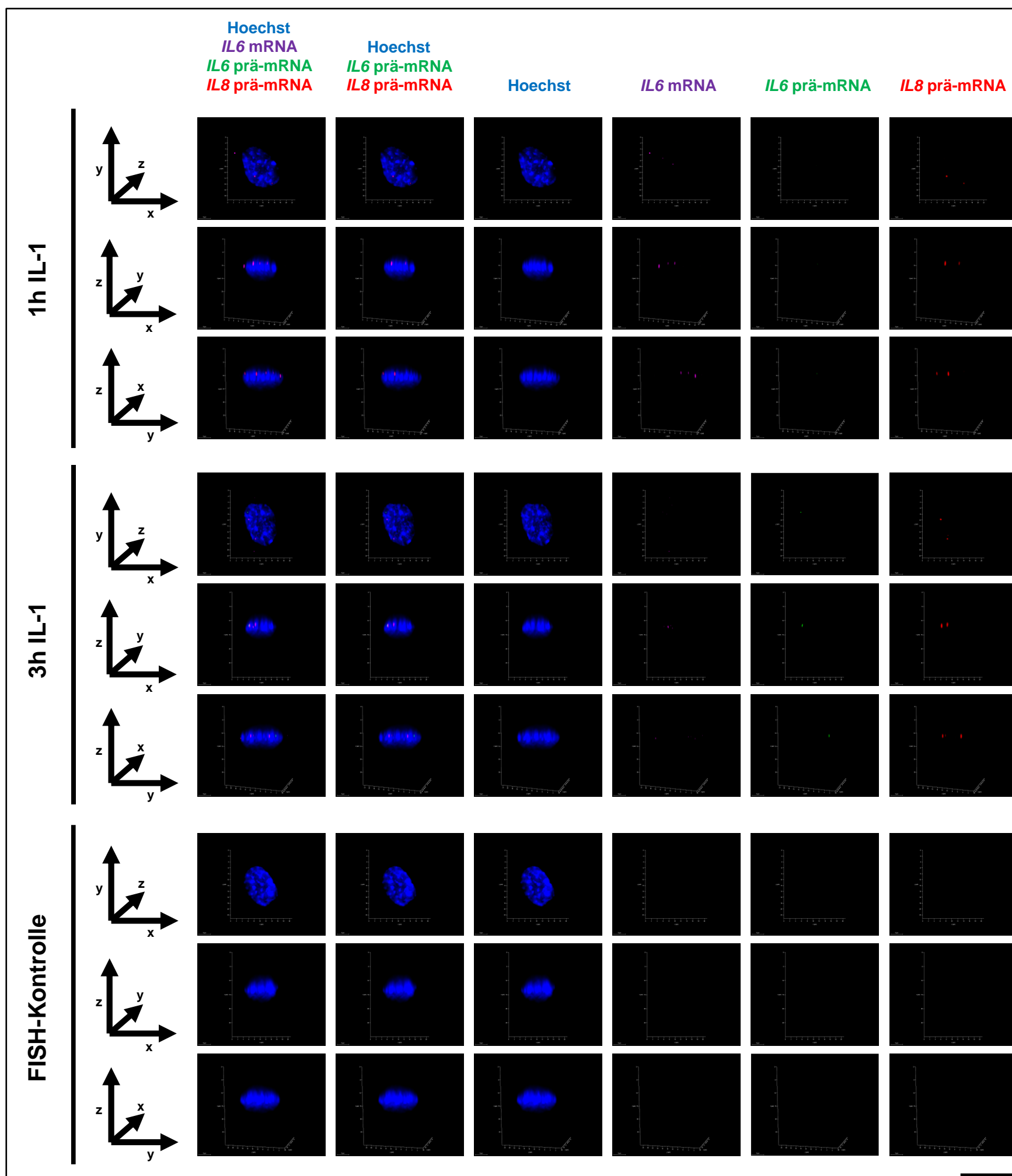


Abbildung 51: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für *IL6* mRNA, *IL6* prä-mRNA und *IL8* prä-mRNA II

hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und nach einem Tag für unterschiedliche Zeiten mit IL-1 α behandelt oder unbehandelt belassen. Nach Fixierung der Zellen bei 4 °C über Nacht wurde eine RNA-FISH durchgeführt. Dabei wurden Sonden der Firma Affymetrix für *IL6* mRNA (#VA6-13192; type 6), *IL6* prä-mRNA ((#VA4-6001007; type 3) und *IL8* prä-mRNA (#VA1-6000437; type 1) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Als FISH-Kontrolle dienten unbehandelte Proben, welche ohne Sonden inkubiert wurden. Die Aufnahme der 3D-Bilder erfolgte mit dem Dmi8 Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit der LASX-Software entlang der z-Achse über eine Strecke von 30 μ m im Abstand von je 500nm. Dargestellt sind die Zellkerne repräsentativer Zellen aus den links angezeigten Perspektiven für die letzten zwei Bedingungen (1h, 3h IL-1) und die Kontrolle. Messbalken: 25 μ m.

Zunächst wurde das Kernvolumen über die Hoechst-Färbung erfasst, da anhand der Kernfläche bisher keine konsistente Antwort auf die Fragestellung, nach einer signifikanten Veränderung der Kerngröße nach der Behandlung von hTERT-RPE1-Zellen mit IL-1, gefunden werden konnte. Der Median, die Quartile und die Häufigkeitsverteilung des Kernvolumens werden in Abbildung 52A als *Violin Plot* visualisiert. Unbehandelte Zellen besaßen im Mittel Kerne mit einem Volumen von 1597 μ m³ (Median: 1572 μ m³), wobei 50 % der Kerne

ein Volumen zwischen $1284 \mu\text{m}^3$ und $1906 \mu\text{m}^3$ zeigten. Nach viertelstündiger IL-1-Behandlung fiel das mittlere Volumen der Zellkerne signifikant auf $1517 \mu\text{m}^3$ (Median: $1485 \mu\text{m}^3$), um nach 0,5h noch weiter signifikant auf $1489 \mu\text{m}^3$ (Median: $1441 \mu\text{m}^3$) zu sinken (Dunnetts-Test, $p < 0,05$). Nach einstündiger IL-1-Behandlung war das mittlere Kernvolumen mit $1513 \mu\text{m}^3$ (Median: $1469 \mu\text{m}^3$) weiterhin signifikant niedriger als in der unbehandelten Population, nach 3h bestand kein signifikanter Unterschied (Dunnetts-Test, $p > 0,05$). Die relative Häufigkeitsverteilung der Kernvolumina wird in Abbildung 52B gezeigt. Die Daten ähnelten einer Log-Normalverteilung und wurden in dieses Modell eingepasst. Die Kernvolumina zeigten ohne IL-1-Behandlung am häufigsten (21 % der Zellen) Werte zwischen $1600 \mu\text{m}^3$ und $1800 \mu\text{m}^3$ und für alle anderen Bedingungen zwischen $1200 \mu\text{m}^3$ und $1400 \mu\text{m}^3$ (18-22 % der Zellen). Diese deutlich kleineren Kernvolumina zeigten sich auch in einer leichten Linksverschiebung der Verteilungen der Kernvolumina nach IL-1-Behandlung im Gegensatz zu unbehandelten Zellen.

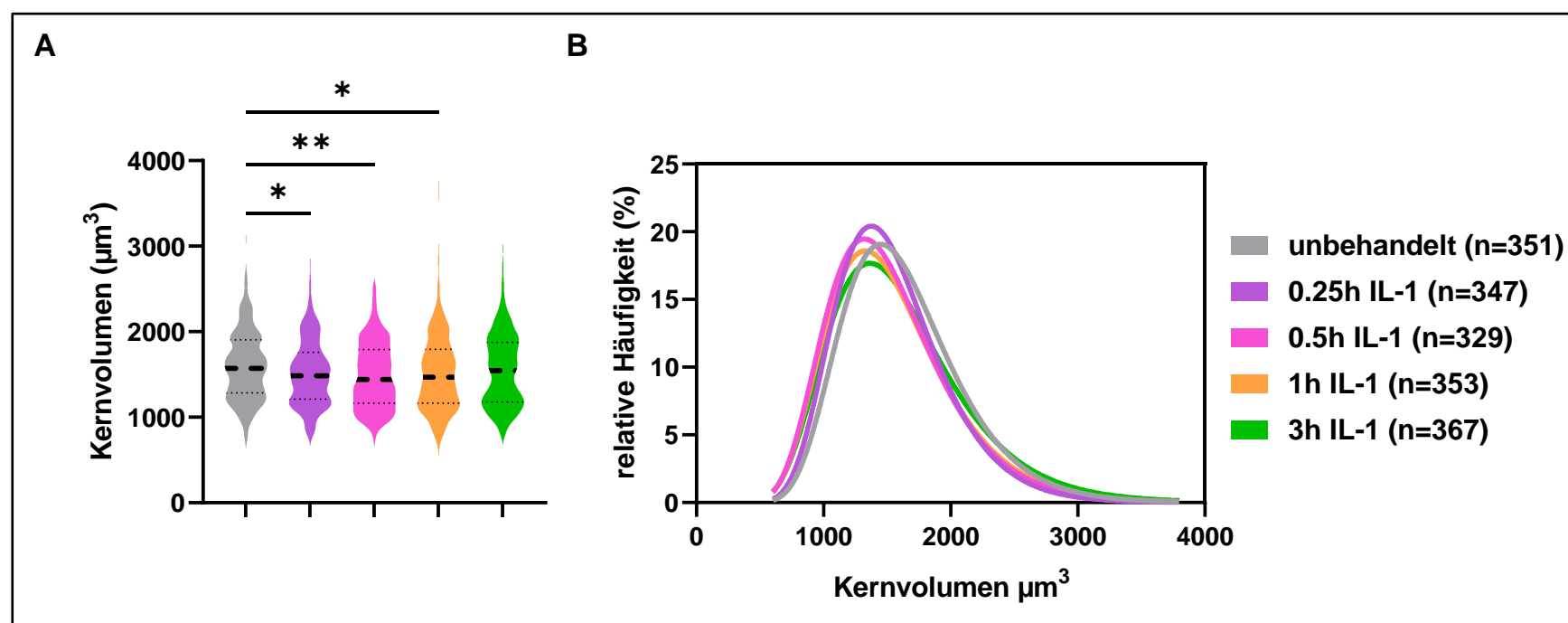


Abbildung 52: Kernvolumen von hTERT-RPE1-Zellen ermittelt über die Hoechst-Färbung in 3D RNA-FISH.

A: Darstellung der Mediane, Quartile und der Häufigkeitsverteilung des Kernvolumens in einem *Violin Plot* aus 2 biologischen und je 2 technischen Replikaten in den Gesamtpopulationen von mindestens 329 Zellen pro Bedingung. Mittels Dunnett's Test wurden die Mittelwerte der behandelten Populationen gegen die der unbehandelten Population mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet. signifikante Ergebnisse sind wie folgt gekennzeichnet: **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der Kernvolumina als in die Log-Normalverteilung gefittete Kurven. Zusammenfassung der Daten aus 2 biologischen und je 2 technischen Replikaten mit Gesamtpopulationen von mindestens 329 Zellen.

Die beobachtete Abnahme des Zellkernvolumens widersprach sowohl den zuvor in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen als auch den Vorbefunden der Arbeitsgruppe, die in einer 3D DNA-FISH-Analyse, anhand der Hoechst-Färbung, erhoben worden waren (unveröffentlichte Daten). Da bei der Betrachtung der Zellkerne eine variierende Intensität der Hoechstfärbung aufgefallen war, stellte sich die Frage, ob in der variierenden Hoechst-Färbung die Ursache für die kleinen, aber signifikanten Unterschiede zwischen den Kernvolumina bestand. Eine Ursache für die Variation der Hoechst-Färbung zwischen verschiedenen Zellkernen könnte die Interkalierung des Hoechst in die DNA sein. Damit zusammenhängend zeigte die Arbeitsgruppe um Tom Misteli, dass die Intensität von in die DNA-interkalierenden Farbstoffen wie DAPI oder Hoechst, mit der DNA-Menge einer Zelle und damit mit ihrer Stellung im Zellzyklus zusammenhängt. Die Arbeitsgruppe entwickelte eine Methode nach der die Phase des Zellzyklus, in der sich eine Zelle gerade befindet, anhand der Intensität der Hoechstfärbung ermittelt werden kann (Roukos et al. 2015). Mithilfe dieser Methode wurden die Zellzyklusphasen der einzelnen Zellen ermittelt (Herleitung der Fluoreszenzgrenzen für die Zellzyklusphasen in Abbildung 63 im Anhang) und die Kernvolumina beziehungsweise die *IL8* und *IL6* mRNA-Mengen der Zellen getrennt nach den Zellzyklusphasen dargestellt (Abb. 53A-C). Hieraus war ersichtlich, dass unbehandelte Zellen in G1-Phase im Mittel einen Zellkern mit einem Volumen von $1311 \mu\text{m}^3$ besaßen, wohingegen das Kernvolumen unbehandelter Zellen in S-Phase im Mittel $1505 \mu\text{m}^3$ und in G2-Phase $1933 \mu\text{m}^3$ betrug und damit signifikant größer war (Sidak-Test, $p=0,05$). Auch für die anderen Zeitpunkte konnten signifikant größere Zellkerne in S- und G2-Phase gezeigt werden. Dies wurde bereits mehrfach beschrieben und beruht auf der Synthese der Schwesterchromatiden während der S-Phase (Huber und Gerace 2007). Dass der bekannte Zusammenhang zwischen Kerngröße und DNA-Menge einer Zelle mit der hier verwendeten Methode gezeigt werden konnte, zeigt ein weiteres Mal, dass die verwendete Methodik in der Lage ist, definierte Veränderungen der mittleren Kerngröße bestimmter Populationen nachzuweisen.

Weiterhin wurde nach ein- und dreistündiger IL-1-Behandlung in Zellen, die sich in S-Phase befanden, signifikant mehr *IL8* mRNA transkribiert, und Zellen in G2-Phase exprimierten nach 3h ebenfalls signifikant mehr *IL8* mRNA (Sidaks-Test, $p < 0,05$). Für *IL6* war der Unterschied umgekehrt, so exprimierten Zellen in G1-Phase nach 1h und 3h (nach 3h im Mittel 63 *IL6* mRNA-Signale) signifikant mehr *IL6* mRNA als Zellen in G2-Phase (42 Signale) (Sidak's-Test, $p < 0,05$).

Anschließend wurde die Zusammensetzung der Populationen der einzelnen Bedingungen aus den verschiedenen Zellzyklusphasen in Tortendiagrammen visualisiert, um zu ermitteln, ob sich die Zellpopulationen in ihrer Zusammensetzung voneinander unterschieden (Abb. 53D). Dabei zeigte sich, dass die unbehandelte Population zu 32 % aus Zellen in G1-Phase, zu 30 % in S-Phase und zu 38 % in G2-Phase bestand. Im Gegensatz dazu bestanden die behandelten Populationen zu mehr als 50 % aus Zellen in G1-Phase, zu 16 % bis 21 % aus Zellen in S-Phase und zu 25 % bis 33 % aus Zellen in G2-Phase. Da also die behandelten Populationen zu größeren Anteilen aus Zellen bestanden, die im Rahmen des Zellzyklus einen kleineren Zellkern besaßen als die unbehandelte Population, ist es möglich, dass diese unterschiedliche Zusammensetzung zu signifikanten Unterschieden der mittleren Kernvolumina führte. Dies unterstreicht, dass mehrere Faktoren auf den Zellkern und seine Größe einwirken, die in den Experimenten nicht alle konstant gehalten werden konnten, sodass die abweichenden Ergebnisse der Kerngrößenmessungen durch diese Störfaktoren hervorgerufen worden sein könnten.

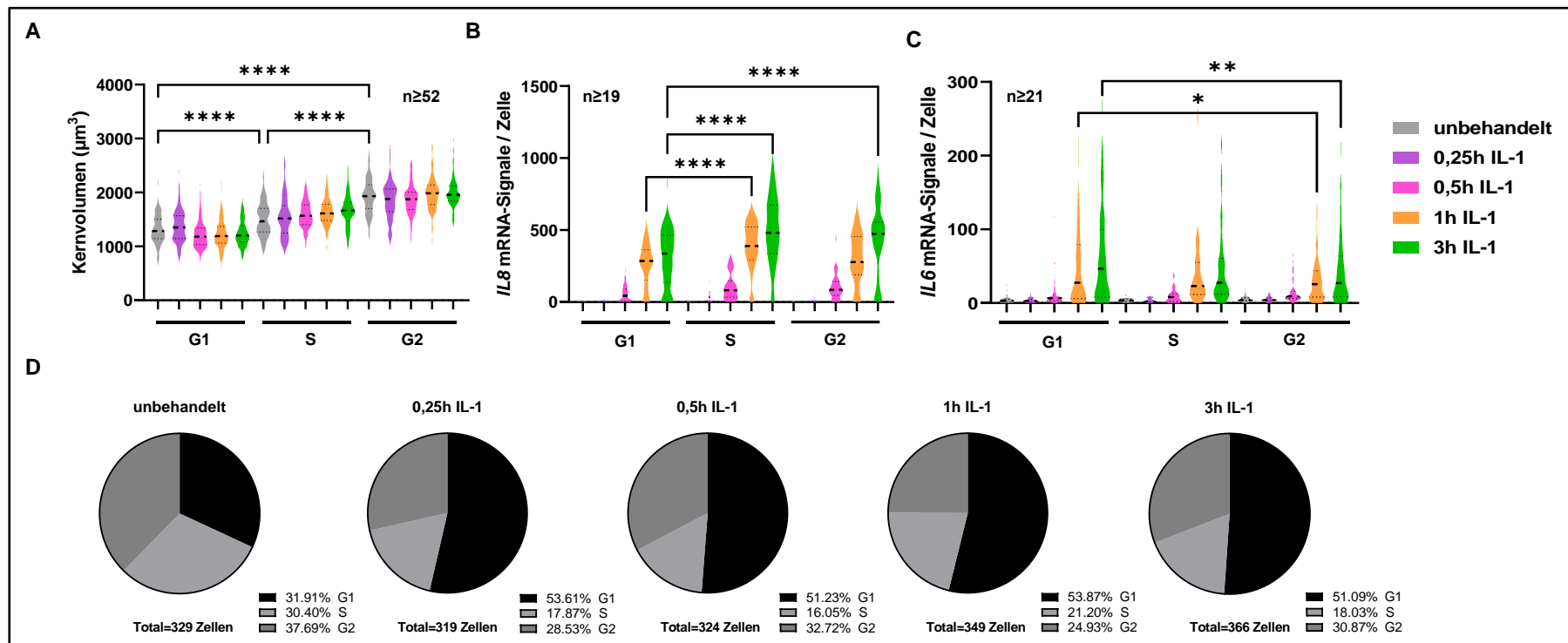


Abbildung 53: Betrachtung des Kernvolumens und der mRNA-Menge unter Berücksichtigung der Zellzyklusphase.

Bestimmung der Zellzyklusphasen der einzelnen Zellen über die Intensität der Hoechstfärbung. **A:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung des Kernvolumens nach IL-1-Stimulation über verschiedene Zeitintervalle und in unbehandelten Zellen getrennt nach den Zellzyklusphasen der Zellen mit Daten aus 2 technischen und zwei biologischen Replikaten und mindestens 52 Zellen pro Bedingung. Vergleich der Kernvolumina in G1-Phase, S-Phase und G2-Phase derselben Stimulationsbedingungen mit dem Sidak's-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Exemplarisch sind die signifikanten Unterschiede, die zwischen den unbehandelten Populationen gemessen wurden, dargestellt. Das gleiche Signifikanzniveau erreichten entsprechende Vergleiche für alle anderen Zeitpunkte. ****: $p<0,0001$. **B:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der *IL8* mRNA-Menge nach IL-1-Stimulation über verschiedene Zeitintervalle und in unbehandelten Zellen getrennt nach den Zellzyklusphasen der Zellen mit Daten aus 2 unabhängigen Experimenten und mindestens 19 Zellen pro Bedingung. Vergleich der *IL8* mRNA-Menge in G1-Phase, S-Phase und G2-Phase derselben Stimulationsbedingungen mit dem Sidak's-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. ****: $p<0,0001$. **C:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung des *IL6* mRNA-Menge nach IL-1-Stimulation über verschiedene Zeitintervalle und in unbehandelten Zellen getrennt nach den Zellzyklusphasen der Zellen mit Daten aus 2 unabhängigen Experimenten und mindestens 21 Zellen pro Bedingung. Vergleich der *IL6* mRNA-Menge in G1-Phase, S-Phase und G2-Phase derselben Stimulationsbedingungen mit dem Sidak's-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. **: $p<0,01$; *: $p<0,05$. **D:** Darstellung der Zusammensetzung der Zellpopulation aus den verschiedenen Zellzyklusphasen für die Stimulationsbedingungen als Tortendiagramm mit Daten aus 2 technischen und zwei biologischen Replikaten.

Analog zur Auswertung der 2D RNA-FISH wurde im Folgenden betrachtet, in wie vielen Zellen ohne und nach der IL-1-Behandlung aktive *IL8*-, *CXCL2*- oder *IL6*-Genloci detektiert werden konnten. Der Anteil der Zellen mit aktiven Genloci für *IL8* und *IL6* bestätigte die Ergebnisse aus der zweidimensionalen Darstellung und wird daher nur im Anhang unter Abbildung 61 gezeigt. In Abbildung 54A wird der Anteil der Zellen mit und ohne *IL8*- oder *CXCL2*-prä-mRNA-Signale für die verschiedenen Bedingungen dargestellt. In der unbehandelten Population kamen nur in 8,50 % der Zellen aktive *IL8*- oder *CXCL2*-Genloci vor. Nach der IL-1-Behandlung stieg der Anteil der Zellen, die aktive Genloci dieser Gene enthielten, zunächst auf 21,34 % nach 0,25h und erreichte dann das Maximum nach 0,5h mit 60,43 % der Zellen. Danach sank der Anteil der Zellen, die aktive *IL8*- oder *CXCL2*-Genloci enthielt, wieder auf 50,34% nach 1h und 53,85 % nach 3h. Abbildung 54B zeigt wie häufig die aktiven Genloci der beiden Gene einzeln oder in Kombination miteinander in den einzelnen Zellen detektiert wurden. In den unbehandelten Zellen wurden nur *IL8*-Genloci gefunden. Nach viertelstündiger IL-1-Behandlung hatte sich der Anteil der Zellen mit aktiven *IL8*-Genloci mehr als verdoppelt, wobei in 19,51 % der Zellen monoallelische *IL8*-Expression beobachtet wurde. Aktive Genloci für *CXCL2* oder beide Gene konnten nur vereinzelt dokumentiert werden. Auch nach halbstündiger Stimulation mit IL-1 wurde die Genaktivität zu 56,83 % durch *IL8* vermittelt und nur zu 10,80 % durch *CXCL2*, wobei der Anteil der aktiven *CXCL2*-Genloci damit sein Maximum erreichte und zu den späteren Zeitpunkten wieder sank. Der Anteil der aktiven *IL8*-Loci sank nach 1h und 3h ebenfalls leicht, belief sich aber auch nach dreistündiger IL-1-Stimulation auf insgesamt 50,55 % der Zellen. Diese Verteilung passt gut zu dem beobachteten Unterschied zwischen der *IL8* und *CXCL2* mRNA-Menge, so wurden nach 1h IL-1 Stimulation im Mittel 456 *IL8*-mRNA-Signale (vgl. Kapitel 4.3.3), aber nur 67 *CXCL2* mRNA-Signale detektiert (vgl. Kapitel

4.7.2). Ferner war zu beobachten, dass nach 0,5h, 1h und 3h IL-1-Behandlung der Anteil der Zellen in denen nur aktive *CXCL2*-Genloci detektiert wurden mit beispielsweise 3,6 % nach 0,5h, geringer war als der Anteil der Zellen in denen sowohl aktive *CXCL2*-Loci als auch aktive *IL8*-Genloci entdeckt wurden (7,2 % nach 0,5h). Dies könnte ein Hinweis auf eine Koregulation der beiden Genloci sein.

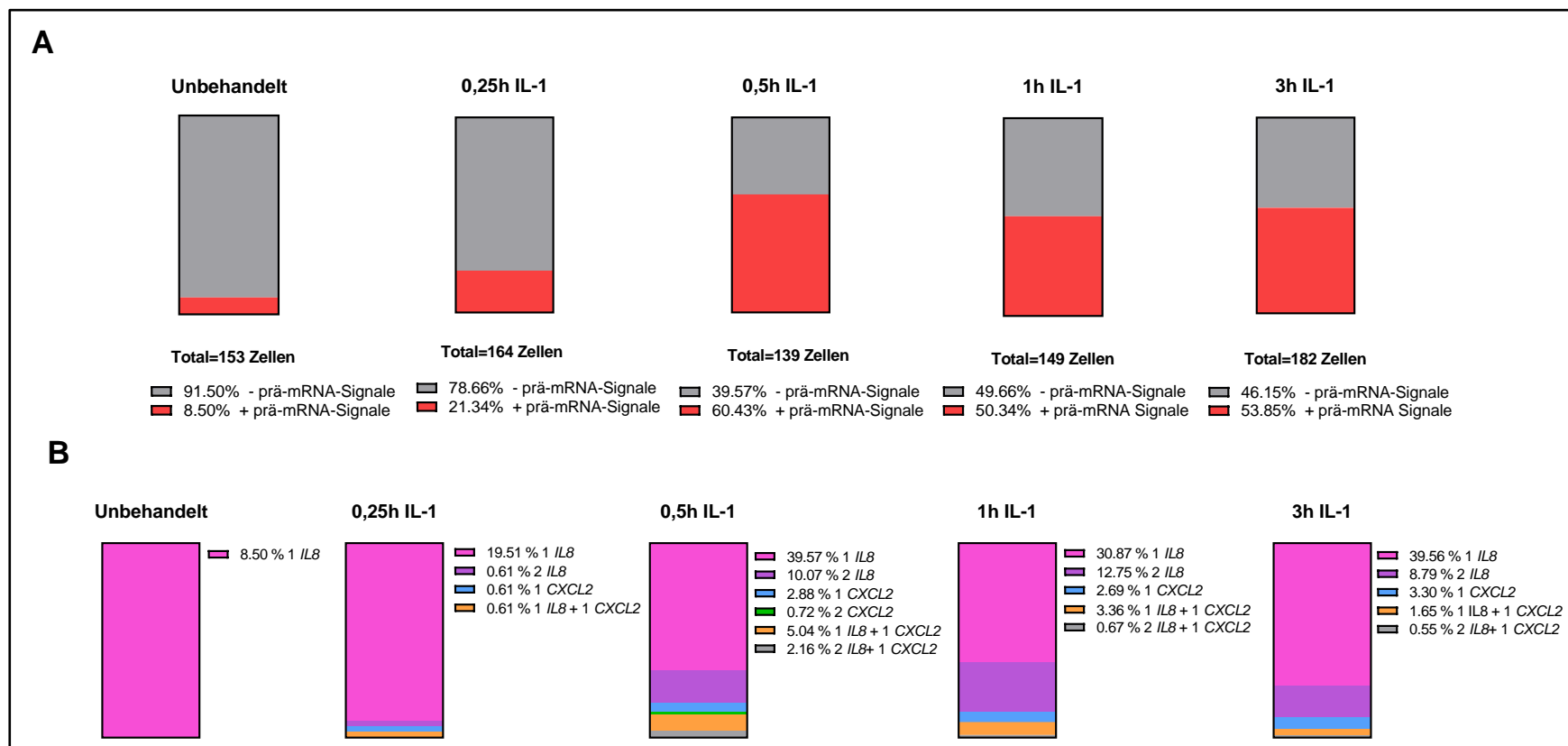


Abbildung 54: Quantifizierung der aktiven Genloci für *IL8* und *CXCL2* relativ zur Gesamtpopulation.

A: Darstellung des relativen Anteils (%) der Zellen mit (+) und ohne (-) prä-mRNA Signale für *IL8* oder *CXCL2* von der Gesamtpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation aus 2 unabhängigen Experimenten für mindestens 139 Zellen pro Bedingung. **B:** Darstellung des Vorkommens verschiedener Kombinationen aktiver *IL8* und *CXCL2* Genloci innerhalb einer Zelle als Anteil von der Gesamtpopulation (%).

Weiterhin wurden die X-, Y- und Z-Koordinaten der prä-mRNA-Signale, sowie der Zellkerne in der 3D RNA-FISH ermittelt, um die Distanzen der aktiven Genloci zueinander zu ermitteln. Anstatt der radialen Position der aktiven Genloci wurde ihre Distanz zum Kernzentrum gemessen, da die Kernperipherie in 3D schlecht zu determinieren ist (Finn et al. 2017). Die Distanzen wurden, für den Vergleich von Distanzen, die in Zellkernen unterschiedlicher Größe gemessen wurden, als prozentualer Anteil des jeweiligen Kernvolumens angegeben. Die daraus resultierenden Mediane, Quartile und Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Distanzen sind im Anhang unter Abbildung 62 gezeigt. Allerdings war die Stichprobe der Distanzen, die zwischen zwei aktiven *IL6*- bzw. *CXCL2*-Genloci gemessen werden konnten so klein, dass auf einen Vergleich verzichtet wurde. Im Übrigen war ein Vergleich mit den Distanzen, die in behandelten Zellen gemessen worden waren mit denen, die in unbehandelten Zellen ermittelt wurden nur für die Distanzen der aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci zum Kernzentrum sinnvoll möglich. Auch bei der Beurteilung der intrachromosomalen Distanzen zwischen aktiven *IL8*- und *CXCL2*-Loci und der interchromosomalen Distanzen zwischen *IL8*- und *IL6*-Genloci sollten die kleinen Stichproben berücksichtigt werden. Insgesamt ergab der Vergleich der unterschiedlichen Bedingungen der relativen Distanzen zum Zellkern, sowie der interallelichen und interchromosomalen Distanzen keine signifikanten Unterschiede (Tukey-Test, $p > 0,05$). Die in den 2D-Untersuchungen beobachteten Tendenzen (vgl. Kapitel 4.5) ließen sich nicht bestätigen.

Abschließend wurde überprüft, ob der selektive Zusammenhang zwischen der *IL8* mRNA-Menge und der Kerngröße auch im dreidimensionalen Zellkern, also für das Kernvolumen, beobachtet werden konnte. Dafür wurde die *IL8*-mRNA-Signal-Anzahl der Zellen mit dem Kernvolumen korreliert, der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet und der t-Test für den Korrelationskoeffizienten durchgeführt. In Abbildung 55A sind diese Korrelationen in Form von *Scatter Plots* visualisiert, in denen die Punktwolke nach 0,5h, 1h und 3h IL-1-Behandlung schräg und oval im Koordinatensystem lag, was auf einen gleichsinnigen Zusammenhang beider Parameter hindeutete. Dies wurde durch die signifikanten Korrelationskoeffizienten bestätigt, die einen leichten bis mittleren Zusammenhang der *IL8* mRNA-Menge mit dem Kernvolumen anzeigten (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p < 0,05$). In Abbildung 55B zeigen *Scatter Plots* die Korrelation der *IL6* mRNA-Signal-Anzahl mit dem Kernvolumen. In diesem Falle zeigte die Punktwolke wieder eine dreieckige Form und auch die Korrelationskoeffizienten gaben keinen Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang der beiden Parameter (t-Test für den Korrelationskoeffizienten, $p > 0,05$).

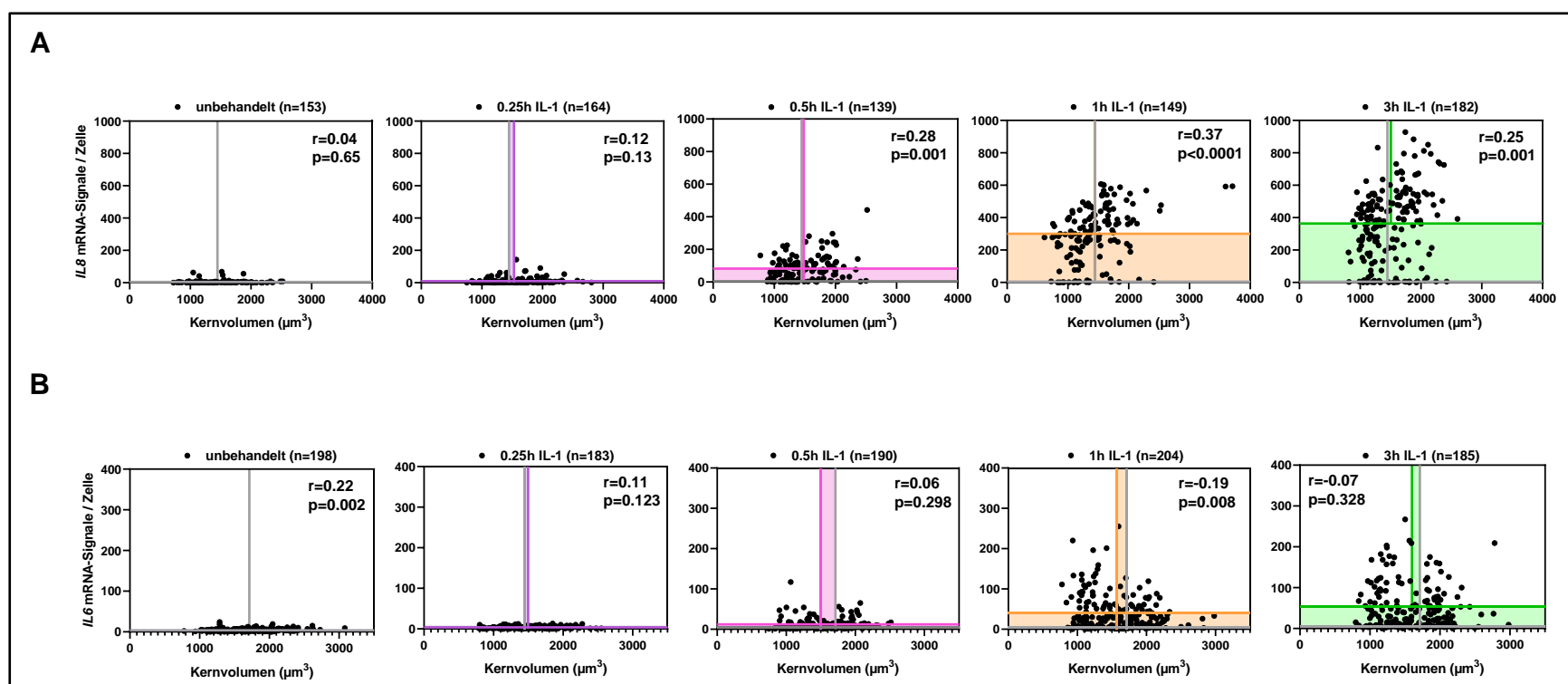


Abbildung 55. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mRNA-Menge und dem Kernvolumen.

A: Korrelation der *IL8* mRNA-Menge mit dem Kernvolumen mit Daten aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten mit mindestens 139 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = -0,12 - 0,20$; $CI(r(0,25\text{h})) = -0,03 - 0,28$; $CI(r(0,5\text{h})) = 0,12 - 0,43$; $CI(r(1\text{h})) = 0,23 - 0,50$; $CI(r(3\text{h})) = 0,11 - 0,38$. Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $p=0,05$. **B:** Korrelation der *IL6* mRNA-Menge mit dem Kernvolumen mit Daten aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten mit mindestens 183 Zellen pro Bedingung. Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson und des Konfidenzintervalls (CI) von r . $CI(r(\text{unb.})) = 0,08 - 0,35$; $CI(r(0,25\text{h})) = -0,03 - 0,26$; $CI(r(0,5\text{h})) = -0,07 - 0,22$; $CI(r(1\text{h})) = -0,32 - 0,05$; $CI(r(3\text{h})) = -0,21 - 0,07$. Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten mit dem Signifikanzniveau $p=0,05$.

Zusammenfassend ergab die Untersuchung der medianen Kerngrößen in der Gesamtpopulation von hTERT-RPE1-Zellen mit verschiedenen zellbiologischen Techniken (Immunfluoreszenz, RNA-FISH und Immuno-RNA-FISH, 2D und 3D Weitfeldmikroskopie) keine reproduzierbare Änderung der Kerngröße nach IL-1-Behandlung. Dagegen konnte sowohl mittels einer Anfärbung der DNA mit Hoechst als auch über die direkte Markierung der Nukleushülle mit Antikörpern für die Kernlamine und bei dreidimensionaler Abbildung ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IL-1-induzierten *IL8* mRNA-Menge und der Kerngröße sowie der Zytoplasmagröße beobachtet werden. Dieser Effekt ist Gen-spezifisch, da zwischen der mRNA-Menge anderer, in geringeren Mengen exprimierten, IL-1-induzierten Genen (*IL6* und *CXCL2*) und der Kerngröße keine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass in den am stärksten pro-inflammatorisch aktivierten Zellen mit der Zellgröße ein basaler biologischer Parameter zytokinabhängig ko-reguliert wird.

5 Diskussion

5.1 Heterogene Regulation der Kern- und Zellgröße durch einen Entzündungsreiz

In bisher unveröffentlichten 3D DNA-FISH-Experimenten der AG Kracht wurden signifikant größere Kernvolumina in für 1h mit IL-1 α behandelten hTERT-RPE-1-Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen gemessen (unveröffentlichte Daten AG Kracht). Die Detektion größerer Zellkerne in sonst histologisch unauffälligen Zellen im direkten Umfeld von Tumoren führte zu der Vermutung, dass Änderungen der Kerngröße frühe Ereignisse in der Malignomentstehung sind (Slaughter et al. 1953; Vukovic et al. 2016; Chai und Brown 2009; Cantwell und Dey 2021). Proinflammatorische Mediatoren wie IL-1, IL-8 und IL-6 spielen wichtige Rollen in der Karzinogenese (vergleiche Kapitel 1.2, (Alfaro et al. 2017)). Vor diesem Hintergrund ist die Beobachtung einer IL-1-induzierten Änderung der Kerngröße für das Verständnis der Entstehung von Karzinomen von Interesse. Darüber hinaus führt eine überschießende Aktivierung des IL-1-Signalwegs zu Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, moduliert neuroinflammatorische Erkrankungen wie Autoimmunenzephalitiden, Inflammation im Rahmen von Schlaganfällen und Temporallappenepilepsie sowie neurodegenerativen Erkrankungen und beeinflusst die Entstehung von Atherosklerose (Mantovani et al. 2019).

Die Untersuchung einer putativen Interleukin-1-vermittelten Regulation der Kerngröße erfolgte zunächst mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) mit Primärantikörpern für Kernlamine und Hoechst-Färbung. Diese Methodik konnte initial validiert werden, indem gezeigt wurde, dass das Verfahren in der Lage war, eine durch den nukleären Exportinhibitor Leptomycin B induzierte Änderung der Kerngröße zu erfassen (Jevtić et al. 2019). Es konnte weiterhin der bekannte Zusammenhang zwischen Kerngröße und DNA-Menge einer Zelle in dieser Arbeit

mittels 3D RNA-FISH gezeigt werden, was ebenfalls dafür spricht, dass die verwendete Methodik in der Lage ist, definierte Veränderungen der mittleren Kerngröße bestimmter Populationen nachzuweisen (Huber und Gerace 2007).

Mittels 2D IF konnte für die gesamte untersuchte Zellpopulation zunächst keine eindeutige und signifikante IL-1 induzierte Änderung der Kerngröße, der Zytoplasmafläche oder des Kern- / Zytoplasmaverhältnisses (K-/Z-Verhältnis) gezeigt werden (vergleiche Kapitel 4.2). Dies entspricht der aktuell vorliegenden Literatur, da seit vielen Jahren wiederholt gezeigt werden konnte, dass Kerngröße und Zellgröße in gesunden Zellen in einem festen, zelllinienspezifischen Verhältnis zueinanderstehen. Dies impliziert, dass es einen komplexen regulatorischen Prozess gibt, der die Kerngröße und die Zellgröße aneinander koppelt (Cantwell und Nurse 2019b). Das konstante Verhältnis scheint der Aufrechterhaltung einer bestimmten Konzentration an Makromolekülen zu dienen (Berry und Pelkmans 2022). In malignen Tumorzellen hingegen ist das K-/Z-Verhältnis zugunsten eines größeren Zellkerns verschoben (Jevic und Levy 2014). Es ist nicht bekannt, inwieweit das Kern-/ Zytoplasmaverhältnis signalabhängig verändert werden kann.

Weitere methodische Ansätze wie 2D und 3D RNA-FISH, sowie Immuno-RNA-FISH und 3D DNA-FISH ergaben ambivalente teilweise auch signifikante Änderungen der mittleren Kerngröße wie Tabelle 1 entnommen werden kann. Ob die in 2D und 3D RNA-FISH gemessenen signifikanten Unterschiede spezifisch durch IL-1-*signaling* verursacht worden sind oder durch andere Faktoren verursacht wurden, ist unklar. Da sie durch die anderen Methoden nicht reproduziert werden konnten und im Gegensatz zueinanderstehen, ist es wahrscheinlich, dass es sich um unspezifische Veränderungen handelte. Die heterogenen Ergebnisse könnten durch folgende Faktoren verursacht worden sein:

Für hTERT-RPE-1-Zellen war im Vorfeld gezeigt worden, dass sie auf eine Inkubation mit IL-1 mit einer Änderung der Genexpression proinflammatorischer Gene antworteten, welche ihr Maximum nach einstündiger Stimulation erreichte. Nach längerer Inkubationsdauer nahm die induzierte Genexpression in vielen Zellen wieder ab. Einige Zellen zeigten jedoch eine prolongierte Expression bestimmter Gene, welche in anderen Zelllinien nicht beobachtet werden konnte und die möglicherweise aus parakriner Stimulation resultierte (Maßmann 2021). Bei den RNA-FISH und Immuno-RNA-FISH-Experimenten wurden alle Zellen mit unauffälligem Phänotyp in die Auswertung mit einbezogen, ohne die tatsächliche Reaktion von einzelnen Zellen auf den IL-1-Stimulus, beispielsweise anhand der p65-Lokalisation, zu berücksichtigen. Zellen mit prolongierter Genexpression hätten jedoch auch ein abweichendes Verhalten der Kernmorphologie zeigen und damit die Ergebnisse dieser experimentellen Ansätze verfälschen können.

Weiterhin waren die Zellen vor Beginn der Untersuchung nicht zellzyklussynchronisiert worden. Jedoch ist bereits gezeigt worden, dass Zellen in G2 und S-Phase signifikant größere Zellkerne aufweisen als in G1 Phase (Huber und Gerace 2007). Es ist möglich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellpopulationen bezüglich der Zellzyklusphasen mitverursacht worden sind. Um solche Effekte auszuschließen, wäre es sinnvoll, Untersuchungen der Auswirkung von IL-1 auf die Kerngröße an synchronisierten Zellen durchzuführen. Hierfür stehen unter anderem DNA-Synthese-Inhibitoren (z.B. Hydroxyurea) oder Spindelgifte (z.B. Colchicin) sowie Serumentzug zur Verfügung. Allerdings beeinflussen insbesondere die Spindelgifte den Zellstoffwechsel und die Zellstruktur (Banfalvi 2011).

Die Methoden Immunfluoreszenz, RNA-FISH und DNA-FISH unterscheiden sich bezüglich der verwendeten Detergenzien und der Temperatur, bei der die Antikörper bzw. die FISH-Sonden mit den Proben inkubiert werden. Die Fixierung der Zellen erfolgte in allen Protokollen mittels 4 % Paraformaldehydlösung. In den Protokollen der indirekten Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit Triton-X-100 und Saponin permeabilisiert und bei Raumtemperatur mit den Antikörpern inkubiert. In den RNA-FISH-Protokollen wurde Tween 20 zur Permeabilisierung der Zellen verwendet. In den DNA-FISH-Protokollen erfolgte die Permeabilisierung aufgrund der besonderen Größe der DNA-Sonden mittels einer Kombination aus Triton-X-100 und Saponin. Die Hybridisierung mit den RNA-FISH-Sonden erfolgte bei 40 °C, der DNA-FISH-Sonden bei 75 °C. Bei Triton-X-100 und Tween 20 handelte es sich um nichtionische Detergenzien, welche Biomembranen für Sonden oder Antikörper durchlässig machen, indem sie sich in die Membranen einlagern (Chandra Mohan 2007). Inwiefern sie die Kerngröße damit artifiziell beeinflussen, ist nicht vorbeschrieben. Jedoch ist es denkbar, dass die Einflüsse der Detergenzien Triton-X-100 und Tween 20 leicht unterschiedlich sind (Coligan 2001). Es ist davon auszugehen, dass die höheren Hybridisierungstemperaturen in der DNA-FISH, auch die Zellstrukturen verändert haben. Daher sollte ein direkter Vergleich zwischen den verschiedenen Methoden vorsichtig erfolgen.

Insgesamt fiel auf, dass alle Experimente, in denen Lamin A/C für die Markierung der Kernhülle genutzt wurde, keine signifikanten Unterschiede zeigten, während die Experimente, bei denen die Messung der Kerngröße nur anhand der Hoechstfärbung erfolgte, widersprüchliche signifikante Ergebnisse ergaben. Der Vergleich der mittleren Kerngrößen mit IL-1- oder Leptomycin B behandelte Zellen mit den mittleren Kerngrößen unbehandelte Zellen ergab übereinstimmend mit Jevtić et al. das gleiche Ergebnis unabhängig davon, ob der Vergleich anhand der über die Hoechstfärbung oder über die Laminfärbung gewonnenen Daten erfolgte (vergleiche Kapitel 4.1. und

4.2) (Jevtić et al. 2019). Da Hoechst jedoch den Zellkern färbt, indem es in die DNA interkaliert, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die Färbung des Zellkerns durch die Chromatinorganisation und Chromatinmenge beeinflusst wird. Dies wiederum könnte die gemessene Kerngröße verfälschen. Vor diesem Hintergrund erscheinen die Ergebnisse der Laminfärbung als verlässlicher.

Insgesamt kann die Betrachtung der mittleren Kerngröße eine IL-1-induzierte Erhöhung der Kerngröße nicht bestätigen. Stattdessen scheint die mittlere Kerngröße der Gesamtpopulation eher nicht durch IL-1 beeinflusst zu werden. Dies führte zu der Frage, ob und wie die heterogene transkriptionelle Aktivität IL-1 induzierter Gene in einzelnen Zellen mit der Kern- und Zytoplasmagröße sowie mit dem K-/Z-Verhältnis korrelierte.

5.2 Die Transkription von Chemokin- und Interleukingenen ist durch IL-1 schnell und stark induzierbar

Als erster Anhaltspunkt für die Aktivierung des IL-1-Signalwegs in hTERT-RPE-1-Zellen wurde das Ausmaß der Translokation des Transkriptionsfaktors p65 aus dem Zytoplasma in den Zellkern herangezogen. Dies wurde in der Immunfluoreszenz als Gesamtfluoreszenzintensität der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung von p65 quantifiziert (Abb.25). Die Ergebnisse spiegelten die bekannte Kinetik des IL-1 *signalings* wider, im Rahmen dessen nach halb- und einstündiger IL-1-Stimulation besonders viel p65 in die Zellkerne transloziert, welches diese nach 3h und 6h wieder verlässt (Meier-Soelch et al. 2021; Mayr-Buro et al. 2019). Zusätzlich konnten auch nach 6h IL-1-Behandlung noch viele Zellen mit höheren p65-Konzentrationen beobachtet werden, sowie eine Zunahme der Gesamtfluoreszenzintensität im Zeitverlauf der IL-1-Behandlung, die zusammen auf eine zunehmende Heterogenität des Ausmaßes der p65-Translokation im Zeitverlauf nach der IL-1-Stimulation hindeutete (vgl. Kapitel 5.4).

Zur weiteren Beurteilung der transkriptionellen Aktivität an den IL-1-Zielgenen *IL8*, *CXCL2* und *IL6* wurden aktive Transkriptionsstellen und die mature mRNA dieser Gene in hTERT-RPE-1-Zellen mittels 2D RNA-FISH mit Sonden für intronische RNA und mature mRNA visualisiert und quantifiziert (Huang und Spector 1996; Femino et al. 1998). Wie unter Kapitel 3.3.4 beschrieben, wurden die spezifischen (und als aktive Genloci interpretierten) prä-mRNA-Signale anhand ihrer Größe und Intensität ausgewählt und multiple kleine Signale nicht berücksichtigt. Dies beruhte auf der Annahme, dass sich die prä-mRNA am aktiven Genlocus konzentriert, weil sie parallel zur Transkription gespleißt wird (Huang und Spector 1996; Wada et al. 2009; Femino et al. 1998). Weiterhin handelt es sich bei den hTERT-RPE-1-Zellen um diploide Zellen (unveröffentlichte Ergebnisse AG Kracht, (hTERT RPE-1 ATCC® CRL-4000™ Homo sapiens Retina, eye; pigm 2021), sodass das Vorkommen von mehr als zwei aktiven Loci eines Gens in einer Zelle nicht zu erwarten war. Möglicherweise handelte es sich bei den kleineren Signalen um bereits herausgespleißte Introns, die noch im Kern verblieben waren (Heinrich et al. 2022). Um diese Vermutung zu überprüfen, könnten die Zellen mit einem Spleißosomeninhibitor (z.B. Isoginkgetin (O'Brien et al. 2008)) behandelt werden. Würde es sich bei den kleineren Signalen tatsächlich um herausgespleißte Introns handeln wäre zu erwarten, dass sie in mit Isoginkgetin behandelten Zellen nicht mehr auftreten und die prä-mRNA klarer erkennbar wird.

In der RNA-FISH zeigte sich in nicht mit IL-1 behandelten Zellen für *IL8*, *CXCL2* und *IL6* sowohl für die aktiven Genloci und Transkriptionsstellen als auch für die Transkriptzahl pro Zelle nur eine äußerst geringe Aktivität. Dies bedeutet, dass die untersuchte Zellpopulation nicht vorstimuliert war. Nach halbstündiger Stimulation mit IL-1 stieg zunächst die Zahl der aktiven Genloci und aktiven Transkriptionsstellen auf ihr Maximum. Nach 1h bzw. 3h erreichte die Zahl der *IL8*-, *IL6* und *CXCL2* mRNA-Transkripte pro Zelle ihr Maximum. Die Transkription der Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* wird also nach Behandlung der Zellen mit IL-1 schnell und stark induziert. Der zeitliche Unterschied der maximalen Zahl an aktiven Genloci und mRNA-Transkripte kann dadurch erklärt werden, dass die muren mRNA-Transkripte erst aus der prä-mRNA prozessiert werden, wozu neben der aktiven Transkription weitere Prozesse wie mRNA-Prozessierung und Stabilisierung nötig sind (Priester et al. 2022). Im weiteren Zeitverlauf der IL-1-Behandlung nahmen die Zahl der aktiven Genloci, Transkriptionsstellen und der muren mRNA-Transkripte wieder ab, ohne nach sechsständiger Stimulation das Ausgangsniveau zu erreichen.

Die IL-1-abhängige Induktion der Expression von *IL8* und *IL6* in hTERT-RPE-1-Zellen wurde bereits im Vorfeld mittels quantitativer *real time* Polymerasekettenreaktion und auf Einzelzellebene mittels RNA-FISH mit Sonden für reife mRNA untersucht. In diesen Experimenten war die maximale mittlere und mediane mRNA-Menge für beide Gene ebenfalls nach einstündiger Behandlung mit IL-1 detektiert worden (Maßmann 2021). Maßmann dokumentierte für hTERT-RPE-1-Zellen, dass nach einstündiger IL-1-Behandlung in 80 % der Zellen eine Translokation von p65 in den Zellkern erfolgt war (Maßmann 2021). In dieser Arbeit wurde die Translokationsfrequenz nicht gezielt untersucht. Nach 30-minütiger Stimulation mit IL-1 waren nur in maximal 61 % der untersuchten Zellen *IL8* und / oder *IL6*-Gene aktiv. Dieser Unterschied liegt wahrscheinlich jedoch nicht an einer geringeren Reaktion der untersuchten Zellen auf IL-1, sondern daran, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors in deutlich mehr Zellen erfolgt, als dass zu einem bestimmten Zeitpunkt die Transkription an den IL-1-Zielgenen aktiv ist. Dies kann durch zwei Punkte erklärt werden: Erstens wird die transkriptionelle Aktivierung der IL-1-Zielgene

intranukleär durch weitere Schritte organisiert (vgl. Kapitel 1.4.3 und 1.4.4) (Bacher et al. 2021). Zweitens läuft die NF- κ B-vermittelte Transkription nicht linear, sondern binär, in sogenannten *transcriptional bursts* ab (Bass et al. 2021).

Da also insgesamt die von Maßmann in hTERT-RPE-1-Zellen detektierte IL-1-induzierte mRNA-Kinetik hier nachvollzogen werden konnte, ist davon auszugehen, dass in dieser Arbeit ein für die untersuchte Zelllinie normales Expressionsmuster der Gene *IL8* und *IL6* vorlag. Da eine Vorstimulation oder ein verändertes Expressionsmuster als Antwort auf den IL-1-Stimulus die Ergebnisse der geplanten Messung intranukleärer Distanzen hätte verändern können, ist es wichtig, dass diese Fehlerquelle ausgeschlossen wurde.

In Kapitel 4.4 konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die zum Zeitpunkt der Fixierung aktive Genloci für das entsprechende Gen aufwiesen, mehr *IL8* bzw. *IL6* mRNA enthielten. Damit ist ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Menge und der Aktivität eines entsprechenden Genortes anzunehmen. Dies entspricht den Erwartungen, da die aktive Transkription an einem Gen die Voraussetzung für die Synthese neuer mRNA-Transkripte ist (Finn und Misteli 2019). Weiterhin lässt sich der Zusammenhang durch das *transcriptional-burst*-Modell erklären, da Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B die Frequenz und Stärke der *bursts* verstärken und auf diese Weise die Synthese der mRNA von IL-1-Zielgenen erhöhen (Weiterer et al, 2020). Besonders durch die Erhöhung der *burst frequency* steigt zudem die Wahrscheinlichkeit, dass zum Zeitpunkt der Fixierung Zielgene aktiv sind und damit durch die intronischen mRNA-Sonden visualisiert werden können (Nikopoulou et al. 2019; Bass et al. 2021).

Beim Vergleich der Zahl der aktiven *IL8*-, *IL6*- und *CXCL2*-Genloci pro Zelle und Größenordnung der *IL8* mRNA-Menge mit der *IL6*-mRNA-Menge zeigte sich in unbehandelten Zellen sowohl eine höhere Genaktivität als auch eine größere mRNA-Menge für *IL6* im Vergleich zu *IL8* und *CXCL2*. Hoffmann et al. beschrieben 2002 ein Modell in dem die Transkription von *IL8* in ruhenden Zellen durch die Bindung des NF- κ B-repressing factor (NRF) am *negative regulatory element* (NRE) des *IL8* promoters reprimiert wird (Elke Hoffmann et al. 2002; Nourbakhsh et al. 2001). Für *IL6* und *CXCL2* ist eine solche aktive Repression nicht beschrieben. Poststimulativ zeigte sich hingegen eine deutlich höhere Genaktivität und größere mRNA-Transkriptmenge für *IL8* (vergleiche Kapitel 4.3.2 und 4.7.1). Auf mRNA-Ebene konnten ähnliche Unterschiede im Ausmaß der *IL8*- und *IL6*-Transkription bereits gezeigt werden (Maßmann 2021). Diese Unterschiede deuten auf eine herausragende Induktion der *IL8*-Expression nach externen Stimuli hin.

Gründe für diese besonders starke Expression können sowohl auf Ebene der Transkriptionsinduktion als auch auf funktioneller Ebene gesehen werden: Basierend auf der Beobachtung, dass verschiedene NF- κ B-induzierbare Gene eine unterschiedliche Induktionskinetik aufweisen und ihre Transkriptionsinitiation von verschiedenen Proteinen (insbesondere dem *chromatin remodelling complex* SWI/SNF abhängig ist, wurden NF- κ B-induzierbare Gene in einem Modell in drei Gruppen eingeteilt: *early primary*, *late primary* und *secondary response genes*. Die Induktion der Transkription von *early primary response genes*, zu denen auch *CXCL2* und *IL8* gehören, erfolgt schnell stimulusabhängig und ist nicht abhängig von der Synthese und Wirkung von Proteinen und SWI/SNF. *Late primary response genes* wie zum Beispiel Interferon β benötigen für ihre Aktivierung *chromatin remodelling complexes* und werden daher mit Verzögerung induziert. Für die Induktion der Transkription von *secondary response genes*, wie zum Beispiel *IL6*, werden sowohl *chromatin remodelling complexes* als auch neu synthetisierte Proteine benötigt (Ramirez-Carrozzi et al. 2006; Ramirez-Carrozzi et al. 2009). Da es sich bei *IL8* und *IL6* also um Mitglieder unterschiedlicher Gruppen handelt, ist nachvollziehbar, dass sie sich in der Häufigkeit auffindbarer aktiver Genloci unterscheiden.

Des Weiteren spielen die drei Zytokine unterschiedliche Rollen im Organismus. *IL8* bindet, im Gegensatz zu *CXCL2*, an die CXC Chemokin Rezeptoren () 1 und 2 und hat somit eine induzierende und regulierende Wirkung auf die Chemotaxis primär an der Entzündungsreaktion beteiligter Granulozyten (Bachelier et al. 2014, Stillie et al. 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass dieses Zytokin im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zytokinen von besonderer Bedeutung für die Regulation der frühen Entzündungsreaktion ist. Ohne Entzündungsreiz ist jedoch auch keine *IL8*-vermittelte Chemotaxis notwendig und daher die geringe Expression in unbehandelten Zellen zur Begrenzung chronischer Entzündungsreaktionen biologisch sinnvoll. *IL6* stimuliert die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten im Knochenmark und in Hepatozyten die Produktion von Akute Phase Proteinen, wie C-reaktives Protein und Fibrinogen. *IL6* induziert außerdem die Proliferation und Differenzierung zytotoxischer T-Zellen, ist an der Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und an der Rekrutierung von Monozyten beteiligt. Auch *IL6* spielt eine Rolle für die Neoangiogenese (Kishimoto 2006). Entsprechend der Wirkung von *IL6* als Differenzierungsfaktor erscheint das im Vergleich zu *IL8* höhere basale Expressionslevel biologisch sinnvoll.

Ein weiterer auffälliger Befund war, dass *IL8* zum Zeitpunkt der Fixierung nach halbstündiger IL-1-Behandlung in 22 % der Zellen biallelisch exprimiert wurde, während nur in unter 5% der untersuchten Zellen zwei *IL6*- und *CXCL2*-Loci aktiv waren (vergleiche Kapitel 4.3.2). Wada et al. dokumentierten ähnlich unterschiedliche Expressionsmuster der TNF α -Zielgene *SAMD4A* und *EXT1* in HUVEC mittels RNA-FISH mit

intronischen Sonden. In dieser Analyse waren nach 30-minütiger TNF α -Stimulation in 22,5 % der Zellen zwei SAMD4A-Genloci aktiv. Für EXT1 konnte keine so starke biallelische Genaktivität gezeigt werden (Wada et al. 2009). Da das Ausmaß der biallelischen Genaktivität von *IL8* und SAMD4A die mRNA Expression übertrifft, welche bei unabhängiger Expression beider Allele erwartet werden würde (Wada et al. 2009), könnte sie ein Hinweis auf eine interallelische Koordinierung der Transkription einiger Gene sein. Die häufige biallelische Aktivität am *IL8*-Gen könnte eine Ursache für die besonders große Transkriptmenge für dieses Gen sein.

Zuletzt fiel bei der Betrachtung der Kombination aktiver Transkriptionsstellen auf, dass aktive *IL6*-Loci mehr als dreimal so oft in Zellen auftraten in denen gleichzeitig auch aktive *IL8*-Loci zu finden waren als in Zellen in denen dies nicht der Fall war (vergleiche Kapitel 4.3.2.). Dies könnte ein Hinweis für eine genomweite Koregulation von *IL8* und *IL6* sein. In dem Versuchsansatz mit intronischen RNA-Sonden für *IL6* und *CXCL2* traten aktive *IL6*-Loci nur nach halbstündiger Stimulation häufiger in Zellen in denen auch *CXCL2*-Loci aktiv waren als in Zellen ohne *CXCL2* Aktivität auf. Dies ist im Einklang mit *chromosome conformation capture*-Analysen (i4-C) in KB und Hela-Zellen, in denen sich Hinweise auf eine Koregulation des *IL6*-Gens auf Chromosom 7 durch den *IL8*-Enhancer, also in *trans* ergeben hatten (Weiterer et al. 2020).

5.3 Gene repositioning nach einem Entzündungsreiz

5.3.1 Fehlende zeitabhängige Änderung der radialen Position von durch IL-1 aktivierte Genloci

Die räumliche Anordnung der Chromosomen isogener Zellen nach der Mitose ist variabel. Einzelne Chromatinsequenzen innerhalb des menschlichen Zellkerns sind hingegen nicht-zufällig verteilt (Dekker und Misteli 2015). Stattdessen wurde gezeigt, dass Chromatin mit ähnlicher Dichte und vergleichbarer transkriptioneller Aktivität kolokalisiert (Lieberman-Aiden et al. 2009). Gegenstand der aktuellen Forschung ist, inwiefern die Position einzelner Chromatinabschnitte mit ihrer transkriptionellen Aktivität zusammenhängt und ob die Änderung der Position eines Chromatinabschnitts im Verhältnis zu Kernhülle und Kernzentrum die Transkription dieses Abschnitts determiniert (Shachar und Misteli 2017). Bisher durchgeführte Untersuchungen zeichnen ein ambivalentes Bild des Zusammenhangs zwischen Transkriptionsaktivität und radialer Genposition: so konnte für einige Gene gezeigt werden, dass eine Änderung ihrer radialen Position mit einer Änderung ihrer Expressionsmuster assoziiert ist. Für andere Gene hingegen wurde kein Zusammenhang beider Parameter gezeigt (vgl. Kapitel 1.4.4.1 (Shachar und Misteli 2017)). Von diesen ambivalenten Befunden leiten einige Autoren ab, dass der Zusammenhang zwischen Transkriptionsaktivität und radialer Genposition gen-spezifisch ist (Shachar und Misteli 2017; Meaburn 2016).

Für den Zusammenhang aus Transkriptionsaktivität und radialer Position der IL-1-Zielgene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* liegen bisher noch keine publizierten Daten vor.

Wie in Kapitel 4.3.2. und 4.7.2. gezeigt, traten in unbehandelten Zellen für *IL8* keine und für *CXCL2* und *IL6* nur sehr wenige aktive Genloci auf. Damit war im Vergleich zu den im Vorfeld in der AG Kracht durchgeführten 3D DNA-FISH-Experimenten kein bzw. kaum ein Vergleich der radialen Positionen unbehandelter mit behandelten Zellen möglich, was die Aussagekraft der durchgeführten Experimente limitiert. Im Zeitverlauf der IL-1-Stimulation ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede der radialen Position der drei aktiven Genloci, die für oder gegen eine Änderung ihrer Position sprechen würden (vergleiche Kapitel 4.3.2. und 4.7.2.). Damit können die in DNA-FISH-gewonnenen Hinweise zugunsten einer Umpositionierung von *IL8* und *IL6* DNA-Loci nach einstündiger IL-1-Stimulation nicht bestätigt werden. Zur weiteren Untersuchung einer putativen radialen Positionsänderung IL-1 induzierbarer Gene im Rahmen ihrer transkriptionellen Aktivierung sind also weitere Untersuchungen notwendig, die unter 5.3.3. weiter ausgeführt werden.

Sehr auffällig war allerdings, dass die meisten aktiven Genloci und ATS aller drei Gene in der peripheren Kernhälfte, zwischen 0,5 und 1, aufzufinden waren. Damit lagen alle drei IL-1-regulierten aktiven Genloci in einem ähnlichen subnukleären Raum. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Gene ähnlicher Aktivität einen subnukleären Bereich teilen (Lieberman-Aiden et al. 2009). Möglicherweise teilen auch koregulierte Gene einen bestimmten Raum im Zellkern. Die räumliche Nähe koregulierter Gene könnte besonders für die Induktion von durch Stimuli schnell induzierter Gene von Vorteil sein (Meaburn 2016). Für diese Hypothese sprechen kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Finn et al., die zeigen, dass in embryonalen Stammzellen und Fibroblasten die räumliche Nähe verschiedener Genloci größer wird, je näher sie zur Peripherie lokalisiert sind (Finn und Misteli 2022). Weiterhin wurde durch Finn et al. gezeigt, dass die Änderung einer bevorzugten radialen Genposition mit einer Änderung des für dieses Gen spezifischen Interaktoms zusammenhängt (Finn und Misteli 2022). Es stellt sich die Frage, ob inaktive *IL8*, *CXCL2* und *IL6* Genloci ebenfalls häufiger in der peripheren Kernhälfte lokalisiert sind. Außerdem könnten weitere IL-1-Zielgene auf anderen Chromosomen, beispielsweise (bspw.) *NFkB inhibitor alpha* auf Chromosom 14 (Gene: NFKBIA (ENSG00000100906) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109 2023), auf ihre präferierte nukleäre Lokalisation untersucht werden.

Die Beobachtung passt weiterhin zu dem durch Crosetto et al. beschriebenen *gradient model*. Das Modell beschreibt die Verteilung der Genloci im nukleären Raum als Gradienten aus inaktiven und aktiven Chromatinabschnitten. Hiernach befinden sich die inaktivsten Chromatinabschnitte direkt an der Kernlamina oder um Nukleoli herum und die aktivsten Abschnitte im Kernzentrum und um *nuclear speckles* herum (Crosetto und Bienko 2020). Aufgrund der geringen Genaktivität der durch IL-1-induzierbaren Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* in nicht-stimulierten Zellen erscheint eine peripherere Position nach dem Modell passend.

5.3.2 Fehlende Änderung interchromosomaler Distanzen von IL-1-aktivierten Genloci

Papantonis et al. zeigten am Beispiel der Gene *SAMD4A* (Chromosom 13) und *EXT1* (Chromosom 8), dass Entzündungsmediatoren wie TNF α oder IL-1 die Bildung von spezialisierten Transkriptionsfabriken induzieren können, welche in *trans* vorliegende Chromatinabschnitte enthalten (Papantonis et al. 2012).

In *chromosome conformation capture*-Analysen (i4-C) in KB und Hela-Zellen, in denen die Enhancer von *IL8* und *CXCL2* auf Chromosom 4 deletiert worden waren, hatten sich Hinweise auf eine Koregulation des *IL6*-Gens auf Chromosom 7 durch den *IL8*-Enhancer, also in *trans* gezeigt (Weiterer et al. 2020). Zur weiteren Untersuchung einer putativen Koregulation von *IL8* und *IL6* wurden im Vorfeld dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe Kracht 3D DNA-FISH-Experimente mit Sonden für *IL8* und *IL6* durchgeführt. In diesen zeigte sich, dass es nach einstündiger IL-1-Stimulation in hTERT-RPE-1-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Distanz zwischen beiden *IL8* bzw. *IL6* Allelen und zwischen *IL8* und *IL6* DNA-Loci kam (unveröffentlichte Daten AG Kracht). Dies kann als weiterer Hinweis für eine mögliche Interaktion der IL-1-Zielgene in *trans* betrachtet werden (Weiterer et al. 2020). Da proximale Chromatinabschnitte häufiger miteinander interagieren als distale, scheint die Distanz zwischen zwei Genloci ein starker Einflussfaktor für physikalische Interaktionen zwischen Chromatinabschnitten zu sein (Finn et al. 2019). Die genomische Distanz reicht jedoch an sich nicht aus, um alle Interaktionsmuster zu erklären. Stattdessen können Koregulationen in *trans* auch über andere Mechanismen als eine direkte Interaktion der Chromatinsequenzen erklärt werden (Finn et al. 2019). Daraus kann die Vermutung abgeleitet werden, dass räumliche Nähe eher optimierend auf interchromosomale Interaktionen wirkt und nicht alleinige Voraussetzung ist.

Aufgrund der geringen *IL8*-, *CXCL2*- und *IL6*-Genaktivität in unbehandelten hTERT-RPE-1-Zellen konnten in dieser Population keine Distanzen gemessen werden (vgl. Abb. 27 und 29). Deswegen konnte auch für diese Fragestellung nur beurteilt werden, wie sich interchromosomale Distanzen bereits aktiver Genloci im zeitlichen Verlauf nach IL-1-Stimulation verändern, was die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt (siehe Kapitel 5.3.3). In Zellen mit biallelischer *IL8*-Expression waren die Distanzen zwischen aktiven *IL8*-Genloci tendenziell zum einen zum Zeitpunkt der höchsten Genaktivität (30 Minuten IL-1) und zum anderen zum Zeitpunkt prolongierter Genaktivität (6h IL-1) am geringsten (vgl. Kapitel 4.5.2 und 4.5.3). Dies könnte ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen besonderer biallelischer *IL8*-Genaktivität und räumlicher Nähe sein. Da es sich hierbei jedoch nur um Tendenzen handelt, sind unter 5.3.3. weitere experimentelle Ansätze, zur weiteren Untersuchung beschrieben.

Im Gegensatz zu *IL8* zeigte sich eine Verringerung der Distanz zwischen zwei aktiven *IL6*-Allelen, im Sinne einer putativen Bewegung nach 1h IL-1 beider Allele aufeinander zu (vgl. Kapitel 4.5.2.). Diese Tendenz entspricht den unveröffentlichten Vorbefunden der AG Kracht aus 3D-DNA-FISH-Analysen (unveröffentlichte Daten AG Kracht) und ist ein Hinweis auf eine Koregulation der beiden Allele durch räumliche Nähe. Der Befund sollte durch die Inhibition des IL-1-Signalwegs, beispielsweise durch den TAK-1-Inhibitor Oxozeanol (Jurida et al. 2015) validiert werden.

Aufgrund der seltenen biallelischen Expression konnte die interallelische Distanz zwischen *CXCL2* Allelen nicht beurteilt werden (vgl. Kapitel 4.3.2 und 5.2). Für validere Ergebnisse müsste ein Vielfaches der hier untersuchten Zellen analysiert werden.

Der Vergleich der Mittelwerte sowie der Häufigkeitsverteilungen der interchromosomalen Distanzen zwischen aktiven *IL8*- (Chromosom 4), bzw. *CXCL2*- (Chromosom 4) und *IL6*- Genloci (Chromosom 7) ergab keine signifikanten Unterschiede oder Muster, die zur maximalen Transkriptionsaktivität an den Genen nach 0,5h passten (vgl. Kapitel 4.5.3 und 4.3.2). Papantonis et al. hatten die TNF α oder IL-1-induzierbare Interaktion der aktiven Gene *SAMD4A* und *EXT1* anhand von Kolokalisationen mittels RNA-FISH gezeigt (Papantonis et al. 2012). Ähnliche Kolokalisationen zwischen aktiven *IL8* und *IL6* Genloci konnten in dieser Arbeit nur äußerst selten beobachtet werden und wurden daher nicht quantifiziert. Damit konnte diese Arbeit keinen Hinweis auf eine Koregulation der beiden Gene durch räumliche Nähe erbringen. Dies kann zum einen an den unter Kapitel 5.3.3. ausgeführten Limitationen der verwendeten Methoden liegen. Zum anderen sollte auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Stimulation mit IL-1 in hTERT-RPE-1-Zellen keine Verringerung von interchromosomalen Distanzen zwischen aktiven Transkriptionsstellen induziert: Stattdessen könnte eine Koregulation in *trans* auch über andere Mechanismen als eine direkte Interaktion der aktiven Chromatinsequenzen erklärt werden (Finn et al. 2019). Denn Moleküle können

intranukleär auf verschiedene Weisen miteinander interagieren: Direkt über Distanzen zwischen 1-10 nm, indirekt in makro-molekularen Komplexen über Distanzen zwischen 50-100 nm und über membranlose zelluläre Organellen, wie beispielsweise *splicing speckles* oder Transkriptionsfabriken, über Distanzen zwischen 100-500 nm (Lagache et al. 2015). Auch die Lage der aktiven Transkriptionsstellen zu solchen membranlosen Organellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Ein Hinweis für eine Koregulation über Zellorganellen könnte die häufigere Lokalisation aller drei aktiven Transkriptionsstellen in der peripheren Zellkernhälfte sein (vergleiche 4.5.1. und 5.2.).

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass die drei untersuchten Gene in unterschiedlichen spezialisierten NF- κ B Transkriptionsfabriken transkribiert werden. So wurde für die TNF α -Zielgene *SAMD4A* und *EXT1* gezeigt, dass sie zwar gemeinsam in spezialisierten NF- κ B-Transkriptionsfabriken transkribiert werden können, aber aktive Transkriptionsstellen auch häufig getrennt voneinander vorliegen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es in einer Zelle viele spezialisierte NF- κ B-Transkriptionsfabriken geben könnte (Papantonis et al. 2012).

5.3.3 Möglichkeiten zur Optimierung der Untersuchung radialer Positionen und interchromosomaler Distanzen auf Einzelzellebene

Durch andere Arbeitsgruppen erfolgte insbesondere die Untersuchung von interchromosomalen Interaktionen und Interaktionen von Genloci mit Transkriptionsfabriken häufig genomweit über Chromatin-Immünpräzipitation und *circular chromosome conformation capture* Verfahren (Papantonis et al. 2012; Weiterer et al. 2020). Auf Einzelzellebene wurde ebenfalls RNA-FISH verwendet. Hierbei wurde allerdings meist die Häufigkeit der Kolo-kalisation von prä-mRNA-Signalen verschiedener Gene oder von prä-mRNA-Signalen mit RNA-Polymerase II-Signalen erfasst (Papantonis et al. 2012; Schoenfelder et al. 2010; Osborne et al. 2007). In den hier vorliegenden Experimenten wurden Kolo-kalisationen zwischen *IL8* und *IL6* prä-mRNA-Signalen so selten beobachtet, dass sie nicht quantifiziert wurden. Ähnlich wie in dieser Arbeit erfolgte bei Brown et al. und Osborne et al. die Vermessung von Distanzen zwischen aktiven Genloci in RNA-FISH. Bei Brown et al. erfolgte die Bewertung allerdings grober, in dem alle Distanzen zwischen verschiedenen an der Erythropoese beteiligten aktiven Genen, die kleiner als 1 μ m waren, als Assoziation bewertet wurden, wobei die untersuchten Zellkerne einen Durchmesser von durchschnittlich 16 μ m hatten (Brown et al. 2008). Osborne et al. untersuchten ähnlich wie die AG Kracht im Vorfeld dieser Arbeit mittels DNA-FISH die Distanz zwischen *Myc* und *Igh* in unstimulierten und stimulierten B-Zellen. Hier konnte ebenfalls eine Annäherung der Genloci im Rahmen der Stimulation festgestellt werden. Eine Validierung mittels RNA-FISH, ob diese Annäherung auf eine tatsächliche Aktivität der Genloci zurückzuführen war, fand hier nicht statt (Osborne et al. 2007). Im Vergleich zu den beschriebenen Voruntersuchungen erfasste der, in dieser Arbeit verwendete, Versuchsansatz die Distanzen zwischen Genloci genauer und bezog ihre Aktivität mit ein, zeigte jedoch im Gegensatz zu den anderen Ansätzen keine klare Annäherung der Genloci im Rahmen ihrer Aktivierung mehr an. Auch die Änderung radialer Positionen konnte hier nicht nachgewiesen werden (vgl. 5.3.1 und 5.3.2.). Ursache dafür können unter anderem verschiedene methodische Limitationen sein:

Eine Limitation ist die teilweise geringe Stichprobengröße für die messbaren Distanzen. Sie ist wahrscheinlich darin begründet, dass die Transkription nicht linear sondern in sogenannten *bursts* auftritt (Bass et al. 2021), vergleiche Kapitel 5.2.), wodurch die Aktivität eines bestimmten Genes zum Zeitpunkt der Fixierung nach RNA-FISH einer hohen Zufälligkeit und Variabilität unterliegt (Boyle et al. 2001). Dies hatte zum einen zur Folge, dass maximal ca. 60 % der untersuchten hTERT-RPE-1-Zellen prä-mRNA-Signale enthielten, deren radiale Position untersucht werden konnte (vgl. Kapitel 5.2.). Zum anderen war es selten der Fall, dass an mehreren der vier untersuchten Gene in einer Zelle gleichzeitig zum Zeitpunkt der Fixierung Transkription stattfand (vergleiche Kapitel 4.3.2 und 5.2.). Mit DNA-Sonden können hingegen in allen Zellen alle 4 DNA-Loci detektiert werden, wodurch eine große Stichprobe von über 200 Distanzen ausgewertet werden kann. Um eine vergleichbare große Stichprobe bei der Untersuchung aktiver Gene zu erreichen, wäre bei einer Häufigkeit des Auftretens zwei verschiedener aktiver Gene in einer Zelle von ca. 12 % die Untersuchung von ca. 1700 Zellen erforderlich (vgl. Kapitel 4.3.2). Hinzu kommt außerdem, dass durch Finn et al. gezeigt wurde, dass die räumliche Lokalisation von einzelnen Genloci sowie von verschiedenen Allelen eines Gens innerhalb einer Population einer großen Heterogenität und Dynamik unterliegt und Interaktionen zwischen verschiedenen Genloci zu einem gegebenen Zeitpunkt nur in einem kleinen Teil der untersuchten Zellen auftreten (Finn et al. 2019; Finn und Misteli 2019). Voraussichtlich ist auch deswegen eine große Stichprobe erforderlich, um Regelmäßigkeiten abzuleiten. Aufgrund des hohen Zeitaufwands der Analyse mit Icy Bioimaging Software und Leica LASX-Software wäre hier, zuungunsten der Transparenz, die Nutzung eines automatisierten, KI-basierten Analysetools, wie zum Beispiel *Cellpose* sehr hilfreich (Stringer et al. 2021). Weitere high throughput Ansätze wären *single cell high-throughput chromosome conformation capture* (Hi-C)-Analysen, wie sie durch Finn et al. durchgeführt worden sind (Finn et al. 2019).

Zuvor wurde gezeigt, dass die Bewegung von Chromatinsequenzen auf kleine Bereiche begrenzt ist (Marshall et al. 1997). Ein Modell der Autoren Papantonis und Mitchell und Fraser beschreibt, dass sich Loci besonders schnell induzierbarer Gene bereits vor ihrer Aktivierung in der Nähe von „naiven“ Transkriptionsfabriken befinden, wodurch es für die Aktivierung zu keiner weitreichenden Änderung der Genposition kommen müsste (Papantonis et al. 2012; Mitchell und Fraser 2008). Möglicherweise sind die Änderungen der radialen Genposition dieser Gene sowie ihrer Distanzen zueinander zu unterschiedlichen Zeitpunkten der IL-1-Stimulation so klein, dass die Auflösung des inversen Fluoreszenzmikroskops nicht ausreichte, um sie zu erfassen. Eine höhere Auflösung könnte durch Nutzung eines konfokalen Mikroskops durch die Reduktion von *out-of-focus-light* erreicht werden (Elliott 2020).

Die Detektion einer durch ihre transkriptionelle Aktivierung herbeigeführten Änderung der Position aktiver Genloci über den alleinigen Vergleich der Position der aktiven Genloci zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung setzt voraus, dass eine potenzielle Änderung der radialen Position nicht die Voraussetzung für die Aktivierung der Transkription der Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* an sich ist. Bisher wurde für viele Gene gezeigt, dass die Änderung ihrer Position an sich nicht ausreicht, um ihre Aktivität zu determinieren (Meaburn und Misteli 2008). Stattdessen wird vermutet, dass die radiale Genposition eher optimierend auf die Transkriptionsaktivität wirkt (Meaburn und Misteli 2007; Therizols et al. 2014; Shachar et al. 2015; Strasák et al. 2009). Wäre die ordnungsgemäße Transkription von *IL8*, *CXCL2* und *IL6* jedoch von der radialen Positionsänderung abhängig, könnte dies die voneinander abweichenden Ergebnisse aus DNA- und RNA-FISH-Experimenten erklären. Zur weiteren Abklärung könnte die gleichzeitige Anfärbung von DNA- und RNA desselben Gens in einem Ansatz mittels kombinierter DNA- und RNA-FISH dienen (Finn und Misteli 2019). Dieser Ansatz würde außerdem einen Vergleich der Distanzen zwischen inaktiven DNA-Loci und aktiven Genloci verschiedener Gene ermöglichen, wenn ein Mikroskop mit ausreichend Farbfiltern verwendet würde. Bolland et al. publizierten 2013 ein DNA-FISH-Protokoll, an das angelehnt in der AG Kracht DNA-FISH-Experimente durchgeführt wurden (Bolland et al. 2013). Hierbei erfolgte die Denaturierung der DNA bei 75 °C. Diese Temperatur würde aufgrund der Instabilität der RNA-Transkripte voraussichtlich bei einer einfachen Kombination der, in der AG Kracht verwendeten, DNA- und RNA-FISH Protokolle zu keinen guten RNA-Signalen führen (Lai et al. 2021). Die Arbeitsgruppen Lai et al und Shpiz et al publizierten DNA-RNA-FISH-Protokolle, in denen die RNA-Markierung entweder durch *tyramide signal amplification* (TSA) oder durch *immunostaining* stabilisiert wurde (Lai et al. 2021; Shpiz et al. 2014).

Eine weitere Limitation der durchgeführten RNA-FISH-Experimente ist die geringe zeitliche Auflösung. Um diese zu erhöhen wäre die Durchführung von *live cell imaging* Experimenten an *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) editierten Zellen möglich. Hierbei kann grün fluoreszierendes Protein (GFP) an spezifische protein-codierende Gene gekoppelt werden. Dafür wird für einen Teil des Zielgenes eine *small guide RNA* (sgRNA) erstellt. Außerdem werden GFP und ein Tetrazyklininduktionssystem (Tet-On 3G) an das Protein dCas9 ohne Endonukleaseaktivität gekoppelt. Dieser Tet-On 3G-dCAS9-GFP-Komplex wird anschließend über eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) in den Zellkern geschleust und bindet über die sgRNA an die Ziel-DNA-Sequenz. Auf diese Weise modifizierte Zellen können anschließend mittels *live cell imaging* untersucht werden (Chen et al. 2013).

5.4 Die IL-1-induzierte Transkription von *IL8* und *IL6* in isogenen hTERT-RPE-1 Zellen ist heterogen

In Untersuchungen auf Einzelzellebene kann sowohl das Transkriptom einer Gesamtpopulation (Mittelwerte und Mediane) als auch die Transkriptmenge einzelner Zellen abgebildet werden. Die Darstellung der *IL8* mRNA-Signale pro Zelle als Häufigkeitsverteilung zeigt, dass die einzelnen Zellen der isogenen hTERT-RPE-1-Population nach IL-1-Stimulation unterschiedliche *IL8* mRNA-Mengen enthalten (vgl. Abb. 31B). Im Vorfeld wurde mehrfach beschrieben, dass die Menge der mRNA-Transkripte unterschiedlicher Gene in Zellen einer Population normalverteilt ist (Battich et al. 2015). Dies wurde als zelluläre Heterogenität bezeichnet (Finn et al. 2019; Nikopoulou et al. 2019).

Die *IL8* mRNA-Menge war in den hier beschriebenen Experimenten nicht normalverteilt, sondern wies zwei Subpopulationen nach IL-1-Stimulation auf: Diese Subpopulationen können entsprechend der Transkriptmenge als *low expressing* und *high expressing* Subpopulation bezeichnet werden. Nach einstündiger IL-1-Behandlung reagierten die Zellen am homogensten auf IL-1. Daher ist es vorstellbar, dass es sich bei der *low expressing* Subpopulation um Zellen handelte, in denen nach 0,5h noch keine *IL8* mRNA-Transkripte hergestellt worden waren und die nach 3h und 6h noch nie oder nicht mehr *IL8* mRNA exprimiert hatten. Zur Überprüfung dieser Vermutung wären *live-cell-imaging*-Experimente notwendig. Auch die Zahl der *IL6* mRNA-Signale pro Zelle war in der Gesamtpopulation heterogen. Hier teilten sich die Zellen ebenfalls nach einstündiger IL-1-Behandlung in zwei Subpopulationen, wenngleich dies im Vergleich zu *IL8* weniger stark ausgeprägt war (vgl. Abb. 31D). Die stimulusassoziierte, bimodale Verteilung der mRNA-Menge bestimmter Gene wurde bereits an unterschiedlichen Zellmodellen und nach verschiedenen Stimuli beschrieben: Zum ersten Mal wurde sie durch Shelek et al an Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten *bone marrow derived dendritic cells* mittels *single cell RNA-sequencing* und RNA-FISH für hunderte induzierbare Gene festgestellt. *House keeping* Gene wie Actin-B hingegen zeigten ein normalverteiltes Expressionsmuster, und auch einige

induzierbare Gene wiesen normalverteilte mRNA-Mengen auf. Die Autoren gingen daher von einer gewissen Genspezifität der zellulären Heterogenität aus. Als Ursache vermuteten sie zum einen eine unterschiedliche Reife der Zellen und zum anderen eine unterschiedliche Aktivität der die LPS-Reaktion vermittelnden *Signal transducer and Activators of Transcription-* (STAT) und *Interferon regulator factor -*(IRF) Signalwege (Shalek et al. 2013). Fischer et al. beobachteten an Makrophagen eine heterogene Reaktion auf LPS und Palmitat. Die Makrophagen zeigten nach der Stimulation entweder ein proinflammatorisches oder ein antiinflammatorisches Expressionsmuster oder eine geringe Reaktion. Die Stimulation mit LPS führte häufiger zu einem stark proinflammatorischen Expressionsmuster, wohingegen die Stimulation mit Palmitat eher zu einer antiinflammatorischen Genexpression führte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die genaue heterogene Reaktion stimulusabhängig ist und einen der Mechanismen darstellen kann, über den verschiedene Stimuli zu einer stimuluspezifischen Zellantwort führen (Fischer et al. 2019). In hTERT-RPE-1-Zellen zeigte Maßmann 2021 mit RNA-FISH ebenfalls eine IL-1 α -induzierte heterogene Anzahl der muren *IL8*- und *IL6*-Transkripte pro Zelle. Eine genauere Untersuchung dieser Heterogenität war hier nicht erfolgt. Dass die Menge der dort untersuchten *NFKBIA* mRNA im Vergleich zu *IL8* und *IL6* homogener verteilt war, deutet darauf hin, dass das Ausmaß der interzellulären Heterogenität der mRNA-Menge genspezifisch ist (Maßmann 2021). Zambrano et al. führten an mit TNF α -stimulierten Hela-Zellen RNA-FISH-Analysen mit Sonden für *IL6*, *NFKBIA* und *TNF*prä-mRNA und mRNA durch, um wie in dieser Arbeit aktive Transkriptionsorte und mRNA eines Gens zu visualisieren. Daraus ging hervor, dass die mRNA-Menge pro Zelle innerhalb der Gesamtpopulation starken Schwankungen unterlag. Auch hier war die interzelluläre Heterogenität genspezifisch. Weiterhin variierte bei Zambrano die Zahl der aktiven Transkriptionsstellen pro Zelle wie in dieser Arbeit. Trotz dem großen Ausmaß an interzellulärer Heterogenität trat die maximale Genexpression der Gesamtpopulation reproduzierbar *prompt* und zeitgleich nach 20 – 30-minütiger TNF α -Behandlung ein (Zambrano et al. 2020). Dies ist vergleichbar mit den hier vorliegenden Ergebnissen, da auch hier trotz deutlicher interzellulärer Heterogenität die maximale mittlere *IL8* und *IL6*-mRNA-Menge nach einstündiger Behandlung erreicht wurde. In der hier vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal eine klare Einteilung der Gesamtpopulation nach pro Zelle detektierten *IL8* Transkriptmengen in Subpopulationen vorgenommen. Allerdings machte Zambrano eine circa 40 % aller Zellen große Subpopulation aus, die als „*first responders*“ bezeichnet wurde, und die besonders schnell und besonders stark auf TNF α reagierte (Zambrano et al. 2020). Diese Population könnte der *high expressor*-Subpopulation, die in dieser Arbeit identifiziert wurde, entsprechen.

Die Entstehung der bimodalen Heterogenität der Genexpression induzierbarer Gene unter anderem im Rahmen von Immunreaktionen ist Thema der aktuellen Forschung. Eine der Ursachen ist vermutlich *transcriptional noise*. Dabei wird *extrinsic noise* von *intrinsic noise* unterschieden. *Extrinsic noise* wird durch Störfaktoren wie zum Beispiel die Lage im Zellverband, die Zellgröße oder die Zelldichte (Muldoon et al. 2020) oder die Position der Zellen im Zellzyklus verursacht (Handschick et al. 2014; Battich et al. 2015). *Intrinsic noise* beschreibt die Zufälligkeit der biochemischen Reaktionen im Rahmen der Transkription und Translation. Hierbei sind die Schritte *chromatin remodeling*, Transkription, post-transkriptionale Modifikationen, Translation, post-translationale Modifikationen und nukleozytoplasmatischer Transport entscheidend (Kizilirmak et al. 2022). Des Weiteren spielt die Chromatinstruktur eine besondere Rolle für die interzelluläre Heterogenität. Dies liegt insbesondere an der Bewegung des Chromatins im Raum, der Änderung der Chromatinposition im Rahmen des Zellzyklus und der Variabilität der Nukleosomenlokalisierung. Weiterhin ist die Bildung von Interaktionen über *Chromatin-Loops* und TADs sowie die Bildung von A/ und B-Kompartimenten heterogen und dynamisch (Devenish et al. 2021). Nicht zuletzt ist die zufällige Transkription von Feedback-Genen in *bursts* ebenfalls die Ursache einer variablen Genexpression, und damit zellulärer Heterogenität (Kellogg und Tay 2015). Darüber hinaus konnte sowohl in den hier vorliegenden Ergebnissen (Abb. 24) als auch durch Kizilirmak et al. eine heterogene und im Zeitverlauf der Stimulation mit TNF α dynamische Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern beobachtet werden (Kizilirmak et al. 2022).

Eine wichtige bislang noch nicht sicher beantwortete Frage ist, wie es trotz der zellulären Heterogenität und Variabilität, der an der Genexpression beteiligten Prozesse, zu einer stabilen und schnellen Reaktion einer Gesamtpopulation auf einen Stimulus kommt. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze: zum einen scheint nicht die absolute Menge von NF- κ B, sondern die relative Änderung der Menge des Transkriptionsfaktors für die Zellreaktion entscheidend zu sein (Lee et al. 2014). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Enhancer ihre Zielgene im Rahmen von Aggregationen auch ohne direkten Kontakt beeinflussen können und dass multiple Enhancer ein Zielgen regulieren. Dabei ist die gleichzeitige Interaktion mit allen Enhancern für die Transkription nicht erforderlich (Osterwalder et al. 2018). Außerdem wird vermutet, dass präformierte Enhancer-Promoter-Kontakte und Nukleosomenpositionen eine schnelle Induktion der Transkription ermöglichen (Devenish et al. 2021).

Die genaue funktionelle Relevanz der zellulären Heterogenität im Rahmen der Immunreaktion ist noch ungeklärt. Heterogenität und Variabilität können an sich zu stabilen Expressionsmustern führen, indem sich Unterschiede mitteln (Finn und Misteli 2019). Es wird aktuell vermutet, dass die zelluläre Heterogenität dem Immunsystem ermöglicht besonders flexibel auf immer neue und sich ebenfalls

weiterentwickelte potentielle Noxen zu reagieren (Kizilirmak et al. 2022; Finn und Misteli 2019). Da sie allerdings auch eine mögliche Quelle von Überreagibilität und Fehlreaktion ist, ist sie ein Risikofaktor für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, oder die Karzinogenese (Kizilirmak et al. 2022).

5.5 Koppelung von Zellgröße und IL-1-induzierter mRNA-Transkription

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit gezeigte Heterogenität der IL-1 abhängigen Expression von *IL8* und *IL6* erfolgte die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen der Größe von Zellkernen und Zytoplasmata mit der transkriptionellen Reaktion der Einzelzellen durch verschiedene fluoreszenzmikroskopische Verfahren (vgl. Kapitel 4.6.2). Dabei gelang es einen reproduzierbaren Zusammenhang zwischen der Kern- bzw. Zytoplasmafläche und der IL-1-induzierten *IL8* mRNA-Menge einer Zelle zu beschreiben (vgl. Kapitel 4.6 und 4.7). Im Vorfeld wurde bereits für verschiedene Gene beobachtet, dass die Transkriptmenge einer Zelle mit ihrer Zell- und Zellkerngröße korreliert. Dieser Zusammenhang wird als *size scaling* bezeichnet (Berry und Pelkmans 2022). Besonders gut wurde der Zusammenhang in verschiedenen Säugetierzelllinien und einer Froschzelllinie für die Gesamttranskriptmenge (Sato et al. 1994; Battich et al. 2015; Berry et al. 2022) und für die Expression konstitutiv aktiver Gene untersucht (Kempe et al. 2015; Sun et al. 2020; Padovan-Merhar et al. 2015). In Hefezellen wurde aber auch für die induzierbaren Gene *urg1* und *sib1* *size scaling* gezeigt (Sun et al. 2020). Bisher wird vermutet, dass *size scaling* die Aufrechterhaltung der Zellfunktion unterschiedlich großer Zellen ermöglicht, indem die Konzentration der meisten Moleküle einer Zelle im Rahmen von *size scaling* konstant bleibt (Padovan-Merhar et al. 2015; Kempe et al. 2015).

Der hier beschriebene Zusammenhang zwischen *IL8* mRNA-Menge und Kern- bzw. Zytoplasmafläche bedeutet, dass die Zellen entsprechend ihrem individuellen Zustand auf proinflammatorische Mediatoren individuell reagieren. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte durch Kramer et al. an humanen Epithelzellen beschrieben werden, die zeigten, dass einzelne Zellen je nach Vorzustand der Zellen (Lage im Zellverband, Größe, Position im Zellzyklus, Expression bestimmter Proteine) individuell auf den Wachstumsfaktor *epithelial growth factor* (EGF) reagierten (Kramer et al. 2022). Im Bezug auf Entzündungsreaktionen zeigten Muldoon et al., dass die TNF α -Expression von Makrophagen nach Stimulation mit LPS mit der Zelldichte zusammenhängt (Muldoon et al. 2020). Für proinflammatorische Gene wie *IL8*, *CXCL2*, *IL6*, *IL-1* oder IL-1-Zielgene, die über negative *feedback-loops* die Entzündungsreaktion begrenzen (z.B. *NFkBIA*), wurde *size scaling* bisher nicht beschrieben. Eine Untersuchung des *size scaling* im Rahmen der Reaktion der Zellen auf Stimuli ist bisher sonst nicht erfolgt. Die Beschreibung von *size scaling* für *IL8* führt zu einer Reihe weiterer Fragen, die das *size scaling* im Rahmen einer Entzündungsreaktion betreffen: Bleibt die Gesamt-mRNA einer Zelle im Rahmen einer Entzündungsreaktion konstant, indem die mRNA hochregulierter Gene der mRNA herunterregulierter Gene entspricht oder geht sie, entgegen der bisherigen Beobachtungen, mit einer erhöhten intrazellulären mRNA-Konzentration einher? Wenn ja, was bedeutet eine solche Unterbrechung der Homöostase für chronische Entzündungen? Wie verhält sich die mRNA anderer IL-1-Zielgene zur Kern-/ Zellgröße?

Sowohl die basale *IL8* mRNA-Menge, die *IL8* mRNA-Menge in der *low expressing* Subpopulation als auch die *IL6* und *CXCL2* mRNA-Menge hingen nicht mit der Kern- bzw. Zytoplasmafläche zusammen (vgl. Kapitel 4.6. und 4.7.). Dies wirft die Fragen auf, ob es sich bei dem Zusammenhang bei induzierbaren Genen um ein für *IL8* spezifisches Phänomen handelt, ob der Zusammenhang an eine bestimmte Transkriptmenge gekoppelt ist oder ob ein ebenfalls existierender Zusammenhang bei niedrigen Transkriptmengen nicht so gut detektiert werden kann. Bisher wurde angenommen, dass die Transkriptmengen der meisten Gene in gewisser Weise mit der Zellgröße korrelieren, da bis jetzt nur von wenigen Genen gezeigt wurde, dass zwischen ihren Transkriptmengen und der Zellgröße kein Zusammenhang besteht. Hierzu gehören Gene, die für einige Histonproteine codieren, und *WHI5*, ein Gen, dessen Protein Zellzyklus und Zellgröße beeinflusst (Swaffer et al. 2021). Weiterhin wurde in Hefen gezeigt, dass *size scaling* mit der Aktivität der RNA-Polymerase II, und damit mit der gesamten Transkription, zusammenhängt (Swaffer et al. 2023). Allerdings wird ebenso angenommen, dass die Transkriptmenge einer Zelle neben der Zell(kern)größe noch durch weitere Faktoren determiniert wird und dass die Stärke der Korrelation verschiedener Gene unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Padovan-Merhar et al. 2015).

Eine weitere wichtige Frage ist, welcher Mechanismus hinter dem *size scaling* für *IL8* steckt. Da die DNA-Menge nicht mit der Zellgröße wächst, hat *size scaling* zur Folge, dass unterschiedliche Mengen RNA anhand einer konstanten Menge DNA gebildet werden müssen. Dies kann entweder durch an die Zellgröße angepasste mRNA-Syntheseraten oder mRNA-Abbauraten geschehen (Padovan-Merhar et al. 2015). Verschiedene Autoren untersuchten in Hefe- und Säugetierzellen die mRNA-Abbauraten mehrerer konstitutiv exprimierter Gene im Zusammenhang mit der Zellgröße, was ergab, dass sich die Abbauraten verschieden großer Zellen nicht signifikant voneinander unterscheiden. Also scheint der mRNA-Abbau für die untersuchten Gene keine entscheidende Rolle für *size scaling* zu spielen (Sun et al. 2020; Padovan-Merhar et al. 2015; Berry et al. 2022). Padovan-Merhar untersuchte die globale Transkriptionsrate in primären humanen Fibroblasten im Zusammenhang mit dem Zellvolumen und zeigte, dass die beiden Faktoren linear miteinander korrelierten. Hieraus folgte,

dass die globalen Transkriptmengen über eine entsprechende Steigerung der Transkriptionsraten an die Zellgröße in humanen Fibroblasten angepasst werden (Padovan-Merhar et al. 2015). Die *IL8* mRNA-Synthese wird nach der Stimulation durch proinflammatorische Mediatoren auf verschiedensten Ebenen reguliert: Bindung von IL-1 an den IL-1-Rezeptor, die zytoplasmatische Signalkaskade, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, die Initiation der Transkription und die Elongation, die mRNA-Prozessierung, die mRNA-Stabilisierung und der nukleozytoplasmatische Transport der mRNA (Priester et al. 2022). Eine Koregulation von Kern- / Zytoplasmagröße und *IL8*-Expression könnte auf jeder dieser Ebenen erfolgen. In dieser Arbeit wies die Untersuchung des Zusammenhangs der p65-Gesamtintensität mit der Kernfläche (Abb. 37) sowie die genauere Analyse der *IL8* mRNA-Verteilung auf Zellkern und Zytoplasma und der Größe dieser beiden Kompartimente darauf hin, dass nukleäre Prozesse eine größere Rolle für das *IL8 size scaling* spielten als zytoplasmatische (vgl. Abb. 40). Hier kommen Chromatin-Organisation, Transkription, prä-mRNA-Stabilisierung oder der mRNA-Export in Frage. Eine Assoziation des Vorkommens aktiver Transkriptionsstellen für *IL8* und der Stärke des *size scaling* für die *IL8* mRNA zeigte sich in den hier beschriebenen Experimenten nicht (vgl. Abb 41). Dies ist mit den Beobachtungen von Berry et al. aus einem *genome-wide genetic perturbation screening* und mathematischer Modellierung an Säugetierzellen kongruent, nach denen eine Erhöhung der nukleären mRNA-Menge über eine Veränderung des intranukleären mRNA-Abbaus oder des mRNA-Exports zu einer Verringerung der RNA-Polymerase II-Aktivität und Menge führte. Auf diese Weise konnten im Sinne eines negativen *feedback-loops* stabile intranukleäre mRNA-Konzentrationen erreicht werden (Berry et al. 2022). Diese Arbeitsgruppe analysierte allerdings nur die gesamt-mRNA-Menge. Eine wichtige offene Frage im Rahmen einer Entzündungsreaktion bleibt also wie sich die gesamt-mRNA-Menge und die mRNA-Mengen nicht IL-1-regulierter Gene verhalten, wenn die Menge der mRNA verschiedenerer IL-1-induzierter Gene nach IL-1-Behandlung stark ansteigen.

Außerhalb des Zellkerns käme außerdem eine Mitbeteiligung des *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Signalweges am *size scaling* in Frage. Bei mTOR handelt es sich um eine Proteinkinase, welche besonders in der Steuerung von Zellwachstum und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass mTOR über eine Regulation der Translation die Zellgröße stark beeinflusst (Fingar et al. 2002; Lloyd 2013). Es konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Mediatoren wie TNF α und IL-1 über die Aktivierung der IKK β zu einer Aktivierung des mTOR Signalweges führen können (Lee et al. 2007).

Abschließend zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der radialen Position aktiver *IL8*- und *IL6*-Genloci bzw. den in einer Zelle gemessenen interallelicen bzw. interchromosomalen Distanzen und der Kernfläche (vgl Kapitel 4.6.4) und damit kein Hinweis auf einen Einfluss der Chromatinstruktur auf das *size scaling*.

Zur Beantwortung der oben beschriebenen Fragen sind weitere Versuche erforderlich. Hierfür können Ansätze verwendet werden, die zum einen die Gesamt-mRNA-Menge und zum anderen die mRNA-Menge verschiedener IL-1-Zielgene mit proinflammatorischer und antiinflammatorischer Wirkung, sowie von *house keeping* Genen auf Einzelzellebene im Zusammenhang mit der Zellzyklusposition und der Zellgröße erfassen. In einem methodischen Ansatz ist durch die Erstellung von Proteinkarten durch *iterative indirect immunofluorescence imaging* (4i) möglich (Gut et al. 2018). Weiterhin könnte die in RNA-FISH-Experimenten die mRNA-Menge zeitgleich mit der RNA-Polymerase II Menge und Aktivität dargestellt werden. Zur weiteren Spezifizierung des Mechanismus des *size scaling* könnten die potentiell ursächlichen Prozesse systematisch gehemmt werden und anschließend RNA-FISH Experimente erfolgen: Die Transkription könnte unspezifisch durch das Antibiotikum Actinomycin D gehemmt werden, etwas spezifischer könnte die Hemmung der RNA-Polymerase II durch α -Amanitin erfolgen (Heinrich et al. 2022). Die Verminderung der Expression einzelner Gene, wie zum Beispiel *IL8* oder *IL6*, könnte durch den CRISPR-Cas9-vermittelten *knockdown* oder *knockout* erfolgen (Chen et al. 2013; Weiterer et al. 2020). Die Hemmung des generellen nukleozytoplasmatischen Exports kann durch den Exportin-1-Inhibitor Leptomycin B erfolgen (Ferreira et al. 2020). Die Rolle der p38 MAPK-vermittelten mRNA-Stabilisierung könnte über die siRNA-vermittelte Veränderung oder den knockout der AU-reichen Elemente in IL-1-induzierbaren Genen oder über konstitutiv aktive p38 MAPK weiter untersucht werden (Winzen et al. 1999). Zur weiteren Untersuchung auf eine Beteiligung des mTOR-Signalwegs könnten RNA-FISH-Experimente an mit Rapamycin behandelten Zellen erfolgen (Fingar et al. 2002).

Klinisch könnte der Zusammenhang der Zell- und Zellkerngröße mit der Entzündungsaktivität einer Zelle als weiteres *Tool* zur pathologischen Detektion von entzündlich verändertem Gewebe genutzt werden. Bisher wird chronische und hochakute Entzündung in der histologischen Untersuchung von Zellpräparaten an der Infiltration des Gewebes durch Zellen des Immunsystems, Zellnekrosen und der Entstehung von Ödemen festgestellt (Grundmann et al. 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch nicht-immunologische Zellen wie Epithelzellen stark auf proinflammatorische Stimuli reagieren. Somit scheint die alleinige Infiltration von Immunzellen nur ein, aber nicht der alleinige Parameter zu sein, der eine inflammatorische Reaktion eines Gewebes definiert. In Zukunft könnten ergänzend zu den herkömmlichen Verfahren bei Verdacht auf neoplastische Gewebeveränderungen oder bei Verdacht auf

autoimmun- oder erregervermittelte Entzündungen, wie zum Beispiel Myositiden, Kollagenosen, Vaskulitiden, Arthritiden, Endokarditiden, RNA-FISH-Experimente durchgeführt werden, um die *IL8* mRNA-Menge der Zellen zu bestimmen. Bei genauer Definition von durchschnittlichen Kerngröße der spezifischen Gewebe könnten darüber hinaus, überdurchschnittliche Vergrößerungen der Zellkerne als indirekter Marker für eine hohe inflammatorische Reaktion herangezogen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals ein signifikanter und reproduzierbarer Zusammenhang zwischen dem Zellstatus (im Sinne der Kern- und Zellgröße) und der IL-1 induzierten mRNA-Menge für das Chemokin *IL8* gezeigt werden. Dass einzelne Zellen ein individuelles Transkriptom entsprechend der individuellen Situation aufweisen, ist eine neue Dimension der Regulation der Genexpression (Kramer et al. 2022). Sie bietet die Chance einer flexiblen Reaktion des Immunsystems auf neue potenzielle Noxen, ist auf der anderen Seite aber auch eine mögliche Fehlerquelle. Da mit einem größeren Zellkern assoziierte Malignomzellen auch oft eine konstitutive *IL8*-Expression aufweisen (Xie 2001), kann dieser Befund ein erster Hinweis auf einen Mechanismus sein, der zur Verschiebung des Kern-/ Zytosplasmaverhältnisses in malignen Tumorzellen führt. Das Zustandekommen und vor allem die Regulation der individuellen Zellreaktion ist also ein wichtiges Thema der zukünftigen Forschung.

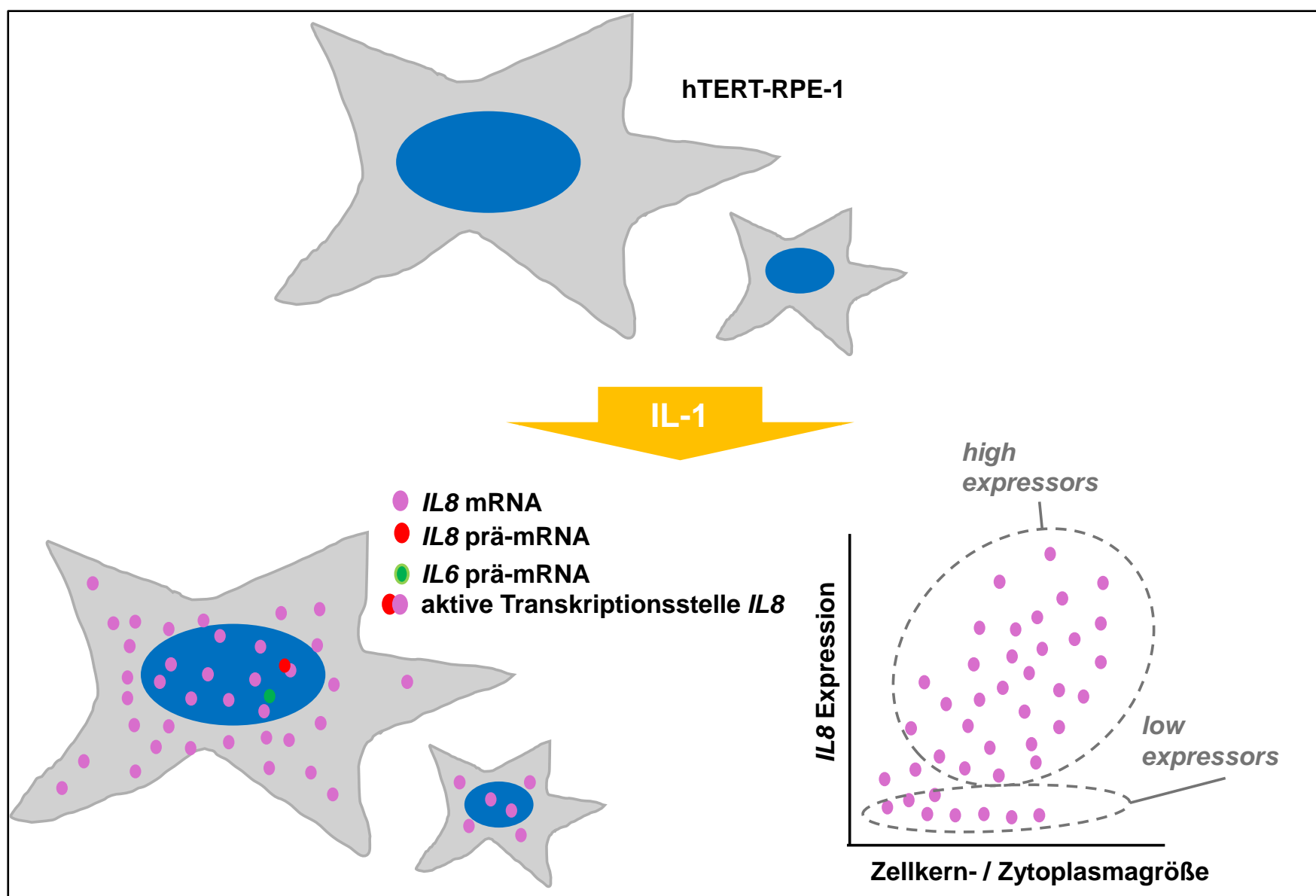


Abbildung 56: Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse

6 Zusammenfassung

Interleukin 1 (IL-1) ist einer der zentralen Mediatoren von Entzündungsreaktionen und unter anderem an der Pathogenese von rheumatischen Erkrankungen, Atherosklerose und neurogenerativen Erkrankungen, der Karzinogenese, sowie lokalen und systemischen Reaktionen auf Pathogene beteiligt. Für die Etablierung gezielter Therapiekonzepte ist die Kenntnis des IL-1-Signalweges daher von zentraler Bedeutung. IL-1 löst über den Interleukin Rezeptor 1 eine intrazelluläre Signalkaskade aus, an deren Ende die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor κ B* und *activator protein 1* steht. Hierbei wird offenbar die Gentranskription nicht nur durch die lokale Aktivität solcher Transkriptionsfaktoren, sondern auch durch die (räumliche) Organisation des Chromatins reguliert. Wie genau die IL-1-induzierte Genexpression durch die Chromatinorganisation orchestriert wird, ist ein Thema der aktuellen Forschung. In dieser Arbeit wurde mittels 2D und 3D RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (RNA-FISH) an humanen, immortalisierten diploiden Epithelzellen der Retina (hTERT-RPE-1) untersucht, ob sich die radialen Positionen aktiver Genloci und Transkriptionsstellen der Gene *IL8*, *CXCL2* und *IL6* im Rahmen der IL-1-Signaltransduktion verändern. Aufgrund der zeitlichen Koregulation der Transkription dieser Gene wurde weiterhin untersucht, ob interallelische und interchromosomale Distanzen zwischen den aktiven Genloci im Rahmen einer IL-1 Stimulation moduliert werden. Zusammengefasst konnte allerdings keine Evidenz für eine signifikante Änderung der radialen Position im nukleären Raum oder eine Änderung der interallelischen und interchromosomalen Distanzen als Hinweis auf eine räumliche Koregulation dieser IL-1-Zielgene festgestellt werden.

Neben der Chromatinorganisation scheint auch die Kern- bzw. Zellgröße mit dem Transkriptom einer Zelle assoziiert zu sein, was als *size scaling* bezeichnet wird. In dieser Arbeit erfolgte erstmals eine Untersuchung eines putativen Zusammenhangs der IL-1-induzierten Genexpression der Gene *IL8*, *IL6* und *CXCL2* mit der Kern- und Zellgröße mittels Immunfluoreszenz und 2D und 3D (Immuno-) RNA-FISH in hTERT-RPE-1-Zellen. Immunfluoreszenzexperimente konnten zunächst keine signifikante und reproduzierbare Änderung der Kern- oder Zellgröße in IL-1-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigen. Detaillierte Einzelzelluntersuchungen ergaben allerdings einen signifikanten und genspezifischen Zusammenhang der IL-1-induzierten *IL8* mRNA-Expression mit der Kern- und Zellgröße, welcher für *IL6* und *CXCL2* nicht beobachtet werden konnte. Die Reaktion einer Zelle auf einen Stimulus scheint also zumindest für das *IL8*-Gen individuell mit ihrem aktuellen Zustand zusammenzuhängen. Die Möglichkeit, die inflammatorische Reagibilität einer Zelle anhand von Parametern wie individuelle Zellgröße und Genexpression zu bestimmen und so über die Infiltration proinflammatorischer Zellen hinaus entzündlich verändertes Gewebe zu erkennen, könnte langfristig zu neuen diagnostischen Ansätzen in der Pathologie führen. Außerdem zeigen diese Befunde, dass eine hohe interzelluläre Variabilität isogener Zellpopulationen eine stabile, schnelle und flexible Reaktion auf proinflammatorische Mediatoren ermöglicht.

7 Summary

Interleukin 1 (IL-1) is one of the central mediators of inflammatory reactions and is involved in the pathogenesis of rheumatic diseases, atherosclerosis and neurogenerative diseases, carcinogenesis, as well as local and systemic reactions to pathogens. Knowledge of the IL-1 signaling pathway is therefore of central importance for the establishment of targeted therapy concepts. IL-1 triggers an intracellular signaling cascade via the interleukin receptor 1. At their end of which the transcription factors nuclear factor κ B and activator protein 1 are activated.

It appears that gene transcription is not only regulated by the local activity of such transcription factors, but also by the (spatial) organization of the chromatin. How exactly IL-1-induced gene expression is orchestrated by chromatin organization is a topic of current research. In this study, 2D and 3D RNA fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH) of human immortalized diploid retinal epithelial cells (hTERT-RPE-1) was used to investigate whether the radial positions of active gene loci and transcription sites of the genes *IL8*, *CXCL2* and *IL6* change in the context of IL-1 signal transduction. Based on the temporal co-regulation of the transcription of these genes, it was further investigated whether interallelic and interchromosomal distances between the active gene loci are modulated in the context of IL-1 stimulation. In summary, however, in this thesis no evidence was found for a significant change in the radial position in nuclear space or a change in the interallelic and interchromosomal distances as an indication of spatial co-regulation of these IL-1 target genes.

In addition to chromatin organization, nuclear or cell size also appears to be associated with the transcriptome of a cell, a phenomenon referred to as size scaling. In this work, a putative correlation of IL-1-induced gene expression of the genes *IL8*, *IL6* and *CXCL2* with nuclear and cell size was investigated for the first time using 2D immunofluorescence as well as 2D and 3D (immuno-) RNA-FISH in hTERT-RPE-1 cells. Immunofluorescence experiments initially showed no significant and reproducible change in nuclear or cell size in IL-1-stimulated cells compared to untreated cells. However, detailed single-cell studies revealed a significant and gene-specific correlation of IL-1-induced

IL8 mRNA expression with nuclear and cell size, which could not be observed for *IL6* and *CXCL2*. The response of a cell to a stimulus thus appears to be individually related to its current state of activation, at least for the *IL8* gene. The possibility of determining the inflammatory responsiveness of a cell being based on parameters such as individual cell size and gene expression and thus recognizing inflammatory tissue beyond the infiltration of pro-inflammatory cells could lead to new diagnostic approaches in pathology in the long term. In addition, these findings show that a high intercellular variability of isogenic cell populations enables a stable, rapid and flexible response to proinflammatory mediators.

8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AG	Arbeitsgruppe
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
ATF	activating transcription factor
ATS	Aktive Transkriptionsstelle
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CBP	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
CRM1	Chromatin Maintenance Region 1
CT	chromosome territories
CTCF	CCCTC-binding factor
CXCL2	C-X-C motif ligand 2
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
Cy	Cyanin
DAMPs	damage or danger associated molecular patterns
DL488	dylight 488
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetal Bovine Serum
gt	Ziege
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hTERT	humane Telomerase Reverse Transcriptase
hTERT-RPE-1	humane Telomerase Immortalisierte Retinale Pigmentierte Epithelzellen Typ 1
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IF	indirekte Immunfluoreszenz
IKK	IκB kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-1-R1	IL1-receptor type 1
IL-1-R3	IL1-receptor type 3
IL-1α	Interleukin 1 alpha
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL8	Interleukin 8
INFβ	Interferon β
IQA	Interquartilsabstand
IRAKs	IL-1-receptor-associated kinases
IκB	inhibitor of nuclear factor κB
JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
K-/Z-Verhältnis	Kern- / Zytoplasmaverhältnis
LADs	lamin-associated domains
LASX	Leica Application Suite X
LINC	Linker of nukleoskeleton and cytoskeleton
m	Meter
MAPK	mitogen activated protein kinases
MAP-KKKs	mitogen activated protein kinase kinase kinases
MKK	mitogen activated kinases
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Maus

MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
n	Stichprobengröße
NEMO	NF- κ B essential modifier
NES	nuclear export sequences
NF- κ B	nuclear factor- κ B
ng	Nanogramm
NLS	nuclear localization sequence
NRE	negativ regulierende Element
NRF	NF- κ B-repressing factor
OCT-1	octamer 1
p	Signifikanzwert
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
prä-mRNA	prä-messenger RNA
px	Pixel
rb	Kaninchen
RBPs	RNA binding proteins
RHD	Rel homology domain
RNA-FISH	RNA-Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
ROI	Region Of Interest
rpm	Runden pro Minute
SWI/SNF	SWItch/sucrose nonfermentable
TAB	TAK-1-binding proteins
TAD	topologically associated domain
TAK-1	transforming growth factor-beta (TGF β)-activated kinase 1
TBP	TATA box binding protein
TFIID	transcriptionfactor IID
TGF β	tumor-growth-factor β
TIR	Toll- und IL-1-like
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TRAF-6	tumor necrosis factor-associated factor 6
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung wichtiger Regulationsschritte des IL-1-Signalweges.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Zellkerns.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Chromatinorganisation im Zellkern.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Induktion der Transkription am IL-8-Promotor.	9
Abbildung 5: Vorangehende Ergebnisse aus Immuno-DNA-FISH: stimulusinduzierte Vergrößerung des Kernvolumens und Verringerung der Distanz zwischen interchromosomalen Genloci.	14
Abbildung 6: Definition der Zellgrenzen mit Icy Bioimaging Software.	20
Abbildung 7: Definition der Kerngrenzen mit der Icy Bioimaging Software.	22
Abbildung 8: Detektion der mRNA-Signale pro Zelle mit der Icy Bioimaging Software.	24
Abbildung 9: Visualisierung der Vorannahmen für die Detektion von prä-mRNA-Signalen und die Berechnung intranukleärer Distanzen.	25
Abbildung 10 Erfassung der prä-mRNA Signale mit Icy Bioimaging Software.	26
Abbildung 11: Erfassung von Koloalisationen mit Icy Bioimaging Software.	28
Abbildung 12: Auswahl der z-Schicht, in der die mRNA am schärfsten war.	30
Abbildung 13: Entfernung des Phasenkontrasts.	31
Abbildung 14: Einstellungen für die 3D deconvolution zur Erhöhung der Bildschärfe	31
Abbildung 15: Reduktion der Autofluoreszenz in 3D Mikroskopaufnahmen.	32
Abbildung 16: Ausschneiden einzelner Zellkerne für die 3D Analyse.	33
Abbildung 17: Analyse der Zellkerne in 3D mit Leica LASX-Software.	34
Abbildung 18: Messung der Kernvolumina, Koordinaten des Kernzentrums und der Koordinaten der prä-mRNA-Signale.	35
Abbildung 19: Validierung der Analysemethoden der Kerngröße mit Leptomycin B.	39
Abbildung 20: Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz zur Untersuchung des Einflusses von IL-1 α auf den Phänotyp von hTERT-RPE-1-Zellen.	41
Abbildung 21: Beeinflussung der Kernfläche in hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.	42
Abbildung 22: Untersuchung der Beeinflussung der Zytoplasmafläche von hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.	43
Abbildung 23: Untersuchung der Beeinflussung des K-/Z-Verhältnisses von hTERT-RPE-1-Zellen durch IL-1.	43
Abbildung 24: Die Gesamtintensität von Cy3 im Zellkern als indirektes Maß für die Stärke der Reaktion einer Zelle auf IL-1	44
Abbildung 25: Schematische Darstellung der topologisch assoziierten Domäne TAD für IL8, CXCL1, CXCL2 und CXCL3	45
Abbildung 26: Darstellung der Zytokin-regulierten IL8 mRNA, der Lokalisation von aktiven IL8- und IL6-Genen und der ATS von IL8.	46
Abbildung 27: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Genloci für IL8 und IL6 relativ zur Gesamtpopulation.	47
Abbildung 28: Darstellung der Zytokin-regulierten IL6 mRNA, der Lokalisation von aktiven CXCL2- und IL6-Genen und der ATS von IL6.	48
Abbildung 29: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Genloci für CXCL2 und IL6 relativ zur Gesamtpopulation.	49
Abbildung 30: Quantifizierung der Zytokin-abhängig regulierten aktiven Transkriptionsstellen (ATS) für die Genloci von IL8 und IL6.	50
Abbildung 31: Quantifizierung der IL8 und IL6 mRNA-Signale pro Zelle in IL-1 stimulierten hTERT-RPE1-Zellen	52

Abbildung 32: Quantifizierung der IL8 und IL6 mRNA-Menge in einzelnen Zellen in Abhängigkeit des Vorliegens aktiver Transkriptionsorte.....	54
Abbildung 33: Untersuchung radialer Positionen von aktiven Genen und aktiven Transkriptionsstellen (ATS) auf Chromosom 4.....	57
Abbildung 34: Radiale Position von aktiven Genen und ATS auf Chromosom 7.....	59
Abbildung 35: Untersuchung interallelischer Distanzen in Zellen mit biallelischer Genexpression.....	61
Abbildung 36: Untersuchung interchromosomaler Distanzen zwischen aktiven Genloci auf den Chromosomen 4 und 7.....	63
Abbildung 37: Untersuchung des Zusammenhangs der Stärke der p65 Translokation mit der Kernfläche nach IL-1 Stimulation.....	65
Abbildung 38: Untersuchung des Zusammenhangs von Kernfläche und mRNA-Menge in Zytokin-stimulierten Zellen.....	67
Abbildung 39: Untersuchung des Zusammenhangs von Zytoplasmafläche und mRNA-Menge.....	69
Abbildung 40: Untersuchung des Einflusses der Lokalisation der IL8 mRNA-Signale auf den Zusammenhang von IL8 mRNA-Menge und der Zellfläche.....	71
Abbildung 41: Untersuchung des Einflusses der aktiver Transkriptionsstellen auf den Zusammenhang von IL8 mRNA-Menge und der Kernfläche.....	73
Abbildung 42: Untersuchung des Zusammenhangs von Kernfläche und Position der aktiven Genloci von IL8 und IL6 im nukleären Raum.....	74
Abbildung 43: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für IL8 mRNA, IL8 prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.....	76
Abbildung 44: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für IL6 mRNA, IL6 prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.....	77
Abbildung 45: Repräsentative Bilder der Immuno-RNA-FISH mit Sonden für CXCL2 mRNA, CXCL2 prä-mRNA und Primärantikörpern gegen Lamin A/C.....	78
Abbildung 46: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Kernfläche und mRNA-Menge einer Zelle mittels Immuno-RNA-FISH.....	79
Abbildung 47: Repräsentative Zellen angefärbt mit RNA-FISH, mikroskopiert in 3D und dargestellt in der schärfsten Ebene.....	81
Abbildung 48: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für IL8 mRNA, IL8 prä-mRNA und CXCL2 prä-mRNA I.....	82
Abbildung 49: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für IL8 mRNA, IL8 prä-mRNA und CXCL2 prä-mRNA II.....	83
Abbildung 50: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für IL6 mRNA, IL6 prä-mRNA und IL8 prä-mRNA I.....	84
Abbildung 51: Repräsentative Bilder aus der 3D RNA-FISH mit Sonden für IL6 mRNA, IL6 prä-mRNA und IL8 prä-mRNA II.....	85
Abbildung 52: Kernvolumen von hTERT-RPE1-Zellen ermittelt über die Hoechst-Färbung in 3D RNA-FISH.....	86
Abbildung 53: Betrachtung des Kernvolumens und der mRNA-Menge unter Berücksichtigung der Zellzyklusphase.....	87
Abbildung 54: Quantifizierung der aktiven Genloci für IL8 und CXCL2 relativ zur Gesamtpopulation.....	88
Abbildung 55: Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der mRNA-Menge und dem Kernvolumen.....	89
Abbildung 56: Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	100
Abbildung 57: Häufigkeitsverteilungen zur Untersuchung des Phänotyps von hTERT-RPE1-Zellen nach IL-1-Stimulation ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung.....	115
Abbildung 58: Vergleich der, über die Signal-Anzahl gemessenen, mRNA-Menge mit der, über die Intensität gemessenen, mRNA-Menge.....	116
Abbildung 59: Relative Häufigkeiten radialer Positionen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung.....	117
Abbildung 60: Relative Häufigkeiten interallelischer und interchromosomaler Distanzen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung.....	118
Abbildung 61: Bestimmung der Kernfläche, Zytoplasmafläche und des Kern- / Zytoplasmaverhältnisses der Gesamtpopulation erfasst in 2D RNA-FISH über die Hoechst-Färbung.....	118
Abbildung 62: Darstellung der in der Immuno-RNA-FISH gemessenen CXCL2 mRNA-Menge und der Kerngröße.....	119
Abbildung 63: Herleitung der Fluoreszenzgrenzen für die Bestimmung der Zellzyklusphasen in 3D RNA-FISH.....	120
Abbildung 64: Quantifizierung aktiver Genloci für IL8 und IL6 in 3D RNA-FISH.....	120
Abbildung 65: Darstellung der in 3D RNA-FISH gemessenen Distanzen zum Kernzentrum und zueinander.....	121

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die durchschnittliche Zellgröße verschiedener Zelltypen gemessen an ihrem Durchmesser.....	6
Tabelle 2: Übersicht über mit verschiedenen Methoden erfasste Kerngrößen.....	122

11 Literaturverzeichnis

ABDALLA, FATHI B. ELMABROUK; MARKUS, RABIA; BUHMEIDA, ABDELBASET; BODER, JAMELA; SYRJÄNEN, KARI; COLLAN, YRJÖ (2012): Estrogen receptor, progesterone receptor, and nuclear size features in female breast cancer in Libya: correlation with clinical features and survival. In: *Anticancer Research* 32 (8), S. 3485–3493. Online verfügbar unter <https://ar.iijournals.org/content/32/8/3485>.

Akhtar, Asifa; Gasser, Susan M. (2007): The nuclear envelope and transcriptional control. In: *Nature reviews. Genetics* 8 (7), S. 507–517. DOI: 10.1038/nrg2122.

Alfaro, Carlos; Sanmamed, Miguel F.; Rodríguez-Ruiz, María E.; Teijeira, Álvaro; Oñate, Carmen; González, Álvaro et al. (2017): Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. In: *Cancer treatment reviews* 60, S. 24–31. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.08.004.

Angerer, Lynne M.; Angerer, Robert C. (1991): Chapter 2 Localization of mRNAs by in Situ Hybridization. In: *Functional Organization of the Nucleus: A Laboratory Guide*, Bd. 35: Elsevier (Methods in Cell Biology), S. 37–71.

- Arenzana-Seisdedos, F.; Turpin, P.; Rodriguez, M.; Thomas, D.; Hay, R. T.; Virelizier, J. L.; Dargemont, C. (1997): Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. In: *J Cell Sci* 110 (Pt 3), S. 369–378. DOI: 10.1242/jcs.110.3.369.
- Ashburner, B. P.; Westerheide, S. D.; Baldwin, A. S. (2001): The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (20), S. 7065–7077. DOI: 10.1128/MCB.21.20.7065-7077.2001.
- Bachelier, Françoise; Ben-Baruch, Adit; Burkhardt, Amanda M.; Combadiere, Christophe; Farber, Joshua M.; Graham, Gerard J. et al. (2014): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. corrected. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. In: *Pharmacological reviews* 66 (1), S. 1–79. DOI: 10.1124/pr.113.007724.
- Bacher, Susanne; Meier-Soelch, Johanna; Kracht, Michael; Schmitz, M. Lienhard (2021): Regulation of Transcription Factor NF-κB in Its Natural Habitat: The Nucleus. In: *Cells* 10 (4), S. 753. DOI: 10.3390/cells10040753.
- Banfalvi, Gaspar (2011): Overview of cell synchronization. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 761, S. 1–23. DOI: 10.1007/978-1-61779-182-6_1.
- Barboric, M.; Nissen, R. M.; Kanazawa, S.; Jabrane-Ferrat, N.; Peterlin, B. M. (2001): NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. In: *Molecular Cell* 8 (2), S. 327–337. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00314-8.
- Bass, Victor L.; Wong, Victor C.; Bullock, M. Elise; Gaudet, Suzanne; Miller-Jensen, Kathryn (2021): TNF stimulation primarily modulates transcriptional burst size of NF-κB-regulated genes. In: *Molecular Systems Biology* 17 (7), e10127. DOI: 10.15252/msb.202010127.
- Battich, Nico; Stoeger, Thomas; Pelkmans, Lucas (2015): Control of Transcript Variability in Single Mammalian Cells. In: *Cell* 163 (7), S. 1596–1610. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.018.
- Baud, V.; Liu, Z. G.; Bennett, B.; Suzuki, N.; Xia, Y.; Karin, M. (1999): Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. In: *Genes & Development* 13 (10), S. 1297–1308. DOI: 10.1101/gad.13.10.1297.
- Berry, Scott; Müller, Micha; Rai, Arpan; Pelkmans, Lucas (2022): Feedback from nuclear RNA on transcription promotes robust RNA concentration homeostasis in human cells. In: *Cell systems* 13 (6), 454-470.e15. DOI: 10.1016/j.cels.2022.04.005.
- Berry, Scott; Pelkmans, Lucas (2022): Mechanisms of cellular mRNA transcript homeostasis. In: *Trends in cell biology* 32 (8), S. 655–668. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.05.003.
- Bhatt, Dev; Ghosh, Sankar (2014): Regulation of the NF-κB-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. In: *Front. Immunol.* 5, S. 71. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00071.
- Bian, Zong-Mei; Elner, Susan G.; Khanna, Hemant; Murga-Zamalloa, Carlos A.; Patil, Suresh; Elner, Victor M. (2011): Expression and functional roles of caspase-5 in inflammatory responses of human retinal pigment epithelial cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (12), S. 8646–8656. DOI: 10.1167/iovs.11-7570.
- Biochemie und Pathobiochemie (2006). 8., völlig neu bearb. Aufl. Berlin: Springer.
- Bird, T. A.; Gearing, A. J.; Saklatvala, J. (1988): Murine interleukin 1 receptor. Direct identification by ligand blotting and purification to homogeneity of an interleukin 1-binding glycoprotein. In: *Journal of Biological Chemistry* 263 (24), S. 12063–12069. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)37893-1.
- Bodnar, A. G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S. E.; Chiu, C. P.; Morin, G. B. et al. (1998): Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5349), S. 349–352. DOI: 10.1126/science.279.5349.349.
- Boenigk, Jens (Hg.) (2021): Boenigk, Biologie. Der Begleiter in und durch das Studium. 1. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1903268>.
- Bolland, Daniel J.; King, Michelle R.; Reik, Wolf; Corcoran, Anne E.; Krueger, Christel (2013): Robust 3D DNA FISH using directly labeled probes. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (78). DOI: 10.3791/50587.
- Bolzer, Andreas; Kreth, Gregor; Solovei, Irina; Koehler, Daniela; Saracoglu, Kaan; Fauth, Christine et al. (2005): Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. In: *PLoS biology* 3 (5), e157. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030157.
- Boraschi, Diana; Italiani, Paola; Weil, Sabrina; Martin, Michael U. (2018): The family of the interleukin-1 receptors. In: *Immunological reviews* 281 (1), S. 197–232. DOI: 10.1111/imr.12606.
- Boyle, S.; Gilchrist, S.; Bridger, J. M.; Mahy, N. L.; Ellis, J. A.; Bickmore, W. A. (2001): The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. In: *Human molecular genetics* 10 (3), S. 211–219. DOI: 10.1093/hmg/10.3.211.
- Branco, Miguel R.; Branco, Tiago; Ramirez, Francisco; Pombo, Ana (2008): Changes in chromosome organization during PHA-activation of resting human lymphocytes measured by cryo-FISH. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 16 (3), S. 413–426. DOI: 10.1007/s10577-008-1230-x.
- Brickner, Jason H.; Walter, Peter (2004): Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. In: *PLOS Biology* 2 (11), e342. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020342.
- Brown, Jill M.; Green, Joanne; das Neves, Ricardo Pires; Wallace, Helen A. C.; Smith, Andrew J. H.; Hughes, Jim et al. (2008): Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. In: *The Journal of cell biology* 182 (6), S. 1083–1097. DOI: 10.1083/jcb.200803174.

Brown, Jonathan D.; Lin, Charles Y.; Duan, Qiong; Griffin, Gabriel; Federation, Alexander; Paranal, Ronald M. et al. (2014): NF- κ B directs dynamic super enhancer formation in inflammation and atherogenesis. In: *Molecular cell* 56 (2), S. 219–231. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.08.024.

Brownlee, Christopher; Heald, Rebecca (2019): Importin α Partitioning to the Plasma Membrane Regulates Intracellular Scaling. In: *Cell* 176 (4), 805–815.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.001.

Burns, K.; Clatworthy, J.; Martin, L.; Martinon, F.; Plumpton, C.; Maschera, B. et al. (2000): Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. In: *Nature cell biology* 2 (6), S. 346–351. DOI: 10.1038/35014038.

Buselmaier, Werner; Haussig, Joana (2018): *Biologie für Mediziner*. 14. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflucht-1564785>.

Cantwell, Helena; Dey, Gautam (2021): Nuclear size and shape control. In: *Seminars in cell & developmental biology*. DOI: 10.1016/j.semcd.2021.10.013.

Cantwell, Helena; Nurse, Paul (2019a): A systematic genetic screen identifies essential factors involved in nuclear size control. In: *PLoS genetics* 15 (2), e1007929. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007929.

Cantwell, Helena; Nurse, Paul (2019b): Unravelling nuclear size control. In: *Current genetics* 65 (6), S. 1281–1285. DOI: 10.1007/s00294-019-00999-3.

Chai, Hong; Brown, Robert E. (2009): Field effect in cancer-an update. In: *Annals of clinical and laboratory science* 39 (4), S. 331–337. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19880759/>.

Chandra Mohan (2007): Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/255703450_Detergents_A_guide_to_the_properties_and_uses_of_detergents_in_biological_systems.

Chaumont, Fabrice de; Dallongeville, Stéphane; Chenouard, Nicolas; Hervé, Nicolas; Pop, Sorin; Provoost, Thomas et al. (2012): Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. In: *Nature methods* 9 (7), S. 690–696. DOI: 10.1038/nmeth.2075.

Chen, Baohui; Gilbert, Luke A.; Cimini, Beth A.; Schnitzbauer, Joerg; Zhang, Wei; Li, Gene-Wei et al. (2013): Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. In: *Cell* 155 (7), S. 1479–1491. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.001.

Chen, Pan; Tomschik, Miroslav; Nelson, Katherine M.; Oakey, John; Gatlin, Jesse C.; Levy, Daniel L. (2019): Nucleoplasmin is a limiting component in the scaling of nuclear size with cytoplasmic volume. In: *The Journal of cell biology* 218 (12), S. 4063–4078. DOI: 10.1083/jcb.201902124.

Chen, Z.; Hagler, J.; Palombella, V. J.; Melandri, F.; Scherer, D.; Ballard, D.; Maniatis, T. (1995): Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. In: *Genes & Development* 9 (13), S. 1586–1597. DOI: 10.1101/gad.9.13.1586.

Cheung, Peter C. F.; Nebreda, Angel R.; Cohen, Philip (2004): TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. In: *The Biochemical journal* 378 (Pt 1), S. 27–34. DOI: 10.1042/BJ20031794.

Christodoulou, Andri; Santarella-Mellwig, Rachel; Santama, Niovi; Mattaj, Iain W. (2016): Transmembrane protein TMEM170A is a newly discovered regulator of ER and nuclear envelope morphogenesis in human cells. In: *J Cell Sci* 129 (8), S. 1552–1565. DOI: 10.1242/jcs.175273.

Coligan, J. E. (2001): Commonly used detergents. In: *Current protocols in protein science* Appendix 1, Appendix 1B. DOI: 10.1002/0471140864.psa01bs11.

Cremer, Marion; Küpper, Katrin; Wagler, Babett; Wizelman, Leah; Hase, Johann von; Weiland, Yanina et al. (2003): Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. In: *J Cell Biol* 162 (5), S. 809–820. DOI: 10.1083/jcb.200304096.

Cremer, Thomas; Cremer, Marion (2010): Chromosome territories. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (3), a003889. DOI: 10.1101/cshperspect.a003889.

Crosetto, Nicola; Bienko, Magda (2020): Radial Organization in the Mammalian Nucleus. In: *Front. Genet.* 11, S. 33. DOI: 10.3389/fgene.2020.00033.

Cuenda, A.; Alonso, G.; Morrice, N.; Jones, M.; Meier, R.; Cohen, P.; Nebreda, A. R. (1996): Purification and cDNA cloning of SAPKK3, the major activator of RK/p38 in stress- and cytokine-stimulated monocytes and epithelial cells. In: *The EMBO journal* 15 (16), S. 4156–4164.

Cushing, Leah; Stochaj, Wayne; Siegel, Marshall; Czerwinski, Robert; Dower, Ken; Wright, Quentin et al. (2014): Interleukin 1/Toll-like receptor-induced autophosphorylation activates interleukin 1 receptor-associated kinase 4 and controls cytokine induction in a cell type-specific manner. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (15), S. 10865–10875. DOI: 10.1074/jbc.M113.544809.

Dekker, Job; Misteli, Tom (2015): Long-Range Chromatin Interactions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (10), a019356. DOI: 10.1101/cshperspect.a019356.

Deolal, Pallavi; Male, Gurranna; Mishra, Krishnaveni (2021): The challenge of staying in shape: nuclear size matters. In: *Current genetics* 67 (4), S. 605–612. DOI: 10.1007/s00294-021-01176-1.

Dérjard, Benoit; Hibi, Masahiko; Wu, I-Huan; Barrett, Tamera; Su, Bing; Deng, Tiliang et al. (1994): JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. In: *Cell* 76 (6), S. 1025–1037. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90380-8.

Devenish, Liam P.; Mhlanga, Musa M.; Negishi, Yutaka (2021): Immune Regulation in Time and Space: The Role of Local- and Long-Range Genomic Interactions in Regulating Immune Responses. In: *Frontiers in immunology* 12, S. 662565. DOI: 10.3389/fimmu.2021.662565.

Deviri, Dan; Safran, Samuel A. (2022): Balance of osmotic pressures determines the nuclear-to-cytoplasmic volume ratio of the cell. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (21), e2118301119. DOI: 10.1073/pnas.2118301119.

Diermeier, Sarah; Kolovos, Petros; Heizinger, Leonhard; Schwartz, Uwe; Georgomanolis, Theodore; Zirkel, Anne et al. (2014): TNF α signalling primes chromatin for NF- κ B binding and induces rapid and widespread nucleosome repositioning. In: *Genome Biol* 15 (12), S. 536. DOI: 10.1186/s13059-014-0536-6.

Dinarello, Charles A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. In: *Annual review of immunology* 27, S. 519–550. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

Dittmer, Travis A.; Misteli, Tom (2011): The lamin protein family. In: *Genome biology* 12 (5), S. 222. DOI: 10.1186/gb-2011-12-5-222.

Dixon, Jesse R.; Selvaraj, Siddarth; Yue, Feng; Kim, Audrey; Li, Yan; Shen, Yin et al. (2012): Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. In: *Nature* 485 (7398), S. 376–380. DOI: 10.1038/nature11082.

Dufour, Alexandre; Thibeaux, Roman; Labruyère, Elisabeth; Guillén, Nancy; Olivo-Marin, Jean-Christophe (2011): 3-D active meshes: fast discrete deformable models for cell tracking in 3-D time-lapse microscopy. In: *IEEE transactions on image processing : a publication of the IEEE Signal Processing Society* 20 (7), S. 1925–1937. DOI: 10.1109/TIP.2010.2099125.

Elke Hoffmann; Oliver Dittrich-Breiholz; Helmut Holtmann; Michael Kracht (2002): Multiple control of interleukin-8 gene expression. In: *Journal of Leukocyte Biology* 72 (5), S. 847–855. DOI: 10.1189/jlb.72.5.847.

Elliott, Amicia D. (2020): Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. In: *Current protocols in cytometry* 92 (1), e68. DOI: 10.1002/cpcy.68.

Fazio, Thomas G.; Panning, Barbara (2010): Condensin complexes regulate mitotic progression and interphase chromatin structure in embryonic stem cells. In: *The Journal of cell biology* 188 (4), S. 491–503. DOI: 10.1083/jcb.200908026.

Femino, A. M.; Fay, F. S.; Fogarty, K.; Singer, R. H. (1998): Visualization of single RNA transcripts in situ. In: *Science (New York, N.Y.)* 280 (5363), S. 585–590. DOI: 10.1126/science.280.5363.585.

Ferrao, Ryan; Zhou, Hao; Shan, Yibing; Liu, Qun; Li, Qiubai; Shaw, David E. et al. (2014): IRAK4 dimerization and trans-autophosphorylation are induced by Myddosome assembly. In: *Molecular cell* 55 (6), S. 891–903. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.08.006.

Ferreira, Bibiana I.; Cautain, Bastien; Grenho, Inês; Link, Wolfgang (2020): Small Molecule Inhibitors of CRM1. In: *Frontiers in pharmacology* 11, S. 625. DOI: 10.3389/fphar.2020.00625.

Fingar, Diane C.; Salama, Sofie; Tsou, Christina; Harlow, Ed; Blenis, John (2002): Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. In: *Genes & Development* 16 (12), S. 1472–1487. DOI: 10.1101/gad.995802.

Finlan, Lee E.; Sproul, Duncan; Thomson, Inga; Boyle, Shelagh; Kerr, Elizabeth; Perry, Paul et al. (2008): Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. In: *PLOS Genetics* 4 (3), e1000039. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000039.

Finn, Elizabeth H.; Misteli, Tom (2019): Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization. In: *Science (New York, N.Y.)* 365 (6457). DOI: 10.1126/science.aaw9498.

Finn, Elizabeth H.; Misteli, Tom (2022): Nuclear position modulates long-range chromatin interactions. In: *PLOS Genetics* 18 (10), e1010451. DOI: 10.1371/journal.pgen.1010451.

Finn, Elizabeth H.; Pegoraro, Gianluca; Brandão, Hugo B.; Valton, Anne-Laure; Oomen, Marlies E.; Dekker, Job et al. (2019): Extensive Heterogeneity and Intrinsic Variation in Spatial Genome Organization. In: *Cell* 176 (6), 1502-1515.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.020.

Finn, Elizabeth H.; Pegoraro, Gianluca; Shachar, Sigal; Misteli, Tom (2017): Comparative analysis of 2D and 3D distance measurements to study spatial genome organization. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 123, S. 47–55. DOI: 10.1016/j.ymeth.2017.01.007.

Fischer, Cornelius; Metsger, Maria; Bauch, Sophia; Vidal, Ramon; Böttcher, Michael; Grote, Phillip et al. (2019): Signals trigger state-specific transcriptional programs to support diversity and homeostasis in immune cells. In: *Science signaling* 12 (581). DOI: 10.1126/scisignal.aao5820.

Garlanda, Cecilia; Mantovani, Alberto (2021): Interleukin-1 in tumor progression, therapy, and prevention. In: *Cancer cell* 39 (8), S. 1023–1027. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.04.011.

Gaus, Wilhelm; Muche, Rainer; Mayer, Benjamin (2023): Medizinische Statistik. Angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe. 3. überarbeitete Auflage. Norderstedt: BoD – Books on Demand.

Gene: CXCL2 (ENSG00000081041) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 (2021). Online verfügbar unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000081041;r=4:74097040-74099196, zuletzt aktualisiert am 02.05.2021, zuletzt geprüft am 02.05.2021.

Gene: CXCL8 (ENSG00000169429) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 (2021). Online verfügbar unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000169429;r=4:73740541-73743716, zuletzt aktualisiert am 02.05.2021, zuletzt geprüft am 02.05.2021.

Gene: IL6 (ENSG00000136244) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 103 (2021). Online verfügbar unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000136244;r=7:22725884-22732002, zuletzt aktualisiert am 02.05.2021, zuletzt geprüft am 02.05.2021.

Gene: NFKBIA (ENSG00000100906) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 109 (2023). Online verfügbar unter https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000100906;r=14:35401079-35404749, zuletzt aktualisiert am 21.04.2023, zuletzt geprüft am 21.04.2023.

George, Carolyn M.; Bozler, Julianna; Nguyen, Huy Q.; Bosco, Giovanni (2014): Condensins are Required for Maintenance of Nuclear Architecture. In: *Cells* 3 (3), S. 865–882. DOI: 10.3390/cells3030865.

Grundmann, Ekkehard; Roessner, Albert; Bohle, Rainer M.; Dombrowski, Frank; Feiden, Wolfgang; Fink, Ludger Johannes et al. (Hg.) (2010): *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. Mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch ; mit virtuellem Mikroskop online.* Unter Mitarbeit von Regine Schneider-Stock und Stefan Schweyer. 11., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, [Nachdr.]. München: Elsevier Urban & Fischer.

Guelen, Lars; Pagie, Ludo; Brasset, Emilie; Meuleman, Wouter; Faza, Marius B.; Talhout, Wendy et al. (2008): Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. In: *Nature* 453 (7197), S. 948–951. DOI: 10.1038/nature06947.

Gupta, S.; Campbell, D.; Dérijard, B.; Davis, R. J. (1995): Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 267 (5196), S. 389–393. DOI: 10.1126/science.7824938.

Gut, Gabriele; Herrmann, Markus D.; Pelkmans, Lucas (2018): Multiplexed protein maps link subcellular organization to cellular states. In: *Science (New York, N.Y.)* 361 (6401). DOI: 10.1126/science.aar7042.

H. J. Motulsky (Accessed 2016): GraphPad Statistics Guide.

Häcker, Hans; Karin, Michael (2006): Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006 (357), re13. DOI: 10.1126/stke.3572006re13.

Handschiek, Katja; Beuerlein, Knut; Jurida, Liane; Bartkuhn, Marek; Müller, Helmut; Soelch, Johanna et al. (2014): Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression. In: *Molecular cell* 53 (2), S. 193–208. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.12.002.

Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2004): Signaling to NF- κ B. In: *Genes & Development* 18 (18), S. 2195–2224. DOI: 10.1101/gad.1228704.

Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Koch, Hans-Georg (2022): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Hess, Jochen; Angel, Peter; Schorpp-Kistner, Marina (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 25), S. 5965–5973. DOI: 10.1242/jcs.01589.

Hirata, Yusuke; Takahashi, Miki; Morishita, Tohru; Noguchi, Takuya; Matsuzawa, Atsushi (2017): Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. In: *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). DOI: 10.3390/ijms18010205.

Hnisz, Denes; Day, Daniel S.; Young, Richard A. (2016): Insulated Neighborhoods: Structural and Functional Units of Mammalian Gene Control. In: *Cell* 167 (5), S. 1188–1200. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.024.

Hoelz, André; Deblér, Erik W.; Blobel, Günter (2011): The structure of the nuclear pore complex. In: *Annual review of biochemistry* 80, S. 613–643. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060109-151030.

hTERT RPE-1 ATCC® CRL-4000™ Homo sapiens Retina, eye; pigm (2021). Online verfügbar unter https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4000.aspx?geo_country=de#generalinformation, zuletzt aktualisiert am 18.05.2021, zuletzt geprüft am 18.05.2021.

Hu, Chaofeng; Sun, Liping; Hu, Yiling; Lu, Daxiang; Wang, Huadong; Tang, Suisheng (2010): Functional characterization of the NF- κ B binding site in the human NOD2 promoter. In: *Cell Mol Immunol* 7 (4), S. 288–295. DOI: 10.1038/cmi.2010.16.

Huang, Jialiang; Li, Kailong; Cai, Wenqing; Liu, Xin; Zhang, Yuannyu; Orkin, Stuart H. et al. (2018): Dissecting super-enhancer hierarchy based on chromatin interactions. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 943. DOI: 10.1038/s41467-018-03279-9.

Huang, S.; Spector, D. L. (1996): Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription. In: *The Journal of cell biology* 133 (4), S. 719–732. DOI: 10.1083/jcb.133.4.719.

Huang, T. T.; Kudo, N.; Yoshida, M.; Miyamoto, S. (2000): A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3), S. 1014–1019. DOI: 10.1073/pnas.97.3.1014.

Huber, Michael D.; Gerace, Larry (2007): The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. In: *The Journal of cell biology* 179 (4), S. 583–584. DOI: 10.1083/jcb.200710156.

Hughes, Catherine E.; Nibbs, Robert J. B. (2018): A guide to chemokines and their receptors. In: *The FEBS journal* 285 (16), S. 2944–2971. DOI: 10.1111/febs.14466.

Jevic, P.; Levy, D. (2014): Mechanisms of Nuclear Size Regulation in Model Systems and Cancer.

Jevtić, Predrag; Edens, Lisa J.; Li, Xiaoyang; Nguyen, Thang; Chen, Pan; Levy, Daniel L. (2015): Concentration-dependent Effects of Nuclear Lamins on Nuclear Size in Xenopus and Mammalian Cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 290 (46), S. 27557–27571. DOI: 10.1074/jbc.M115.673798.

Jevtić, Predrag; Schibler, Andria C.; Wesley, Chase C.; Pegoraro, Gianluca; Misteli, Tom; Levy, Daniel L. (2019): The nucleoporin ELYS regulates nuclear size by controlling NPC number and nuclear import capacity. In: *EMBO reports* 20 (6). DOI: 10.15252/embr.201847283.

Jorgensen, Paul; Edgington, Nicholas P.; Schneider, Brandt L.; Rupes, Ivan; Tyers, Mike; Fitcher, Bruce (2007): The size of the nucleus increases as yeast cells grow. In: *Molecular biology of the cell* 18 (9), S. 3523–3532. DOI: 10.1091/mbc.e06-10-0973.

Jurida, Liane; Soelch, Johanna; Bartkuhn, Marek; Handschick, Katja; Müller, Helmut; Newel, Doris et al. (2015): The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF- κ B p65. In: *Cell Reports* 10 (5), S. 726–739. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.001.

Kalverda, Bernike; Pickersgill, Helen; Shloma, Victor V.; Fornerod, Maarten (2010): Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. In: *Cell* 140 (3), S. 360–371. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.011.

Kanayama, Atsuhiko; Seth, Rashu B.; Sun, Lijun; Ea, Chee-Kwee; Hong, Mei; Shaito, Abdullah et al. (2004): TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. In: *Molecular Cell* 15 (4), S. 535–548. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.08.008.

Karin, M. (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (28), S. 16483–16486. DOI: 10.1074/jbc.270.28.16483.

Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. In: *Annual review of immunology* 18, S. 621–663. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621.

Kellogg, Ryan A.; Tay, Savaş (2015): Noise facilitates transcriptional control under dynamic inputs. In: *Cell* 160 (3), S. 381–392. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.013.

Kempe, Hermannus; Schwabe, Anne; Crémazy, Frédéric; Verschure, Pernelle J.; Bruggeman, Frank J. (2015): The volumes and transcript counts of single cells reveal concentration homeostasis and capture biological noise. In: *Molecular biology of the cell* 26 (4), S. 797–804. DOI: 10.1091/mbc.E14-08-1296.

Kishimoto, Tadimitsu (2006): Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. In: *Arthritis research & therapy* 8 Suppl 2 (Suppl 2), S2. DOI: 10.1186/ar1916.

Kizilirmak, Cise; Bianchi, Marco E.; Zambrano, Samuel (2022): Insights on the NF- κ B System Using Live Cell Imaging: Recent Developments and Future Perspectives. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 886127. DOI: 10.3389/fimmu.2022.886127.

Kramer, Bernhard A.; Del Sarabia Castillo, Jacobo; Pelkmans, Lucas (2022): Multimodal perception links cellular state to decision-making in single cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 377 (6606), S. 642–648. DOI: 10.1126/science.abf4062.

Kume, Kazunori; Cantwell, Helena; Neumann, Frank R.; Jones, Andrew W.; Snijders, Ambrosius P.; Nurse, Paul (2017): A systematic genomic screen implicates nucleocytoplasmic transport and membrane growth in nuclear size control. In: *PLoS genetics* 13 (5), e1006767. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006767.

Küpper, Katrin; Kölbl, Alexandra; Biener, Dorothee; Dittrich, Sandra; Hase, Johann von; Thormeyer, Tobias et al. (2007): Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. In: *Chromosoma* 116 (3), S. 285–306. DOI: 10.1007/s00412-007-0098-4.

Kuroda, Masahiko; Tanabe, Hideyuki; Yoshida, Keiichi; Oikawa, Kosuke; Saito, Akira; Kiyuna, Tomoharu et al. (2004): Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. In: *J Cell Sci* 117 (Pt 24), S. 5897–5903. DOI: 10.1242/jcs.01508.

Lagache, Thibault; Grassart, Alexandre; Dallongeville, Stéphane; Faklaris, Orestis; Sauvonnnet, Nathalie; Dufour, Alexandre et al. (2018): Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 698. DOI: 10.1038/s41467-018-03053-x.

Lagache, Thibault; Sauvonnnet, Nathalie; Danglot, Lydia; Olivo-Marin, Jean-Christophe (2015): Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87 (6), S. 568–579. DOI: 10.1002/cyto.a.22629.

Lai, Lan-Tian; Meng, Zhenyu; Shao, Fangwei; Zhang, Li-Feng (2021): Simultaneous RNA-DNA FISH. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2372, S. 111–121. DOI: 10.1007/978-1-0716-1697-0_11.

Lechner, Melissa G.; Megiel, Carolina; Russell, Sarah M.; Bingham, Brigid; Arger, Nicholas; Woo, Tammy; Epstein, Alan L. (2011): Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. In: *Journal of translational medicine* 9, S. 90. DOI: 10.1186/1479-5876-9-90.

Lee, Dung-Fang; Kuo, Hsu-Ping; Chen, Chun-Te; Hsu, Jung-Mao; Chou, Chao-Kai; Wei, Yongkun et al. (2007): IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. In: *Cell* 130 (3), S. 440–455. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.058.

Lee, Robin E. C.; Walker, Sarah R.; Savery, Kate; Frank, David A.; Gaudet, Suzanne (2014): Fold change of nuclear NF- κ B determines TNF-induced transcription in single cells. In: *Molecular cell* 53 (6), S. 867–879. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.01.026.

Leshner, Marc; Devine, Michelle; Roloff, Gregory W.; True, Lawrence D.; Misteli, Tom; Meaburn, Karen J. (2016): Locus-specific gene repositioning in prostate cancer. In: *Molecular biology of the cell* 27 (2), S. 236–246. DOI: 10.1091/mbc.E15-05-0280.

Levy, Daniel L.; Heald, Rebecca (2010): Nuclear size is regulated by importin α and Ntf2 in *Xenopus*. In: *Cell* 143 (2), S. 288–298. DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.012.

Li, Shyun; Strelow, Astrid; Fontana, Elizabeth J.; Wesche, Holger (2002): IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8), S. 5567–5572. DOI: 10.1073/pnas.082100399.

Li, Yijing; Wang, Lei; Pappan, Loretta; Galliher-Beckley, Amy; Shi, Jishu (2012): IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. In: *Molecular cancer* 11, S. 87. DOI: 10.1186/1476-4598-11-87.

Lieberman-Aiden, Erez; van Berkum, Nynke L.; Williams, Louise; Imakaev, Maxim; Ragoczy, Tobias; Telling, Agnes et al. (2009): Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5950), S. 289–293. DOI: 10.1126/science.1181369.

- Lin, Su-Chang; Lo, Yu-Chih; Wu, Hao (2010): Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. In: *Nature* 465 (7300), S. 885–890. DOI: 10.1038/nature09121.
- Lloyd, Alison C. (2013): The regulation of cell size. In: *Cell* 154 (6), S. 1194–1205. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.053.
- Maass, Philipp G.; Barutcu, A. Rasim; Rinn, John L. (2019): Interchromosomal interactions: A genomic love story of kissing chromosomes. In: *The Journal of cell biology* 218 (1), S. 27–38. DOI: 10.1083/jcb.201806052.
- Maeshima, Kazuhiro; Iino, Haruki; Hihara, Saera; Funakoshi, Tomoko; Watanabe, Ai; Nishimura, Masaomi et al. (2010): Nuclear pore formation but not nuclear growth is governed by cyclin-dependent kinases (Cdks) during interphase. In: *Nat Struct Mol Biol* 17 (9), S. 1065–1071. DOI: 10.1038/nsmb.1878.
- Malhas, Ashraf; Lee, Chiu Fan; Sanders, Rebecca; Saunders, Nigel J.; Vaux, David J. (2007): Defects in lamin B1 expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression. In: *J Cell Biol* 176 (5), S. 593–603. DOI: 10.1083/jcb.200607054.
- Malik, Ankit; Kanneganti, Thirumala-Devi (2018): Function and regulation of IL-1 α in inflammatory diseases and cancer. In: *Immunological reviews* 281 (1), S. 124–137. DOI: 10.1111/imr.12615.
- Mansouri, Siavash; Heylmann, Daniel; Stiewe, Thorsten; Kracht, Michael; Savai, Rajkumar (2022): Cancer genome and tumor microenvironment: Reciprocal crosstalk shapes lung cancer plasticity. In: *eLife* 11. DOI: 10.7554/eLife.79895.
- Mantovani, A.; Barajon, I.; Garlanda, C. (2018): IL-1 and IL-1 Regulatory Pathways in Cancer Progression and Therapy.
- Mantovani, A.; Bussolino, F.; Dejana, E. (1992): Cytokine regulation of endothelial cell function. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (8), S. 2591–2599. DOI: 10.1096/fasebj.6.8.1592209.
- Mantovani, Alberto; Dinarello, Charles A.; Molgora, Martina; Garlanda, Cecilia (2019): Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. In: *Immunity* 50 (4), S. 778–795. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.
- Mao, Yuntao S.; Zhang, Bin; Spector, David L. (2011): Biogenesis and function of nuclear bodies. In: *Trends in genetics : TIG* 27 (8), S. 295–306. DOI: 10.1016/j.tig.2011.05.006.
- Marshall, W. F.; Straight, A.; Marko, J. F.; Swedlow, J.; Dernburg, A.; Belmont, A. et al. (1997): Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells. In: *Current Biology* 7 (12), S. 930–939. DOI: 10.1016/S0960-9822(06)00412-X.
- Maßmann, Verena (2021): Zytokin-regulierte Veränderungen von messenger Ribonucleoprotein-Partikeln in humanen retinalen Pigmentepithelzellen. In: *Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Matsushima, Kouji; de Yang; Oppenheim, Joost J. (2022): Interleukin-8: An evolving chemokine. In: *Cytokine* 153, S. 155828. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155828.
- Mayr-Buro, Christin; Schlereth, Eva; Beuerlein, Knut; Tenekeci, Ulas; Meier-Soelch, Johanna; Schmitz, M. Lienhard; Kracht, Michael (2019): Single-Cell Analysis of Multiple Steps of Dynamic NF- κ B Regulation in Interleukin-1 α -Triggered Tumor Cells Using Proximity Ligation Assays. In: *Cancers* 11 (8). DOI: 10.3390/cancers11081199.
- Meaburn, Karen J. (2016): Spatial Genome Organization and Its Emerging Role as a Potential Diagnosis Tool. In: *Frontiers in genetics* 7, S. 134. DOI: 10.3389/fgene.2016.00134.
- Meaburn, Karen J.; Agunloye, Olufunmilayo; Devine, Michelle; Leshner, Marc; Roloff, Gregory W.; True, Lawrence D.; Misteli, Tom (2016): Tissue-of-origin-specific gene repositioning in breast and prostate cancer. In: *Histochem Cell Biol* 145 (4), S. 433–446. DOI: 10.1007/s00418-015-1401-8.
- Meaburn, Karen J.; Gudla, Prabhakar R.; Khan, Sameena; Lockett, Stephen J.; Misteli, Tom (2009): Disease-specific gene repositioning in breast cancer. In: *The Journal of cell biology* 187 (6), S. 801–812. DOI: 10.1083/jcb.200909127.
- Meaburn, Karen J.; Misteli, Tom (2007): Cell biology: chromosome territories. In: *Nature* 445 (7126), S. 379–781. DOI: 10.1038/445379a.
- Meaburn, Karen J.; Misteli, Tom (2008): Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis. In: *The Journal of cell biology* 180 (1), S. 39–50. DOI: 10.1083/jcb.200708204.
- Meaburn, Karen J.; Misteli, Tom (2019): Assessment of the Utility of Gene Positioning Biomarkers in the Stratification of Prostate Cancers. In: *Frontiers in genetics* 10, S. 1029. DOI: 10.3389/fgene.2019.01029.
- Meier-Soelch, Johanna; Mayr-Buro, Christin; Juli, Jana; Leib, Lisa; Linne, Uwe; Dreute, Jan et al. (2021): Monitoring the Levels of Cellular NF- κ B Activation States. In: *Cancers* 13 (21), S. 5351. DOI: 10.3390/cancers13215351.
- Mewborn, Stephanie K.; Puckelwartz, Megan J.; Abuisneineh, Fida; Fahrenbach, John P.; Zhang, Yuan; MacLeod, Heather et al. (2010): Altered chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation. In: *PloS one* 5 (12), e14342. DOI: 10.1371/journal.pone.0014342.
- Mitchell, Jennifer A.; Fraser, Peter (2008): Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. In: *Genes & Development* 22 (1), S. 20–25. DOI: 10.1101/gad.454008.
- Mitchell, Simon; Vargas, Jesse; Hoffmann, Alexander (2016): Signaling via the NF κ B system. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 8 (3), S. 227–241. DOI: 10.1002/wsbm.1331.
- Mohanta, Tapan Kumar; Mishra, Awdhesh Kumar; Al-Harrasi, Ahmed (2021): The 3D Genome: From Structure to Function. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111585.
- Morton, Simon; Davis, Roger J.; Cohen, Philip (2004): Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. In: *FEBS letters* 572 (1-3), S. 177–183. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.031.

Motshwene, Precious G.; Moncrieffe, Martin C.; Grossmann, J. Günter; Kao, Cheng; Ayaluru, Murali; Sandercock, Alan M. et al. (2009): An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (37), S. 25404–25411. DOI: 10.1074/jbc.M109.022392.

Muldoon, Joseph J.; Chuang, Yishan; Bagheri, Neda; Leonard, Joshua N. (2020): Macrophages employ quorum licensing to regulate collective activation. In: *Nat Commun* 11 (1), S. 878. DOI: 10.1038/s41467-020-14547-y.

Murata, Shin-Ichi; Nakazawa, Tadao; Ohno, Nobuhiko; Terada, Nobuo; Iwashina, Masanori; Mochizuki, Kunio et al. (2007): Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 17 (6), S. 489–496. DOI: 10.1089/thy.2006.0328.

Nagele, R. G.; Freeman, T.; McMorrow, L.; Thomson, Z.; Kitson-Wind, K.; Lee, H. y. (1999): Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. In: *J Cell Sci* 112 (Pt 4), S. 525–535. DOI: 10.1242/jcs.112.4.525.

Neumann, Frank R.; Nurse, Paul (2007): Nuclear size control in fission yeast. In: *The Journal of cell biology* 179 (4), S. 593–600. DOI: 10.1083/jcb.200708054.

Nikopoulou, Chrysa; Parekh, Swati; Tessarz, Peter (2019): Ageing and sources of transcriptional heterogeneity. In: *Biological chemistry* 400 (7), S. 867–878. DOI: 10.1515/hsz-2018-0449.

Nora, Elphège P.; Lajoie, Bryan R.; Schulz, Edda G.; Giorgetti, Luca; Okamoto, Ikuhiro; Servant, Nicolas et al. (2012): Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. In: *Nature* 485 (7398), S. 381–385. DOI: 10.1038/nature11049.

Nourbakhsh, M.; Kalble, S.; Dorrie, A.; Hauser, H.; Resch, K.; Kracht, M. (2001): The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (6), S. 4501–4508. DOI: 10.1074/jbc.M007532200.

Nowak, David E.; Tian, Bing; Jamaluddin, Mohammad; Boldogh, Istvan; Vergara, Leoncio A.; Choudhary, Sanjeev; Brasier, Allan R. (2008): RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes. In: *Mol. Cell. Biol.* 28 (11), S. 3623–3638. DOI: 10.1128/MCB.01152-07.

Nowarski, Roni; Jackson, Ruaidhrí; Flavell, Richard A. (2017): The Stromal Intervention: Regulation of Immunity and Inflammation at the Epithelial-Mesenchymal Barrier. In: *Cell* 168 (3), S. 362–375. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.040.

O'Brien, Kristine; Matlin, Arianne J.; Lowell, April M.; Moore, Melissa J. (2008): The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of Pre-mRNA splicing. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (48), S. 33147–33154. DOI: 10.1074/jbc.M805556200.

Olivo-Marin, Jean-Christophe (2002): Extraction of spots in biological images using multiscale products. In: *Pattern Recognition* 35 (9), S. 1989–1996. DOI: 10.1016/S0031-3203(01)00127-3.

Osborne, Cameron S.; Chakalova, Lyubomira; Mitchell, Jennifer A.; Horton, Alice; Wood, Andrew L.; Bolland, Daniel J. et al. (2007): Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. In: *PLOS Biology* 5 (8), e192. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050192.

Osterwalder, Marco; Barozzi, Iros; Tissières, Virginie; Fukuda-Yuzawa, Yoko; Mannion, Brandon J.; Afzal, Sarah Y. et al. (2018): Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. In: *Nature* 554 (7691), S. 239–243. DOI: 10.1038/nature25461.

Padovan-Merhar, Olivia; Nair, Gautham P.; Biaesch, Andrew G.; Mayer, Andreas; Scarfone, Steven; Foley, Shawn W. et al. (2015): Single mammalian cells compensate for differences in cellular volume and DNA copy number through independent global transcriptional mechanisms. In: *Molecular cell* 58 (2), S. 339–352. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.03.005.

Papantonis, Argyris; Cook, Peter R. (2013): Transcription factories: genome organization and gene regulation. In: *Chemical reviews* 113 (11), S. 8683–8705. DOI: 10.1021/cr300513p.

Papantonis, Argyris; Kohro, Takahide; Baboo, Sabyasachi; Larkin, Joshua D.; Deng, Binwei; Short, Patrick et al. (2012): TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. In: *The EMBO journal* 31 (23), S. 4404–4414. DOI: 10.1038/emboj.2012.288.

Parada, Luis A.; McQueen, Philip G.; Misteli, Tom (2004): Tissue-specific spatial organization of genomes. In: *Genome biology* 5 (7), R44. DOI: 10.1186/gb-2004-5-7-r44.

Peric-Hupkes, Daan; Meuleman, Wouter; Pagie, Ludo; Bruggeman, Sophia W. M.; Solovei, Irina; Brugman, Wim et al. (2010): Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. In: *Molecular cell* 38 (4), S. 603–613. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.016.

Pietras, Eric M.; Mirantes-Barbeito, Cristina; Fong, Sarah; Loeffler, Dirk; Kovtonyuk, Larisa V.; Zhang, SiYi et al. (2016): Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. In: *Nature cell biology* 18 (6), S. 607–618. DOI: 10.1038/ncb3346.

Priester, Jasmin; Dreute, Jan; Kracht, Michael; Schmitz, M. Lienhard (2022): Post-Transcriptional Control of mRNA Metabolism and Protein Secretion: The Third Level of Regulation within the NF- κ B System. In: *Biomedicines* 10 (9). DOI: 10.3390/biomedicines10092108.

Quinodoz, Sofia A.; Ollikainen, Noah; Tabak, Barbara; Palla, Ali; Schmidt, Jan Marten; Detmar, Elizabeth et al. (2018): Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. In: *Cell* 174 (3), 744-757.e24. DOI: 10.1016/j.cell.2018.05.024.

Raj, Arjun; Peskin, Charles S.; Tranchina, Daniel; Vargas, Diana Y.; Tyagi, Sanjay (2006): Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. In: *PLOS Biology* 4 (10), e309. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040309.

Ramirez-Carrozzi, Vladimir R.; Braas, Daniel; Bhatt, Dev M.; Cheng, Christine S.; Hong, Christine; Doty, Kevin R. et al. (2009): A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. In: *Cell* 138 (1), S. 114–128. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.020.

Ramirez-Carrozzi, Vladimir R.; Nazarian, Aaron A.; Li, Caiyi C.; Gore, Sarah L.; Sridharan, Rupa; Imbalzano, Anthony N.; Smale, Stephen T. (2006): Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response. In: *Genes & Development* 20 (3), S. 282–296. DOI: 10.1101/gad.1383206.

Renner, Florian; Schmitz, M. Lienhard (2009): Autoregulatory feedback loops terminating the NF-kappaB response. In: *Trends in biochemical sciences* 34 (3), S. 128–135. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.12.003.

Rhind, Nicholas (2021): Cell-size control. In: *Current biology : CB* 31 (21), R1414-R1420. DOI: 10.1016/j.cub.2021.09.017.

Rieder, Dietmar; Trajanoski, Zlatko; McNally, James G. (2012): Transcription factories. In: *Frontiers in genetics* 3, S. 221. DOI: 10.3389/fgene.2012.00221.

Rothballer, Andrea; Kutay, Ulrike (2012): SnapShot: The nuclear envelope I. In: *Cell* 150 (4), 868-868.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2012.07.024.

Roukos, Vassilis; Pegoraro, Gianluca; Voss, Ty C.; Misteli, Tom (2015): Cell cycle staging of individual cells by fluorescence microscopy. In: *Nature protocols* 10 (2), S. 334–348. DOI: 10.1038/nprot.2015.016.

Sato, S.; Burgess, S. B.; McIlwain, D. L. (1994): Transcription and motoneuron size. In: *Journal of neurochemistry* 63 (5), S. 1609–1615. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1994.63051609.x.

Sato, Shintaro; Sanjo, Hideki; Takeda, Kiyoshi; Ninomiya-Tsuji, Jun; Yamamoto, Masahiro; Kawai, Taro et al. (2005): Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. In: *Nat Immunol* 6 (11), S. 1087–1095. DOI: 10.1038/ni1255.

Schmitz, M. L.; Bacher, S.; Kracht, M. (2001): I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. In: *Trends in biochemical sciences* 26 (3), S. 186–190. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01753-9.

Schmitz, Sabine (2020): *Der Experimentator: Zellkultur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schmitz, Sabine; Desel, Christine (2018): *Der Experimentator Zellbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Schoenfelder, Stefan; Sexton, Tom; Chakalova, Lyubomira; Cope, Nathan F.; Horton, Alice; Andrews, Simon et al. (2010): Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. In: *Nat Genet* 42 (1), S. 53–61. DOI: 10.1038/ng.496.

Shachar, Sigal; Misteli, Tom (2017): Causes and consequences of nuclear gene positioning. In: *Journal of cell science* 130 (9), S. 1501–1508. DOI: 10.1242/jcs.199786.

Shachar, Sigal; Voss, Ty C.; Pegoraro, Gianluca; Sciascia, Nicholas; Misteli, Tom (2015): Identification of Gene Positioning Factors Using High-Throughput Imaging Mapping. In: *Cell* 162 (4), S. 911–923. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.035.

Shalek, Alex K.; Satija, Rahul; Adiconis, Xian; Gertner, Rona S.; Gaublomme, Jellert T.; Raychowdhury, Raktima et al. (2013): Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. In: *Nature* 498 (7453), S. 236–240. DOI: 10.1038/nature12172.

Shen, Xuotong; Yu, Lanlan; Weir, Joyce W.; Gorovsky, Martin A. (1995): Linker histories are not essential and affect chromatin condensation in vivo. In: *Cell* 82 (1), S. 47–56. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90051-9.

Shpiz, Sergey; Lavrov, Sergey; Kalmykova, Alla (2014): Combined RNA/DNA fluorescence in situ hybridization on whole-mount *Drosophila* ovaries. In: *PIWI-Interacting RNAs* 1093, S. 161–169. DOI: 10.1007/978-1-62703-694-8_13.

Sibarita, Jean-Baptiste (2005): Deconvolution microscopy. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 95, S. 201–243. DOI: 10.1007/b102215.

Slaughter, Danely P.; Southwick, Harry W.; Smejkal, Walter (1953): "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. In: *Cancer* 6 (5), S. 963–968. DOI: 10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::AID-CNCR2820060515>3.0.CO;2-Q.

Stadler, Sonja; Schnapp, Verena; Mayer, Robert; Stein, Stefan; Cremer, Christoph; Bonifer, Constanze et al. (2004): The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation. In: *BMC Cell Biol* 5 (1), S. 44. DOI: 10.1186/1471-2121-5-44.

Stein, B.; Baldwin, A. S. (1993): Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (11), S. 7191–7198. DOI: 10.1128/MCB.13.11.7191.

Stillie, RoseMarie; Farooq, Shukkur Muhammed; Gordon, John R.; Stadnyk, Andrew W. (2009): The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. In: *Journal of Leukocyte Biology* 86 (3), S. 529–543. DOI: 10.1189/jlb.0208125.

Strasák, Ludek; Bártoová, Eva; Harnicarová, Andrea; Galiová, Gabriela; Krejčí, Jana; Kozubek, Stanislav (2009): H3K9 acetylation and radial chromatin positioning. In: *Journal of cellular physiology* 220 (1), S. 91–101. DOI: 10.1002/jcp.21734.

Stringer, Carsen; Wang, Tim; Michaelos, Michalis; Pachitariu, Marius (2021): Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation. In: *Nat Methods* 18 (1), S. 100–106. DOI: 10.1038/s41592-020-01018-x.

Sun, S. C.; Ganchi, P. A.; Ballard, D. W.; Greene, W. C. (1993): NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5103), S. 1912–1915. DOI: 10.1126/science.8096091.

Sun, Xi-Ming; Bowman, Anthony; Priestman, Miles; Bertaux, Francois; Martinez-Segura, Amalia; Tang, Wenhao et al. (2020): Size-Dependent Increase in RNA Polymerase II Initiation Rates Mediates Gene Expression Scaling with Cell Size. In: *Current biology : CB* 30 (7), 1217-1230.e7. DOI: 10.1016/j.cub.2020.01.053.

Swaffer, Matthew P.; Kim, Jacob; Chandler-Brown, Devon; Langhinrichs, Maurice; Marinov, Georgi K.; Greenleaf, William J. et al. (2021): Transcriptional and chromatin-based partitioning mechanisms uncouple protein scaling from cell size. In: *Molecular cell* 81 (23), 4861-4875.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.10.007.

Swaffer, Matthew P.; Marinov, Georgi K.; Zheng, Huan; Fuentes Valenzuela, Lucas; Tsui, Crystal Yee; Jones, Andrew W. et al. (2023): RNA polymerase II dynamics and mRNA stability feedback scale mRNA amounts with cell size. In: *Cell* 186 (24), 5254-5268.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.10.012.

Takizawa, Takumi; Gudla, Prabhakar R.; Guo, Liying; Lockett, Stephan; Misteli, Tom (2008): Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. In: *Genes & Development* 22 (4), S. 489–498. DOI: 10.1101/gad.1634608.

Therizols, Pierre; Illingworth, Robert S.; Courilleau, Celine; Boyle, Shelagh; Wood, Andrew J.; Bickmore, Wendy A. (2014): Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6214), S. 1238–1242. DOI: 10.1126/science.1259587.

Tournier, C.; Dong, C.; Turner, T. K.; Jones, S. N.; Flavell, R. A.; Davis, R. J. (2001): MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. In: *Genes & Development* 15 (11), S. 1419–1426. DOI: 10.1101/gad.888501.

Traenckner, E. B.; Pahl, H. L.; Henkel, T.; Schmidt, K. N.; Wilk, S.; Baeuerle, P. A. (1995): Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. In: *The EMBO journal* 14 (12), S. 2876–2883. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb07287.x.

Tyagi, Monica; Imam, Nasir; Verma, Kirtika; Patel, Ashok K. (2016): Chromatin remodelers: We are the drivers!! In: *Nucleus (Austin, Tex.)* 7 (4), S. 388–404. DOI: 10.1080/19491034.2016.1211217.

van Steensel, Bas; Furlong, Eileen E. M. (2019): The role of transcription in shaping the spatial organization of the genome. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (6), S. 327–337. DOI: 10.1038/s41580-019-0114-6.

Vanden Berghe, W.; Bosscher, K. de; Boone, E.; Plaisance, S.; Haegeman, G. (1999): The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (45), S. 32091–32098. DOI: 10.1074/jbc.274.45.32091.

Venkatesh, Swaminathan; Workman, Jerry L. (2015): Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 16 (3), S. 178–189. DOI: 10.1038/nrm3941.

ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit (2023). Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/QVC0001>, zuletzt aktualisiert am 30.01.2023, zuletzt geprüft am 30.01.2023.

Vigers, G. P.; Anderson, L. J.; Caffes, P.; Brandhuber, B. J. (1997): Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. In: *Nature* 386 (6621), S. 190–194. DOI: 10.1038/386190a0.

Volpi, E. V.; Chevret, E.; Jones, T.; Vatcheva, R.; Williamson, J.; Beck, S. et al. (2000): Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. In: *J Cell Sci* 113 (Pt 9), S. 1565–1576. DOI: 10.1242/jcs.113.9.1565.

Vukovic, L.; Jevtic, P.; Edens, L.; Levy, D. (2016): New Insights into Mechanisms and Functions of Nuclear Size Regulation.

Vuković, Lidija D.; Jevtić, Predrag; Zhang, Zhaojie; Stohr, Bradley A.; Levy, Daniel L. (2016): Nuclear size is sensitive to NTF2 protein levels in a manner dependent on Ran binding. In: *Journal of cell science* 129 (6), S. 1115–1127. DOI: 10.1242/jcs.181263.

Wada, Youichiro; Ohta, Yoshihiro; Xu, Meng; Tsutsumi, Shuichi; Minami, Takashi; Inoue, Kenji et al. (2009): A wave of nascent transcription on activated human genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (43), S. 18357–18361. DOI: 10.1073/pnas.0902573106.

Weber, Axel; Wasiliew, Peter; Kracht, Michael (2010): Interleukin-1 (IL-1) pathway. In: *Science signaling* 3 (105), cm1. DOI: 10.1126/scisignal.3105cm1.

Weiterer, Sinah-Sophia; Meier-Soelch, Johanna; Georgomanolis, Theodore; Mizi, Athanasia; Beyerlein, Anna; Weiser, Hendrik et al. (2020): Distinct IL-1 α -responsive enhancers promote acute and coordinated changes in chromatin topology in a hierarchical manner. In: *The EMBO journal* 39 (1), e101533. DOI: 10.15252/embj.2019101533.

Wesche, H.; Korherr, C.; Kracht, M.; Falk, W.; Resch, K.; Martin, M. U. (1997a): The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). In: *The Journal of biological chemistry* 272 (12), S. 7727–7731. DOI: 10.1074/jbc.272.12.7727.

Wesche, Holger; Henzel, William J.; Shillinglaw, Wendy; Li, Shyun; Cao, Zhaodan (1997b): MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. In: *Immunity* 7 (6), S. 837–847. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80402-1.

Widmann, C.; Gibson, S.; Jarpe, M. B.; Johnson, G. L. (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. In: *Physiological reviews* 79 (1), S. 143–180. DOI: 10.1152/physrev.1999.79.1.143.

Williams, Ruth R. E.; Azuara, Véronique; Perry, Pascale; Sauer, Stephan; Dvorkina, Maria; Jørgensen, Helle et al. (2006): Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. In: *J Cell Sci* 119 (Pt 1), S. 132–140. DOI: 10.1242/jcs.02727.

Williams, Ruth R. E.; Broad, Simon; Sheer, Denise; Ragoussis, Jiannis (2002): Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei. In: *Experimental cell research* 272 (2), S. 163–175. DOI: 10.1006/excr.2001.5400.

- Winzen, R.; Kracht, M.; Ritter, B.; Wilhelm, A.; Chen, C. Y.; Shyu, A. B. et al. (1999): The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. In: *The EMBO journal* 18 (18), S. 4969–4980. DOI: 10.1093/emboj/18.18.4969.
- Wu, Gary D.; Lai, Edwin J.; Huang, Ning; Wen, Xiaoming (1997): Oct-1 and CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) Bind to Overlapping Elements within the Interleukin-8 Promoter. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (4), S. 2396–2403. DOI: 10.1074/jbc.272.4.2396.
- Xia, Zong-Ping; Sun, Lijun; Chen, Xiang; Pineda, Gabriel; Jiang, Xiaomo; Adhikari, Anirban et al. (2009): Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. In: *Nature* 461 (7260), S. 114–119. DOI: 10.1038/nature08247.
- Xie, K. (2001): Interleukin-8 and human cancer biology. In: *Cytokine & growth factor reviews* 12 (4), S. 375–391. DOI: 10.1016/s1359-6101(01)00016-8.
- Ye, Hong; Arron, Joseph R.; Lamothe, Betty; Cirilli, Maurizio; Kobayashi, Takashi; Shevde, Nirupama K. et al. (2002): Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. In: *Nature* 418 (6896), S. 443–447. DOI: 10.1038/nature00888.
- Yhello (2020): ROI Inclusion analysis - Icy. Online verfügbar unter <http://icy.bioimageanalysis.org/plugin/roi-inclusion-analysis/>, zuletzt aktualisiert am 18.03.2020, zuletzt geprüft am 22.04.2021.
- Yin, Qian; Lin, Su-Chang; Lamothe, Betty; Lu, Miao; Lo, Yu-Chih; Hura, Gregory et al. (2009): E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (6), S. 658–666. DOI: 10.1038/nsmb.1605.
- Zambrano, Samuel; Loffreda, Alessia; Carelli, Elena; Stefanelli, Giacomo; Colombo, Federica; Bertrand, Edouard et al. (2020): First Responders Shape a Prompt and Sharp NF- κ B-Mediated Transcriptional Response to TNF- α . In: *iScience* 23 (9), S. 101529. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101529.
- Zarnack, Kathi; Balasubramanian, Sureshkumar; Gantier, Michael P.; Kunetsky, Vladislav; Kracht, Michael; Schmitz, M. Lienhard; Sträßer, Katja (2020): Dynamic mRNP Remodeling in Response to Internal and External Stimuli. In: *Biomolecules* 10 (9). DOI: 10.3390/biom10091310.
- Zhang, Jiazhen; Clark, Kristopher; Lawrence, Toby; Peggie, Mark W.; Cohen, Philip (2014): An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by autophosphorylation. In: *The Biochemical journal* 461 (3), S. 531–537. DOI: 10.1042/BJ20140444.

12 Anhang

12.1 hTERT-RPE1-Zellen Phänotyp nach IL-1 Behandlung ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung

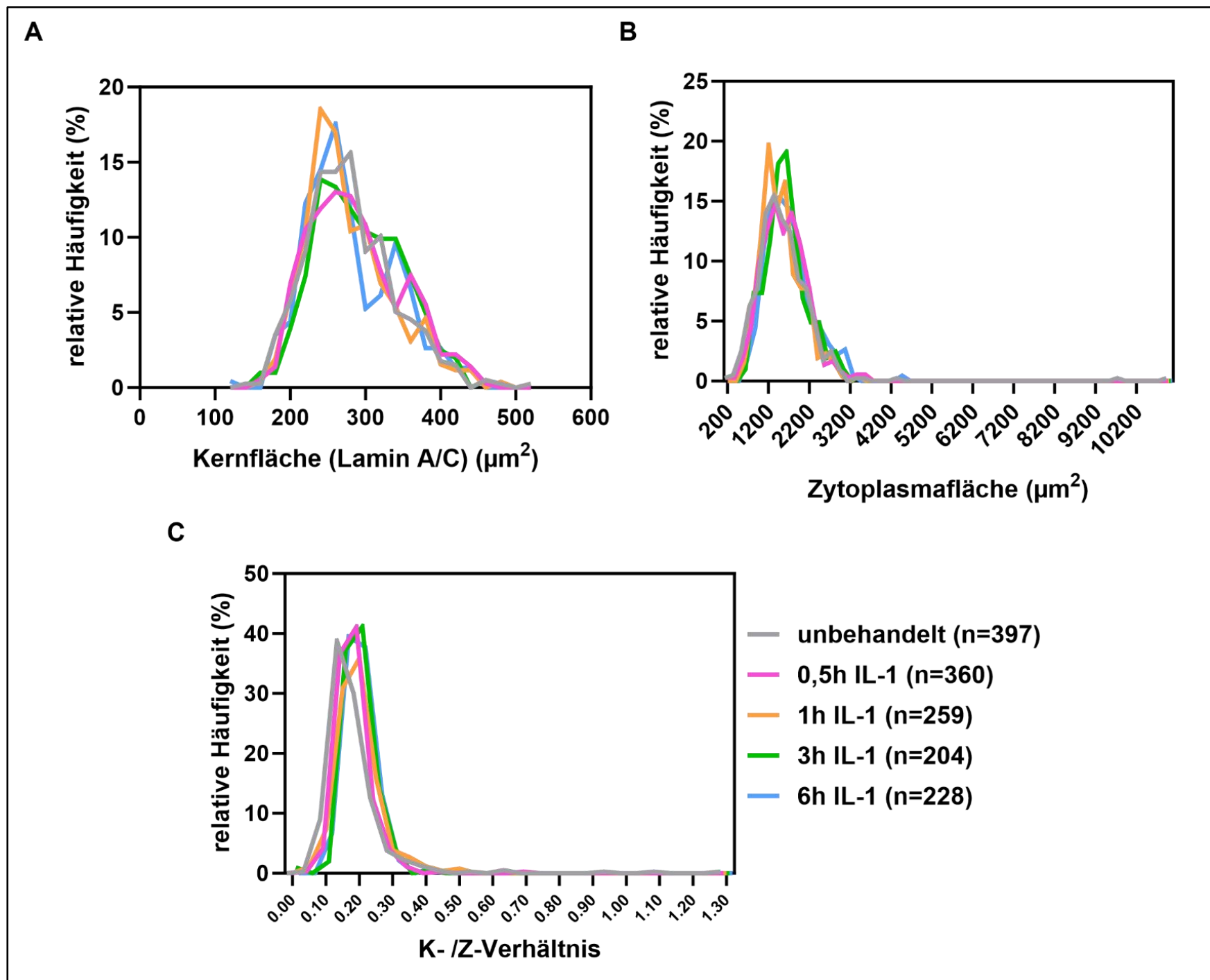


Abbildung 57: Häufigkeitsverteilungen zur Untersuchung des Phänotyps von hTERT-RPE1-Zellen nach IL-1-Stimulation ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung

A: Darstellung der relativen Häufigkeiten der über die Markierung der Kernproteine Lamin A und C gemessenen Kernflächen. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 204 Zellen. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der ermittelten Zytoplasmaflächen. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 204 Zellen. **C:** Darstellung der relativen Häufigkeiten der ermittelten Kern- / Zytoplasmaflächenverhältnisse. Zusammenfassung der Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 204 Zellen

12.2 Validierung der Auswertungsparameter für die mRNA-Menge pro Zelle in der 2D RNA-FISH

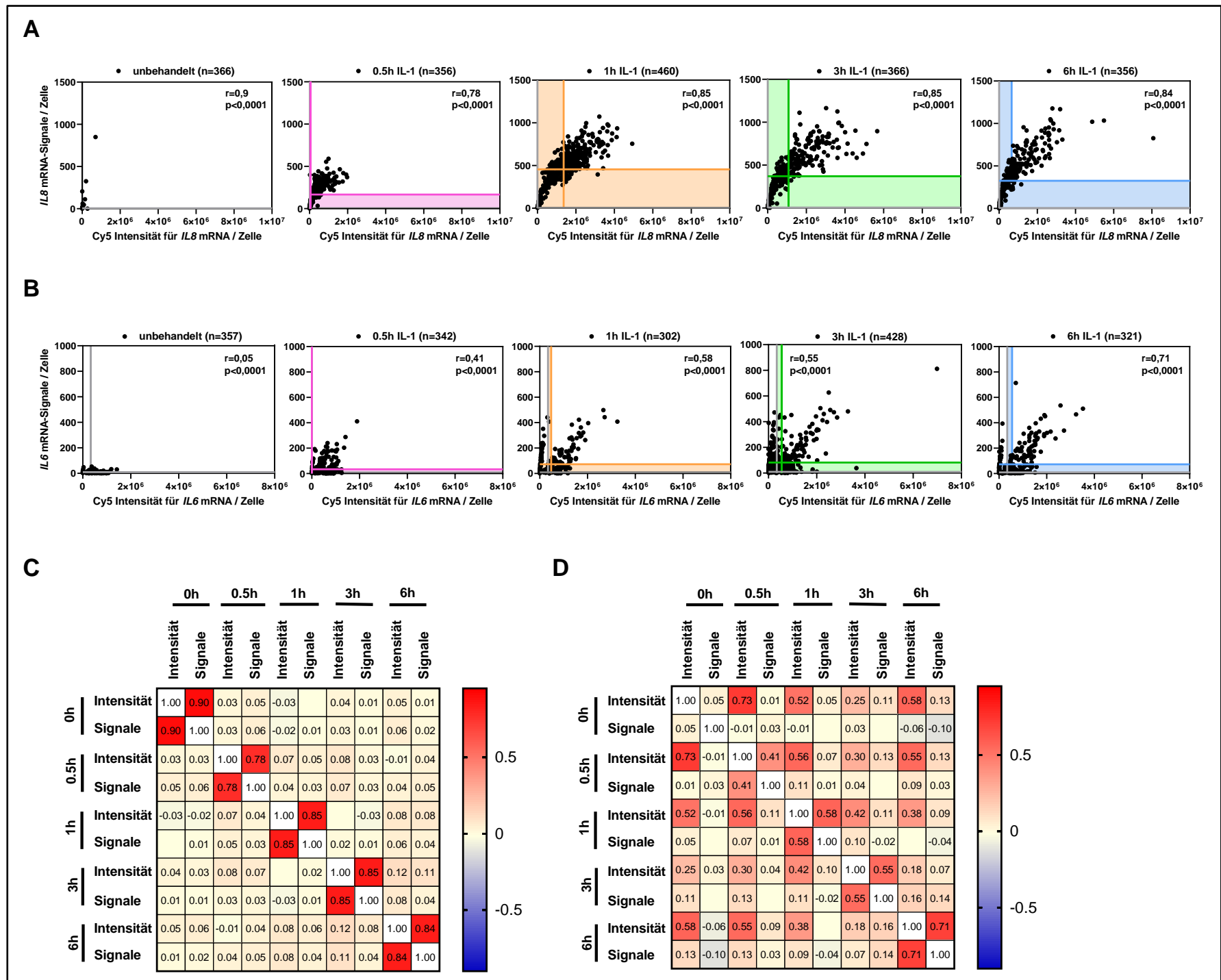


Abbildung 58: Vergleich der, über die Signal-Anzahl gemessenen, mRNA-Menge mit der, über die Intensität gemessenen, mRNA-Menge.

A: Scatter Plots für die Korrelation der *IL8* mRNA Signale pro Zelle und die Cy5 Intensität pro Zelle aus 3 unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 356 Zellen. Angabe des Pearson-Korrelationskoeffizient r . $CI(r(\text{unb.}))=0,88-0,92$, $CI(r(0,5h))=0,73-0,82$, $CI(r(1h))=0,82-0,87$, $CI(r(3h))=0,82-0,87$, $CI(r(6h))=0,81-0,87$. Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten, um zu überprüfen, ob r signifikant von 0 abweicht mit dem Signifikanzniveau $p=0,005$. **B:** Scatter Plots für die Korrelation der *IL6* mRNA Signale pro Zelle und die Cy5 Intensität pro Zelle aus 3 unabhängigen Experimenten mit Gesamtpopulationen von mindestens 302 Zellen. Angabe des Pearson-Korrelationskoeffizient r . $CI(r(\text{unb.}))=-0,06-0,15$, $CI(r(0,5h))=0,31-0,49$, $CI(r(1h))=0,49-0,65$, $CI(r(0,48-0,61))=0,65-0,76$. Durchführung des t-Tests für den Korrelationskoeffizienten Signifikanzniveau $p=0,005$. **C:** Vergleich aller Korrelationskoeffizienten für die Korrelation zwischen der *IL8* mRNA Signal-Anzahl und der Cy5-Gesamtintensität pro Zelle (Intensität) in einer Korrelationstabelle mit farbiger Markierung der Korrelationskoeffizienten entsprechend ihrer Größe. **D:** Vergleich aller Korrelationskoeffizienten für die Korrelation zwischen der *IL6* mRNA Signal-Anzahl (Signale) und der Cy5-Gesamtintensität pro Zelle (Intensität) in einer Korrelationstabelle mit farbiger Markierung der Korrelationskoeffizienten entsprechend ihrer Größe.

12.3 Darstellung der Häufigkeitsverteilung intranukleärer Distanzen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung

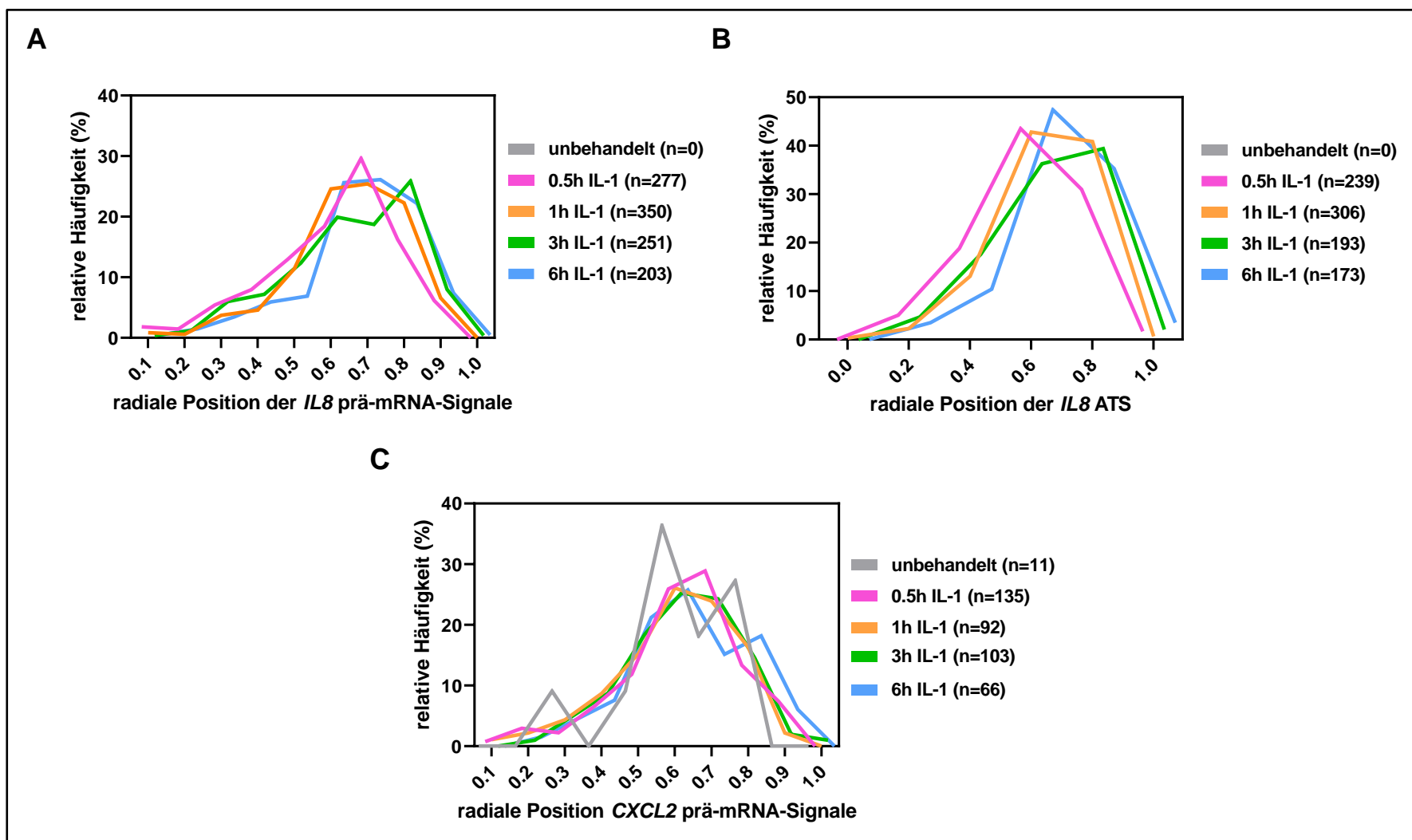


Abbildung 59: Relative Häufigkeiten radialer Positionen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung.

A: Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der aktiven *IL8*-Genloci aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 203 gemessenen Positionen pro Bedingung. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen der ATS für *IL8* aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 173 gemessenen Positionen pro Bedingung. **C:** Relative Häufigkeitsverteilung der radialen Positionen aktiven *CXCL2*-Genloci aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 11 gemessenen Positionen pro Bedingung.

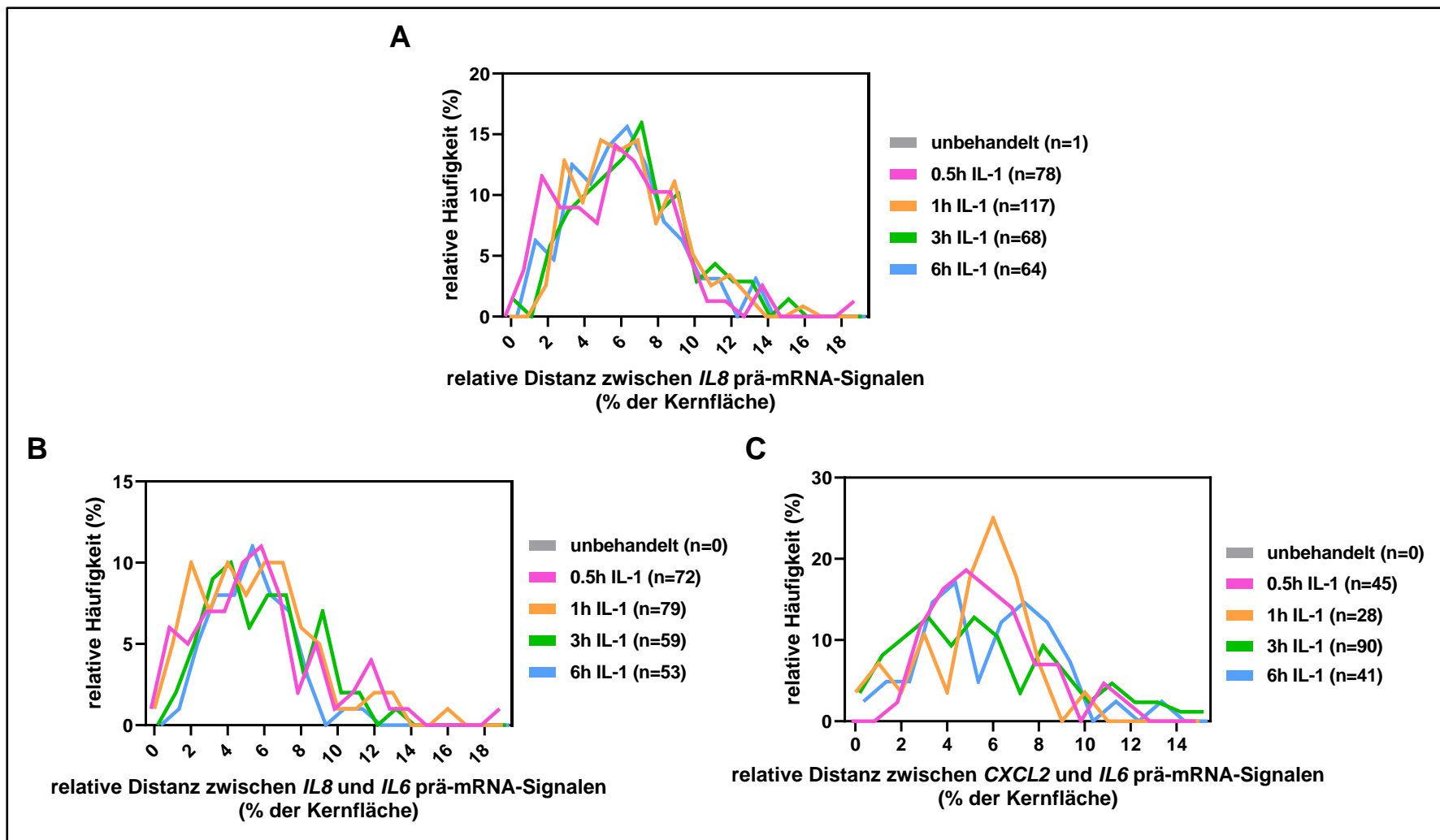


Abbildung 60: Relative Häufigkeiten interallelicher und interchromosomaler Distanzen ohne Anpassung an die Log-Normalverteilung.

A: Relative Häufigkeitsverteilung der interallelichen Distanzen zwischen zwei aktiven *IL8*-Genloci in Zellen mit biallelicher Genexpression als prozentualer Anteil der Kernfläche aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 64 gemessenen Distanzen pro Bedingung. **B:** Relative Häufigkeitsverteilung der Distanzen zwischen aktiven *IL8*- und *IL6*-Genloci als prozentualer Anteil der Kernfläche aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 53 gemessenen Distanzen pro Bedingung. **C:** Relative Häufigkeitsverteilung der relativen Distanzen zwischen aktiven *CXCL2*- und *IL6*-Genloci als prozentualer Anteil der Kernfläche aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen mit mindestens 28 gemessenen Distanzen pro Bedingung.

12.4 Die Kerngröße, Zellgröße und das K-/Z-Verhältnis der Gesamtpopulation erfasst anhand Hoechst in RNA-FISH

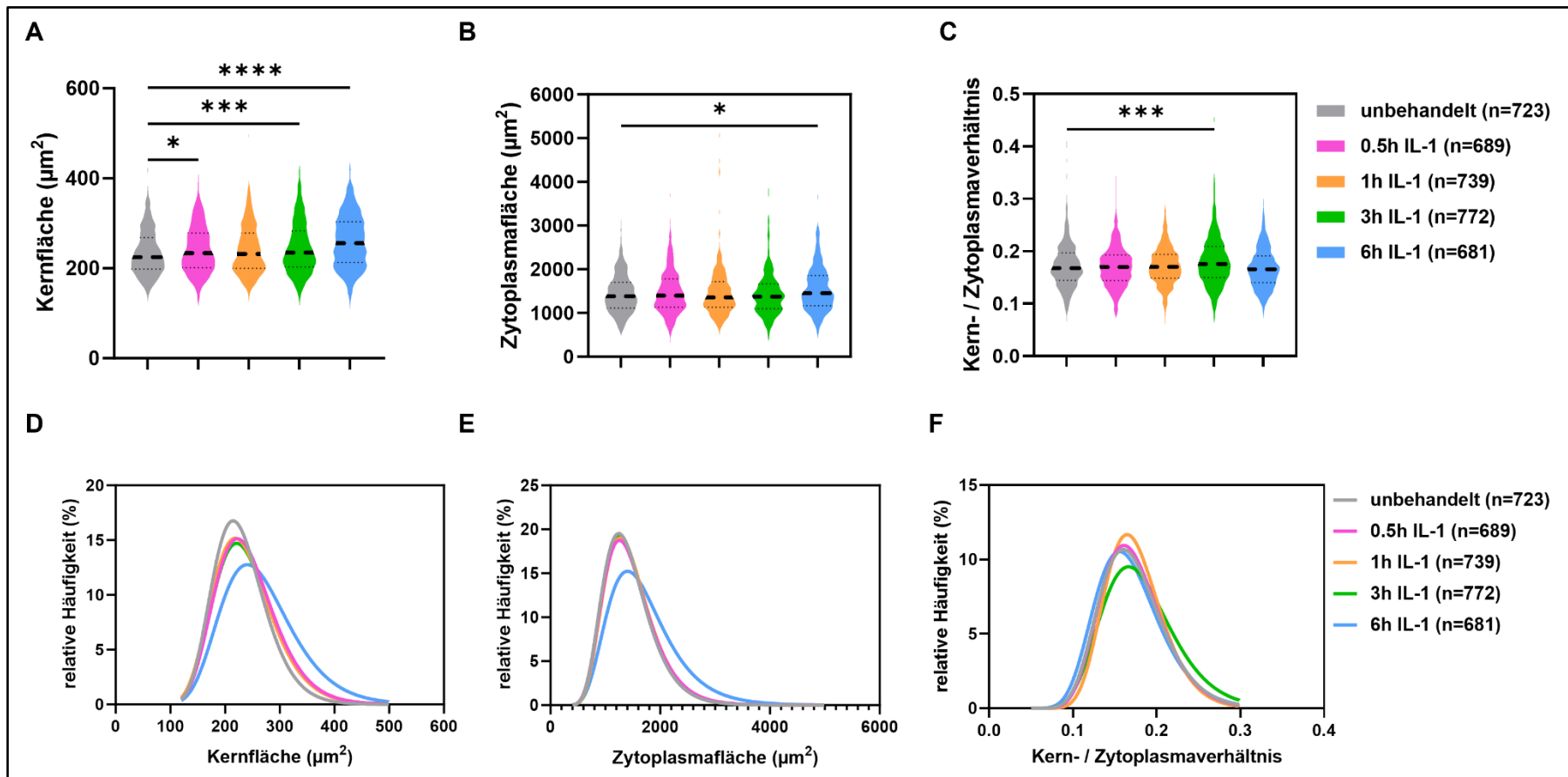


Abbildung 61: Bestimmung der Kernfläche, Zytoplasmfläche und des Kern- / Zytoplasmaverhältnisses der Gesamtpopulation erfasst in 2D RNA-FISH über die Hoechst-Färbung.

A: Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Kernfläche, gemessen über die Hoechstfärbung, aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung. Vergleich der Mittelwerte der Bedingungen mit dem Dunnett's Test mit dem Signifikanzniveau 0,05. *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. **B:** Berechnung der Zytoplasmfläche als Differenz aus Zellfläche und Kernfläche. Darstellung des

Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Zytoplasmafläche aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung. Vergleich der Mittelwerte der Bedingungen mit dem Dunnett's Test mit dem Signifikanzniveau 0,05*: $p < 0,05$. **C:** Berechnung der Kern-/ Zytoplasmaverhältnisses als Quotient aus der Kernfläche und der Zytoplasmafläche. Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Kern-/ Zytoplasmaverhältnisses aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung. Vergleich der Mittelwerte der Bedingungen mit dem Dunnett's Test mit dem Signifikanzniveau 0,05. ***: $p < 0,001$. **D:** Relative Häufigkeitsverteilung der Kernfläche, gemessen über die Hoechstfärbung, aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung. **E:** Relative Häufigkeitsverteilung der Zytoplasmafläche aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung. **F:** Relative Häufigkeitsverteilung der Kern-/Zytoplasmaverhältnisses aus drei unabhängigen Experimenten und 2 technischen Replikaten in einer Gesamtpopulation von mindestens 681 Zellen pro Bedingung.

12.5 CXCL2 mRNA-Menge und die Kernfläche gemessen in Immuno-RNA-FISH

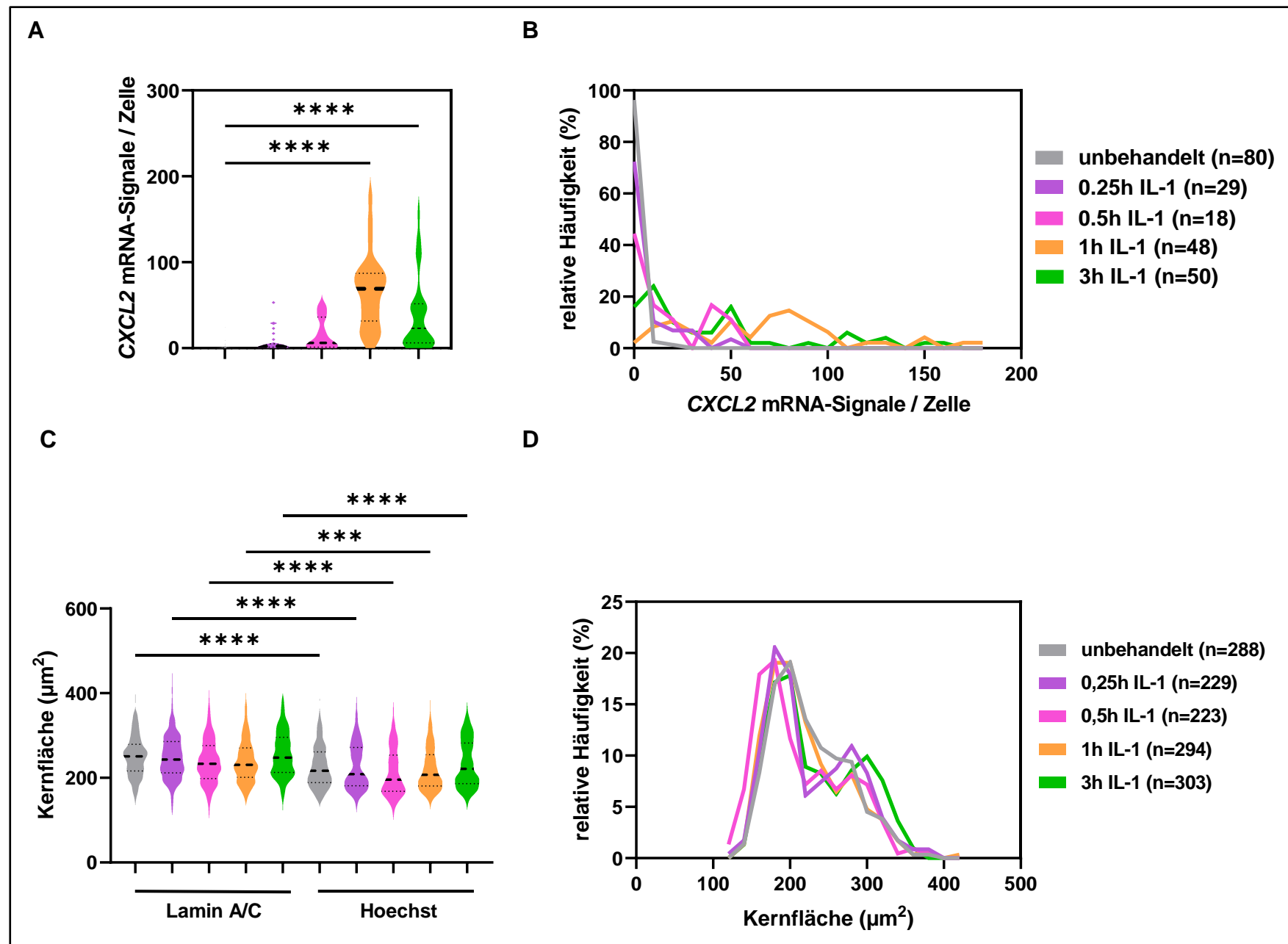


Abbildung 62: Darstellung der in der Immuno-RNA-FISH gemessenen CXCL2 mRNA-Menge und der Kerngröße.

A: Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der detektierten CXCL2 mRNA-Anzahl als *violin plot*. Vergleich der Mittelwerte der behandelten Populationen mit dem Mittelwert in unbehandelten Zellen mit dem Dunnetts-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. **B:** Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der Anzahl der CXCL2 mRNA-Signale pro Zelle. **C:** Darstellung des Medians, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der detektierten CXCL2 mRNA-Anzahl als *violin plot*. Vergleich der Mittelwerte der behandelten Populationen mit dem Mittelwert in unbehandelten Zellen mit dem Dunnetts-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. **D:** Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der Anzahl der CXCL2 mRNA-Signale pro Zelle.

12.6 Herleitung der Fluoreszenzgrenzen Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen in 3D RNA-FISH

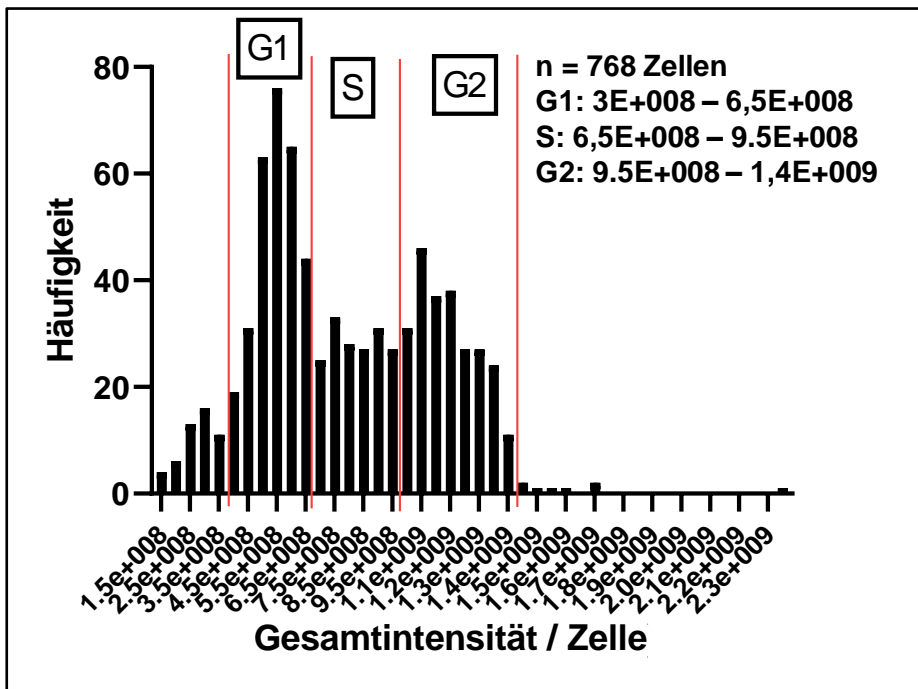


Abbildung 63: Herleitung der Fluoreszenzgrenzen für die Bestimmung der Zellzyklusphasen in 3D RNA-FISH.

Darstellung der absoluten Häufigkeitsverteilung der Gesamtfluoreszenzintensität für Hoechst pro Zelle. Analog zu der von Roukos beschriebenen Methode sollte anhand der Intensität Hoechst-Färbung der einzelnen Zellkerne die Zellzyklusphase der entsprechenden Zellen bestimmt werden ((Roukos et al. 2015). Hierfür wurde die Hoechst-Intensität pro Zellkern gemessen und alle bestimmten Intensitäten als hier gezeigtes Histogramm dargestellt. Anschließend wurde anhand der charakteristischen Verteilung definiert, welche Fluoreszenzintervalle, welcher Zellzyklusphase zugeordnet werden sollten. Diese sind in der Häufigkeitsverteilung eingetragen und in Zahlen vermerkt.

12.7 Quantifizierung aktiver Genloci für *IL8* und *IL6* in 3D RNA-FISH

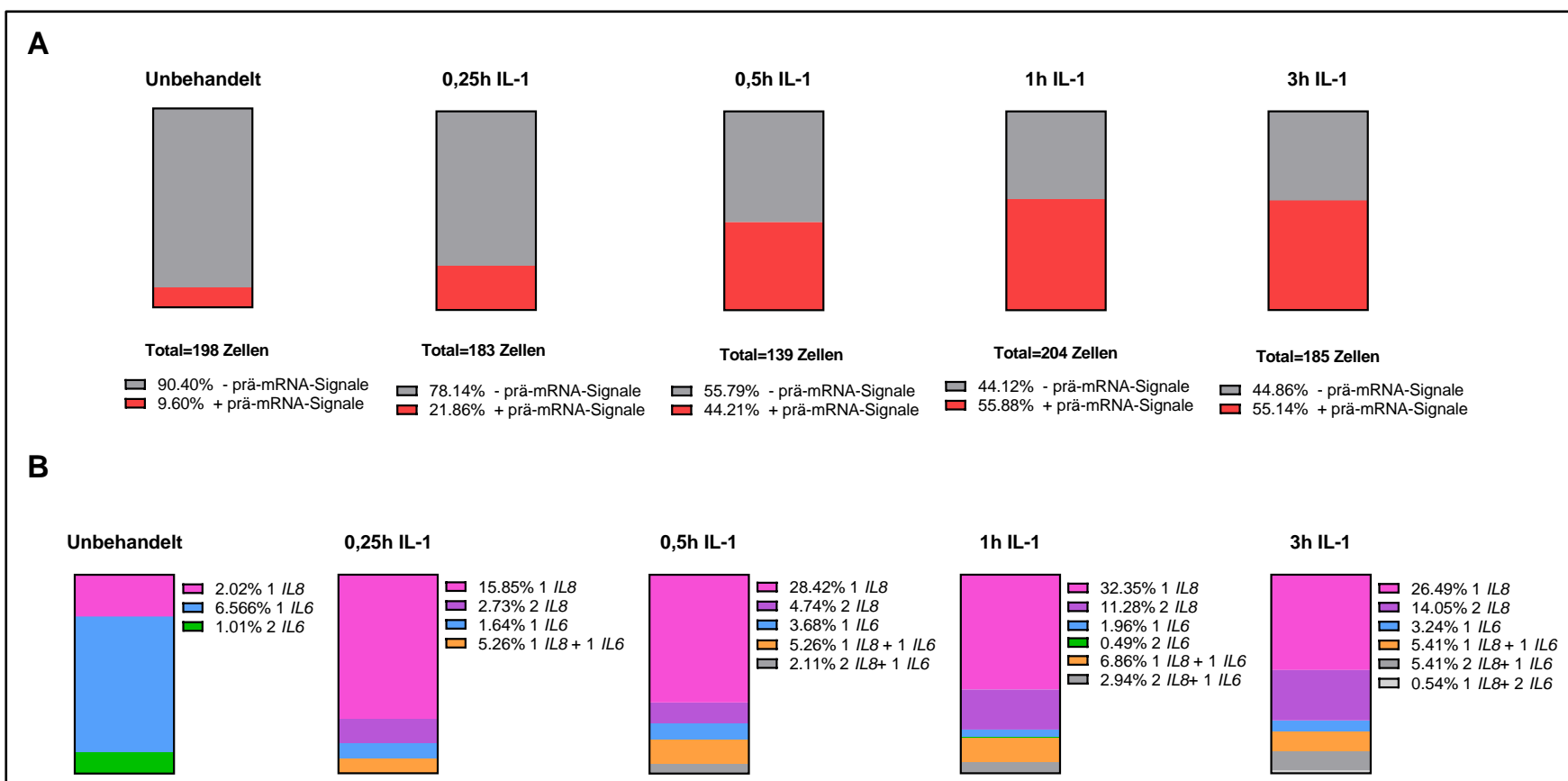


Abbildung 64: Quantifizierung aktiver Genloci für *IL8* und *IL6* in 3D RNA-FISH.

A: Darstellung des relativen Anteils (%) der Zellen mit (+) und ohne (-) prä-mRNA Signale für *IL8* oder *IL6* von der Gesamtpopulation für die verschiedenen Zeitpunkte nach IL-1-Stimulation aus 2 unabhängigen Experimenten für mindestens 139 Zellen pro Bedingung. **B:** Darstellung des Vorkommens verschiedener Kombinationen aktiver *IL8* und *IL6* Genloci innerhalb einer Zelle als Anteil von der Gesamtpopulation (%)

12.8 Untersuchung der Distanzen aktiver Genloci zueinander und zum Kernzentrum im dreidimensionalen Raum

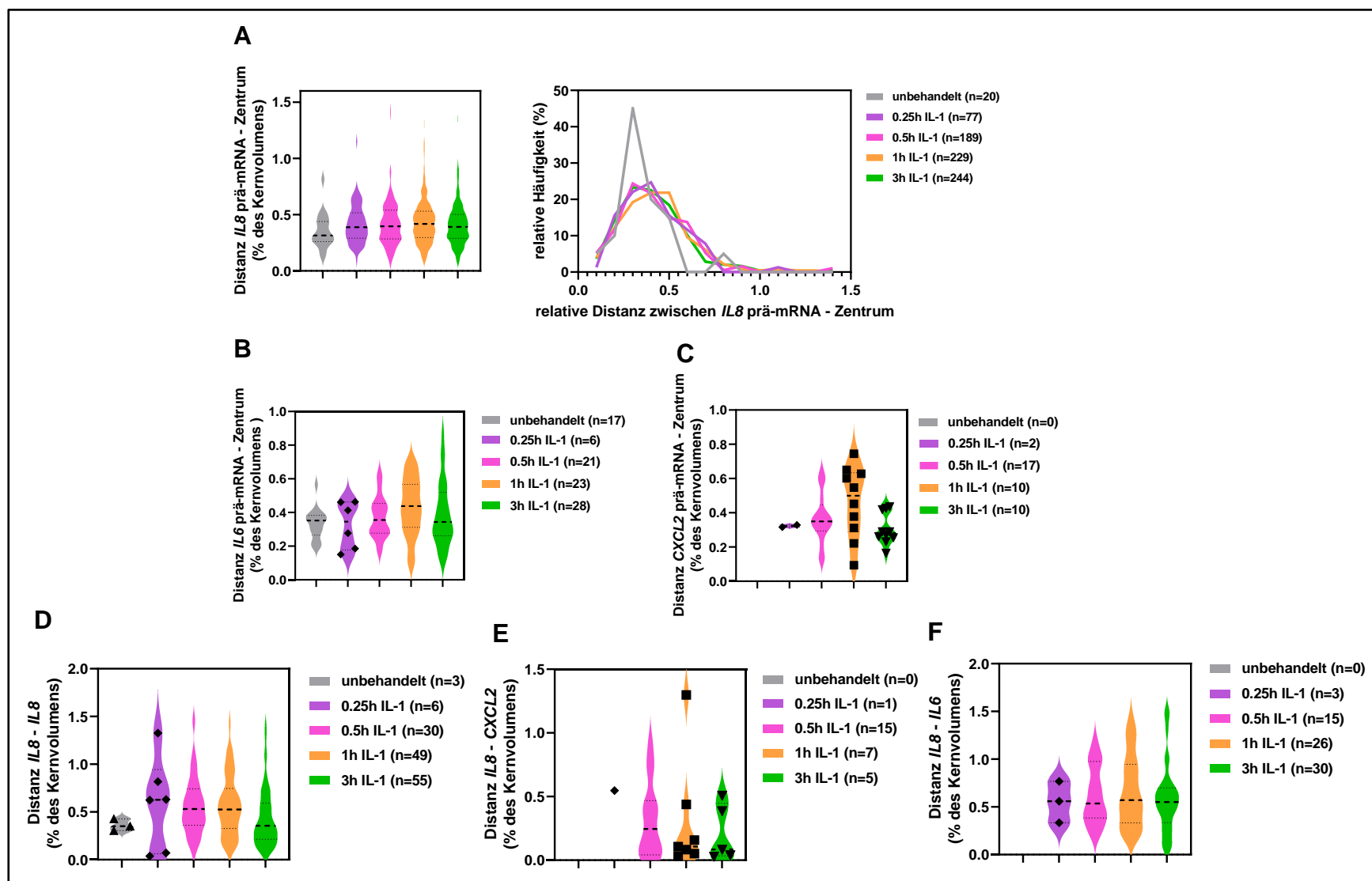


Abbildung 65: Darstellung der in 3D RNA-FISH gemessenen Distanzen zum Kernzentrum und zueinander.

A: Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen *IL8* prä-mRNA-Signalen und dem Kernzentrum in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot* und als relative Häufigkeitsverteilung. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. **B:** Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen *IL6* prä-mRNA-Signalen und dem Kernzentrum in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot*. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Bei Stichprobengrößen ≤ 10 wurden die einzelnen Werte eingetragen. **C:** Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen *CXCL2* prä-mRNA-Signalen und dem Kernzentrum in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot*. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Bei Stichprobengrößen ≤ 10 wurden die einzelnen Werte eingetragen. **D:** Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen zwei *IL8* prä-mRNA-Signalen in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot*. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Bei Stichprobengrößen ≤ 10 wurden die einzelnen Werte eingetragen. **E:** Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen *IL8* und *CXCL2* prä-mRNA-Signalen in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot*. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Bei Stichprobengrößen ≤ 10 wurden die einzelnen Werte eingetragen. **F:** Darstellung des Medianes, der Quartile und der Häufigkeitsverteilung der Distanz zwischen *IL8* und *IL6* prä-mRNA-Signalen in Prozent vom Kernvolumen als *Violin Plot*. Vergleich der Mittelwerte der aller Populationen mit dem Tukey-Test und dem Signifikanzniveau $p=0,05$. Bei Stichprobengrößen ≤ 10 wurden die einzelnen Werte eingetragen.

12.9 Übersicht über die Ergebnisse der Messung der Kerngröße mittels verschiedener Methoden

Methode	Markierung des Kerns	Mikroskopie	Stichprobengröße	Inklusionsbedingungen	Kapitel	Mittlere(s) Kernfläche bzw. -volumen	Signifikante Unterschiede
IF	Lamin A/C	2D	n=3 min. 202 Zellen pro Bedingung	p65-Lokalisation	4.2.	280,0 μm^2	keine
RNA-FISH	Hoechst	2D	n=3 min. 681 Zellen pro Bedingung	alle Zellen	4.6.2.	234,5 μm^2	A(0,5h, 3h, 6h IL-1) > A (unb.); p<0,05
Immuno-RNA-FISH	Lamin A/C	2D	n=2 min. 223 Zellen pro Bedingung	alle Zellen	4.7.1.	225,9 μm^2	keine
RNA-FISH	Hoechst	3D	n=2 min. 329 Zellen pro Bedingung	alle Zellen	4.7.2.	1597 μm^3	V(0,25h, 0,5h, 1h IL-1) < V(unb., 3h IL-1); p<0,05
DNA-FISH	Hoechst	3D	n=2 min. 231 Zellen pro Bedingung	p65-Lokalisation	Unveröffentlichte Daten AG Kracht		V(1h IL-1) > V(unb., 1h IL-1 + Oxo); p<0,001

Tabelle 2: Übersicht über mit verschiedenen Methoden erfasste Kerngrößen.

IF: indirekte Immunfluoreszenz; RNA-FISH: RNA-Fluoreszenz-*inSitu*-Hybridisierung; DNA-FISH: DNA-Fluoreszenz-*inSitu*-Hybridisierung; p65-Lokalisation: in die Auswertung wurden, die Zellen inkludiert, in denen unbehandelt und nach 3h und 6h Inkubation mit IL-1 p65 hauptsächlich im Zytoplasma, und nach 0,5h und 1h IL-1-Behandlung p65 hauptsächlich im Zellkern lokalisiert war; AG: Arbeitsgruppe; A: Kernquerschnittsfläche; unb.: unbehandelt; V: Kernvolumen; 1h IL-1 + Oxo: Behandlung der Zellen mit IL-1 über 1h und mit dem TAK-1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol.

13 Publikationsverzeichnis

Keine.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/ Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Kracht für die Ermöglichung einer Doktorarbeit im Rudolf-Buchheim-Institut über ein interessantes und anspruchsvolles Thema, sowie die Realisierung einer strukturierten Erarbeitung bedanken. Ich bedanke mich ebenfalls für viele lehrreiche und motivierende Gespräche.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Dr. Christin Mayr-Buro für die ausführliche Einarbeitung im Labor und am Mikroskop, sowie für die Unterstützung in der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse meiner Experimente bedanken. Vielen Dank, dass Du mir so geduldig bei Problemen geholfen und große Teile meiner Arbeit am Ende Korrektur gelesen hast.

Ich bedanke mich beim gesamten Team des Rudolf-Buchheim-Institutes dafür, dass Ihr mich so herzlich aufgenommen und während meiner Arbeit unterstützt habt. Mein besonderer Dank gilt AOR Dr. Knut Beuerlein, Dr. Ulaş Tenekeci und Anna Beyerlein für die Einarbeitung am Mikroskop und in die Softwares zur Auswertung der Mikroskopien.

Ich danke meinen Eltern, dafür dass ich Ihr mich immer motiviert habt mich mit Naturwissenschaften zu beschäftigen und ihr mir die Möglichkeit gegeben, diese Arbeit zu verwirklichen. Danke für eure lebenslange Unterstützung. Außerdem bedanke ich mich bei Papa und Johannes, dass Ihr euch die Zeit genommen habt, meine Arbeit auf Fehler zu überprüfen, die ich selbst nicht mehr gesehen habe.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden, für euer offenes Ohr und eure Ermutigungen. Danke Richard dafür, dass ich mich immer auf dich verlassen kann.

