Charakterisierung der Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor von *Phaseolus coccineus* L.

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Mario Nenno

Kaiserslautern 1998
(D 386)

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. Juli 1998

Prüfungskommission:
Vorsitzender: Prof. Dr. B. Büdel
Erster Berichterstatter: PD Dr. H. Scherthan
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. H. J. Schmidt

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Kaiserslautern, den 22.6.1998

Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

- Prof. Dr. Walter Nagl für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und den großen Freiraum bei dessen Bearbeitung
- Herrn PD Dr. H. Scherthan und Herrn Prof. Dr. H. J. Schmidt, daß sie sich als Gutachter zur Verfügung gestellt haben
- Frau Dorothea Zink für die Überlassung der meisten der verwendeten Oligonukleotide, ihre Diskussionbereitschaft, ihre wertvollen Anregungen und ihre freundliche Unterstützung
- Herrn Dr. Harald Fuge und Herrn Dr. Thomas Becker für ihre nimmermüde Hilfe in Form von ausführlichen und fruchtbaren Diskussionen und bei den Korrekturen
- Frau Andrea Trinkaus für stetes Bemühen um eine geregelte Organisation in der Arbeitsgruppe
- Herrn Thorsten Meywald für seine Hilfe bei Fragen der Fotografie und Reproduktion
- Herrn Prof. Dr. Dieter Schweizer für die Bereitstellung des noch unveröffentlichten Idiogramms von *Phaseolus coccineus*
- allen ehemaligen MitarbeiterInnen der Abt. Zellbiologie für bereichernde Diskussionen und das freundliche Arbeitsklima
- und den MitarbeiternInnen des Gartens der Universität, die sich um die Anzucht des Pflanzenmaterials gesorgt haben

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines über Polytänchromosomen

Polytänchromosomen lassen sich als ungewöhnlich große Interphase-Chromosomen mit hohem DNA-Gehalt und speziellen strukturellen Eigenschaften definieren. Im deutschen Sprachraum wurden sie allein aufgrund ihrer immensen Größe im Vergleich zu Metaphasechromosomen als „Riesenchromosomen" bezeichnet. Dieser Name spiegelt aber nur einen Aspekt ihrer besonderen Merkmale wider.

Allen Polytänchromosomen gemeinsam ist, daß sie aus vielen benachbart liegenden Chromatinsträngen (Chromatiden) bestehen. Ihre große Zahl entsteht, ausgehend von einem Chromatinstrang, durch wiederholte Verdopplungen, ohne daß sich die neu entstandenen anschließend von den vorherigen Chromatiden trennen. Liegen die Chromatiden dicht nebeneinander, so bilden sie ein kompaktes Bündel. Im Fall der sog. „klassischen" Polytänchromosomen sind die Chromatiden besonders genau ausgerichtet und ihre dicht und exakt nebeneinander liegenden Chromomeren (Verdichtungen von Chromatin) bilden ein Querbandenmuster. Diese Bänderung ist im Lichtmikroskop bereits ohne Färbung erkennbar. Bei höherer Vergrößerung im Elektronenmikroskop lassen sich die hellen bzw. dunklen Banden des Querbandenmusters als locker strukturierte bzw. kompakte Bereiche von Chromatin auflösen. Die hellen Banden werden bei Polytänchromosomen der Dipteren als „Interbanden" bezeichnet.

1.2 „Klassische" Polytänchromosomen

1.2.1 Dipteren

Die bekanntesten Vertreter der klassischen Polytänchromosomen stammen aus Speicheldrüsen der Larven einiger *Chironomiden* (Zuckmücken) und von *Drosophila* (Obst-/Taufliege). Zwar kommen Polytänchromosomen auch in Zellen der Malpighi-Gefäße, Borstenbildungszellen und Trophozyten dieser Dipteren vor, aber die Chromosomen in den Speicheldrüsen weisen eine sehr hohe Zahl von Chromatiden auf (beide Homologen zusammen: 2048 bei *Drosophila melanogaster*, 16384 bei *Chironomus tentans*). Dadurch erreichen sie eine beachtliche Dicke von 15 µm bei *Ch. plumosus* und immerhin 2,8 - 4,0 µm bei *D. melanogaster*. Dies erlaubt es, ihre chromosomenspezifische Bänderung bereits im Lichtmikroskop zu untersuchen. Ferner wurde bereits sehr früh begonnen, genetische Merkmale der zahlreichen Mutanten von *Drosophila* zu kartieren und diese genetische Information mit den cytologisch sichtbaren Merkmalen auf den Chromosomen zu korrelieren. Damit ist auch verständlich, daß die Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila* und *Chironomus* zu den bestuntersuchten Objekten in der cytogenetischen Forschung zählen (Übersicht bei Sorsa 1988).

Obgleich gebänderte Polytänchromosomen erstmals 1881 von Balbiani in Speicheldrüsen der Larven von *Chironomus plumosus* entdeckt wurden, ist ihr Vorkommen nicht auf diese Insektengruppe beschränkt. Zählt man außer den klassischen Polytänchromosomen auch die ohne Querstrukturierung hinzu, kommen sie in fast allen Organismen-Gruppen, vom Einzeller, über Blütenpflanzen, anderen Insekten, bis hin zu Säugetieren vor (Nagl 1978; Übersichten bei Zhimulev 1996).

Obwohl das Bandenmuster bereits bei der Erstbeschreibung als charakteristisches Merkmal auffiel, begannen die cytogenetischen Untersuchungen erst, als Kostoff (1930) den direkten Zusammenhang zwischen Bandenmuster und der linearen Anordnung der Gene entdeckte. Bis zu diesem Zeitpunkt kannte man nur genetische Kopplungs-Karten und orientierte sich an den permanten Puffs (nach ihrem Entdecker „Balbiani-Ringe“ genannt) sowie an den in bestimmten Stadien auftretenden temporären Puffs. Nach Kostoffs Entdeckung wurden die Bandenmuster auch zur Kartierung und Charakterisierung der Polytänchromosomen herangezogen (Painter 1933). Zeitgleich kamen Painter (1933) sowie Heitz und Bauer (1933) zu der fundamentalen Erkenntnis, daß die Polytänchromosomen nicht aus einer einzigen, sondern aus vielen homologen Chromatiden zusammengesetzt sind, die Seite an Seite beieinander liegen. Zwei Jahre später stellte Bridges eine weitere komplette Karte mit einem Referenzsystem zur Identifizierung der Banden für *Drosophila melanogaster* auf (Bridges 1935). Er teilte die Speicheldrüsenchromosomen in insgesamt 102 Abschnitte mit sechs Unterabschnitten A-F auf. Dieses System wurde auch zur Kartierung der Polytänchromosomen anderer Dipteren verwendet. Vierzig Jahre später stellte Lefevre eine Karte zur einfacheren Orientierung und Interpretation vor, die nicht mehr aus Kamera-Lucida-Zeichnungen bestand, sondern sich aus vielen einzelnen lichtmikroskopischen Fotos zusammensetzte (Lefevre 1976). Man kennt heute auf den vier Polytänchromosomen von *Drosophila* (ohne X und Y) insgesamt ca. 5000 Banden, die ausschließlich in den euchromatischen Bereichen vorkommen. Charakteristisch für die Polytänchromosomen aller Dipteren ist, daß die beiden homologen Chromosomen gepaart sind und sie daher im cytologischen Präparat in der haploiden Anzahl auftreten. Als weitere Besonderheit bei verschiedenen Arten von *Drosophila* (z. B. *D. melanogaster*, *D. virilis*) kommt hinzu, daß die vier polytänen Chromosomenpaare mit ihrem centromerischen Heterochromatin („Chromocentrum“) zusammenhängen (Übersicht bei Sorsa 1988).

1.2.2 Ciliaten

Ciliaten besitzen zwei Typen von Kernen (Kern-Dualismus). Der Mikronukleus ist meist sehr klein, weist in der Regel nur den diploiden DNA-Gehalt auf und synthetisiert kaum RNA. Der Makronukleus ist deutlich größer, hat mehr DNA als der Mikronukleus und versorgt die Zelle während der vegetativen Periode mit RNA.

Im Laufe der komplexen Abläufe der sexuellen Reproduktion werden sog. Makronukleus-Anlagen gebildet, aus denen am Ende wieder ein neuer Makronukleus ensteht. Bei verschiedenen Gattungen wie z. B. *Stylonychia*, *Euplotes* und *Oxytricha* kommen darin für eine begrenzte Zeit ähnlich gebänderte Polytänchromosomen vor wie bei Dipteren (Balbiani 1890). Allerdings bleiben sie bei Ciliaten nicht erhalten, sondern zerfallen bald wieder in kleine Segmente, von denen anschließend 90% eliminiert werden (Ammermann 1971). Die Identifizierung der zahlreichen Polytänchromosomen gestaltet sich bis heute als äußerst schwierig, da sie die Tendenz haben, sich hintereinander zu hängen und sog. „assembled chromosomes“ zu bilden (Zhimulev 1996). Die Gesamtlänge kann dabei beachtliche Werte annehmen: 8750 - 9140 µm bei *Euplotes aediculatus* im Vergleich zu 765 µm bei *Drosophila melanogaster* (Ammermann 1971; Hochstrasser und Sedat 1987)

1.3 Polytänchromosomen bei Pflanzen

Die ersten Beschreibungen von polytänen Chromosomenstrukturen bei Pflanzen stammen wie die der Dipteren aus dem ausgehenden neunzehnten Jahrhundert. Strasburger (1887) entdeckte sie im Embryosack von *Fritillaria imperialis* und Osterwalder (1898) in den Antipoden von *Aconitum*. Osterwalder erkannte als erster die Ähnlichkeit mit den von Balbiani beschriebenen Strukturen aus den Speicheldrüsen von *Chironomus*, und auch anderen Autoren fiel eine Übereinstimmung auf (Hertwig 1906). Es folgten noch weitere Beschreibungen von ähnlich gebauten Chromosomen (z. B. Geitler 1953). Auch die beiden Cytogenetikerinnen Tschmermak-Woess und Hasitschka beobachteten „eigenartige band- bis wurstförmig, gewundene Gebilde“ in den Kernen der Integumentepidermis von *Melandrium viscosum* und in den Trichomen an den Staubblättern von *Bryonia* (Tschermak-Woess und Hasitschka 1954). Die Autorinnen waren sich zunächst unsicher, ob diese Gebilde mit den somatisch gepaarten Riesenchromosomen der Dipteren vergleichbar seien. Erst nachdem sie ähnliche Strukturen an den bereits von Osterwalder untersuchten „Riesenkernen“ der Antipodenzellen von *Aconitum* (Tschermak-Woess 1956) wiederentdeckten und ähnliche Chromosomen auch bei *Papaver rhoeas* (Hasitschka 1956) fanden, wuchs die Gewißheit. So schreibt Tschermak-Woess: „ ... kann wohl kein Zweifel über die Deutung der pflanzlichen 'Riesenchromosomen' bestehen: auch diese sind nichts anderes als Bündel von Chromonemen, die im Zuge der endomitotischen Polyploidisierung aus einem Ausgangschromosom hervorgehen“ (Tschermak-Woess 1956, S.128; Hasitschka 1956). Allerdings wurde der Begriff „Riesenchromosomen“ bei Pflanzen weiterhin in Anführungszeichen gesetzt, denn sie zeigten im Vergleich zu den klassischen Polytänchromosomen von Dipteren keine Querbandenmuster und das Längenverhältnis von mitotischen zu polytänen Chromosomen beträgt mit ca. 1:10 nur ein Zehntel dessen von Dipteren (Hasitschka 1956). Daß diese grundlegenden Arbeiten in die spätere Literatur kaum Eingang gefunden haben, läßt sich nach Therman (1995) vermutlich darauf zurückführen, daß sie in deutscher Sprache erschienen.

Die systematische Suche nach Polytänchromosomen in anderen Pflanzen wurde am Botanischen Institut der Universität Wien weiter fortgesetzt, und auch Beobachtungen anderer Forscher schlossen sich an. Eine Übersicht über das Vorkommen von Polytänchromosomen in 30 Pflanzenarten, die bis 1979 veröffentlicht wurden, findet sich bei Nagl (1981). Sechs weitere

Berichte über Polytänchromosomen bei Pflanzen, die erst nach 1979 erschienen sind, werden in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Vorkommen und Erstbeschreibungen von Polytänchromosomen in Angiospermen, die nach 1979 erschienen. Ältere Veröffentlichungen finden sich bei Nagl (1981).

Art	Gewebe	Literatur
Lotus pedunculatus	Suspensor	Freed und Grant 1976 [1]
Melandrium viscosum	Integument-Epidermis	Tschermak-Woess und Hasitschka 1954 [1]
Phaseolus coccineus	Tapetum	Guerra und Carvalheira 1994
Pisum savtivum	Wurzelspitzen	Therman und Murashige 1984
Psophocarbus tetragonolobus	Suspensor	Sen 1980
Triticum aestivum	Wurzelspitzen	Shang und Wang 1991
	embryogenen Kalli	Shang und Wang 1991
Vigna unguiculata	Tapetum	Guerra und Carvalheira 1994

[1] Ergänzungen für die Zeit bis 1979

1.4 Polytänchromosomen bei *Phaseolus*

1.4.1 Vorkommen und Polyploidiegrad

Polytänchromosomen mit einem Querbandenmuster wurden bei Pflanzen erstmalig von Nagl in den großen Zellen des Suspensors von *Phaseolus coccineus* und *P. vulgaris* entdeckt (Nagl 1962a; Nagl 1969b). Zwar kommen Chromosomen mit der Tendenz zur Polytänie auch in sechs weiteren von insgesamt zehn untersuchten *Phaseolus*-Arten vor, aber keine wies bisher einen höheren Polyplodisierungsgrad und eine solche kompakte Bündelung auf wie die von *P. coccineus* (vgl. Nagl 1974, Tabelle 3). Kleinere und weniger stark gebündelte Polytänchromosomen wurden auch im Tapetum der Antheren von *P. coccineus* und *Vigna unguiculata* beobachtet (Guerra und Carvalheira 1994).

Der Suspensor oder Embryoträger ist bei Angiospermen ein kurzlebiges, stielartiges Gebilde, das aus einem Teil des Proembryo hervorgeht. Die Aufgabe des Suspensors ist es, den Embryo während seiner Entwicklung in das sich bildende Nährgewebe hineinzuschieben und ihn mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu versorgen (Übersicht bei Yeung und Meinke 1993). Danach degeneriert er und läßt sich in reifen Samen nicht mehr nachweisen.

In Samen von *Phaseolus* besteht der Suspensor aus einem Verband von einigen hundert Zellen deren Größe vom Embryo zur Mikropyle hin zunimmt. Die größten Zellen des Suspensors befinden sich im basalen Teil, in direkter Nachbarschaft zur Mikropyle (Abbildung 1). Struktur und Ultrastruktur des Suspensors während der Embryogenese wurden sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch ausführlich untersucht (Schnepf und Nagl 1970; Yeung und Clutter 1978; 1979).

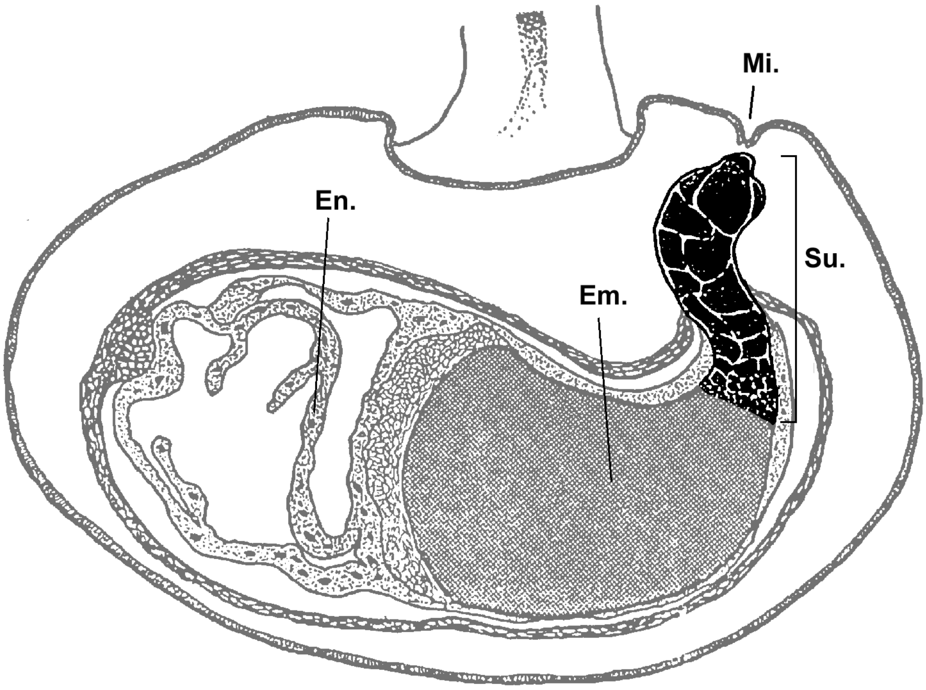


Abbildung 1: Schematischer Längsschnitt durch einen unreifen Samen von *Phaseolus*. (Em. = Embryo und Cotyledonen; En. = Endosperm; Mi. = Mikropyle; Su. = Suspensor).

Da das Volumen der Suspensorzellen von *P. coccineus* direkt mit ihrem DNA-Gehalt korreliert, wurde aus dem maximal beobachteten Volumen der größten Zellen auf einen maximalen relativen DNA-Gehalt von 4096 n geschlossen (Nagl 1962a). Spätere Messungen an Feulgen-gefärbten Präparaten von Polytänchromosomen ergaben einen noch höheren Maximalwert von 8192 C (Brady 1973). Es zeigte sich auch, daß nicht alle großen und basal gelegenen Zellen des Suspensor den selben hohen DNA-Gehalt aufweisen, sondern ihre Werte zwischen 256 C und 8192 C schwanken.

Der hohe DNA-Gehalt kommt dadurch zustande, daß die Kerne der Suspensorzellen etwa 10 bis 12 Endoreduplikations-Zyklen durchlaufen. Die Endoreduplikation (vgl. Pearson 1974) stellt eine Abkürzung des normalen mitotischen Zellzyklus dar, bei dem die DNA ohne strukturelle Veränderungen des Zellkerns dupliziert wird, wie sie für eine Mitose typisch wären (Levan und Hauschka 1953). Im Fall von Polytänchromosomen werden dadurch zahlreiche Chromatiden (in diesem Zusammenhang nach Nagl (Nagl 1978) Endochromosomen genannt) gebildet, die sich nicht voneinander trennen, sondern Seite an Seite beieinander liegen bleiben. Daß die Endochromosomen bei pflanzlichen Polytänchromosomen allerdings nicht so genau parallel ausgerichtet sind wie bei den klassischen Polytänchromosomen, läßt sich, nach Nagl, auf die Zerstäubungs- oder Z-Phase (Heitz 1929) zurückführen. Sie hat zur Folge, daß die

Polytänchromosomen von Pflanzen normalerweise kaum oder keine Querbandenmuster ausbilden (Zur Ausbildung unter besonderen Zuchtbedingung, siehe unten).

1.4.2 Charakterisierungen der Phaseolus-Polytänchromosomen

Für eine Gesamtübersicht der Arbeiten an den Polytänchromosomen von *Phaseolus* sei auf zwei ausführliche Zusammenfassungen verwiesen (Nagl 1974; Nagl 1981). An dieser Stelle sollen nur die Aspekte der strukturellen Charakterisierung herausgegriffen werden, die zur bisherigen Identifizierung der Polytänchromosomen beigetragen haben.

1.4.2.1 Beschreibung der Morphologie

Bereits die erste Beschreibung der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* zeigte, daß die elf Chromosomenpaare einen ähnlichen Grundaufbau haben (Nagl 1962b). Alle elf besitzen in der Regel im medianen Abschnitt einen Bereich aus Heterochromatin, dem die beiden mehr oder weniger verschieden langen Arme aus Euchromatin anliegen. Innerhalb des heterochromatischen Bereiches wird die Spindelansatzstelle (Centromer) angenommen, die manchmal als Lücke sichtbar ist. Im Euchromatin der Arme wurden in unterschiedlicher Entfernung vom Centromer zusätzlich lockere heterochromatische Zonen beobachtet, die als „Querscheiben" bezeichnet wurden. Anhand des Verteilungsmusters von eu- und heterochromatischen Zonen sowie den „Querscheiben" ließen sich zunächst vier der elf Chromosomenpaare (Typ A bis D) individuell ansprechen (Nagl 1962b).

Kurze Zeit später wurden zwei Chromosomen S_1 und S_2 identifiziert, die mit dem Nukleolus bzw. den Nukleolen in Verbindung stehen (Nagl 1965). Nach Nagl wiesen diese beiden SAT-Chromosomen je einen „Endosatelliten" auf, der über fadenartige Chromatinstränge, die sich durch die Nukleolus-organisierende Region (NOR) ziehen, mit dem Chromosom verbunden ist. Ferner fiel bei diesen Untersuchungen auf, daß die Querscheiben weniger deutlich ausgeprägt waren als bei vorangegangenen Beobachtungen. Dies wurde als Veränderung des Chromosomenbaus in Präparaten aus verschiedenen Jahren gedeutet (vgl. Hasitschka-Jenschke 1961).

Weitere Untersuchungen zeigten, daß sich alle elf Chromosomenpaare anhand ihrer verschiedenen Längen, Armlängenverhältnisse und Verteilung der heterochromatischen Abschnitte mehr oder weniger sicher identifizieren ließen (Nagl 1967). Nagl (1967) stellte ein vorläufiges Idiogramm aller Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* vor und benannte die Chromosomen mit den römischen Ziffern I bis XI. Gleichzeitig wurde aber auch darauf hingewiesen, daß sowohl die Längen als auch das Heterochromatinmuster einer gewissen Variabilität unterliegen. Diese behindert die regelmäßige Identifizierung und führt dazu, daß sich nicht alle Chromosomen mit der gleichen Sicherheit ansprechen lassen. Insbesondere durch die Streckung der Chromosomen kann ein ursprünglich kürzerer Arm zum längeren werden. Der Vergleich mit mitotischen Metaphasechromosomen zeigte ferner, daß das kleinste und das größte Polytänchromosom (I, XI) jeweils etwa 30 mal länger sind ist das entsprechende Metaphasechromosom (s. Abschnitt 1.5). Dieser Wert wurde auch mit dem Verlängerungsfaktor von Pachytänchromosomen gegenüber mitotischen Metaphasechromosomen verglichen. Aus den Messungen von Krishan und De (1965) bei *Phaseolus aureus* wurde für Pachytänchromosomen ein Verlängerungsfaktor von 21 berechnet, der deutlich unter dem Faktor 30 der Polytänchromosomen liegt (Nagl 1967).

An Polytänchromosomen der nahe verwandten Art *P. vulgaris* wurde festgestellt, daß sich durch zweiwöchiges Absenken der Anzuchttemperatur eine reversible Bildung von Querscheiben/-banden induzieren ließ. Doch obwohl sich, je nach Länge der Chromosomen, zwischen 40 bis 160 Querbanden beobachten ließen (Nagl 1969a), wurde dieses Muster von Querscheiben nicht zur weiteren Identifizierung herangezogen.

1.4.2.2 Markierungen und Bänderung

Zu Beginn der 80er Jahre wurden Markierungsmethoden, Bänderungsmethoden und die Technik der *in situ*-Hybridisierung (s. Abschnitt 1.4.2.3) entwickelt, von denen die meisten bis heute eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von Chromosomen spielen.

Die ersten und umfangreichen Markierungen an Polytänchromosomen von *Phaseolus* mit verschiedenen radioaktiv markierten Nukleinsäuren und Aminosäuren sowie unterschiedliche cytochemische Färbungen wurden von Avanzi et al. (1970) durchgeführt. Sie leistete aber zur strukturellen Charakterisierung im Sinne einer individuellen Identifizierung der Chromosomen keinen maßgeblichen Beitrag.

Größere Relevanz hatten die Versuche, Guanin-reiche Abschnitte auf den beiden SAT-Chromosomen von *P. coccineus* mittels radioaktiv-markiertem Actinomycin D (AMD) nachzuweisen (Cionini und Avanzi 1972). Die Markierung an den beiden SAT-Chromosomen I und V zeigte sich am stärksten im Nukleolusbereich sowie auf den heterochromatischen Bereichen am Centromer. Überraschenderweise blieben jedoch einzelne Abschnitte des Heterochromatins unmarkiert und umgekehrt zeigten manche euchromatische Bereiche bereits nach kurzer Zeit eine deutliche Markierung. Später folgten weitere Versuche zur Untersuchung der DNA-Methylierung, die deutlich machten, daß das centromerische Heterochromatin der am stärkste methylierte Bereich der Polytänchromosomen ist (Frediani et al. 1986; Andreucci et al. 1994). Brady und Clutter (1974) wiesen bei ihren Untersuchungen zur Strukturveränderung der Polytänchromosomen während des Replikationszyklus darauf hin, daß die sog. β-heterochromatischen Bereiche (die heterochromatischen Bereiche um das Centromer) im aufgelockerten Zustand der Replikation nicht vom Euchromatin zu unterscheiden seien. Das Heterochromatin des Centromers wurde im übrigen von den Autoren, in Anlehnung an die Polytänchromosomen der Dipteren, als α-Heterochromatin angesprochen. Diese Art der Bezeichnung hat sich aber nicht durchgesetzt.

Chromosomen-Bänderungs-Methoden beruhen im Prinzip darauf, daß sich einige Abschnitte von Chromosomen (evtl. nach geeigneter Vorbehandlung) stärker anfärben lassen als andere. Daraus ergibt sich ein Muster, anhand dessen sich die Chromosomen unter Umständen individuell erkennen lassen. Allgemeine Verwendung in der Cytogenetik finden vor allem das „C-Banding" (Arrighi und Hsu 1971) und „G-Banding" (Schnedl 1971; Sumner et al. 1971) sowie Fluorochrome mit gewisser Bindungspräferenz zu AT- oder GC-reichen Sequenzen: Hoechst 33258 (AT) (Hilwig und Gropp 1972) und DAPI (AT) (Dann et al. 1971), Quinacrin-dihydrochlorid bzw. -Mustard (Caspersson et al. 1969) und Chromomycin A_3 (GC) (Schweizer 1976c; Schweizer 1976a).

Um auf den Polytänchromosomen von *P. coccineus* und *P. vulgaris* ein differentielles Bänderungsmuster zu erzeugen, nutzte Schweizer (1976b) die C-Bänderung und die Fluorochrome Chromomycin A_3 (CMA) bzw. DAPI in Kombination mit Actinomycin D (AMD). Die gleichen Färbungen führte er auch an Metaphasechromosomen durch und verglich die Bänderungsmuster mit denen der Polytänchromosomen. Die C-Bandenmuster der beiden Chromosomen-Typen stimmten im wesentlichen überein, wiesen aber bei den Polytänchromosomen aufgrund ihrer Größe eine bessere Auflösung auf. Insbesondere zeigten sich im Centromerbereich der Polytänchromosomen mehrere Blöcke oder Scheiben, wohingegen bei den Metaphasechromosomen am Centromer nur eine einzige Bande beobachtet werden konnte. Die Färbung mit CMA und DAPI/AMD zeigte zwei unterschiedliche Typen von Heterochromatin bei den Polytänchromosomen. Der eine Typus färbte sich stark mit CMA aber nur schwach mit DAPI/AMD an, während sich der andere umgekehrt dazu verhielt. Außerdem fiel auf, daß sich die SAT-Chromosomen aufgrund ihrer Variablität nicht eindeutig identifizieren ließen und auch nicht mit ihren entsprechenden Metaphasechromosomen in Einklang zu bringen waren.

Aufgrund der zwei Paare von SAT-Chromosomen bei *P. coccineus* (Nagl 1965) ging man von vier Nukleolus-organisierenden (NO) Chromosomen aus, obwohl es Hinweise gab, daß ihre tatsächliche Anzahl höher liegt (Nagl 1965; Schweizer 1976b). Untersuchungen an Polytänchromosomen und Metaphasechromosomen mit Silberfärbung und Giemsa-C-Bänderung zeigten schließlich, daß *P. coccineus* tatsächlich sechs NO-Chromosomen besitzt (Schweizer und Ambros 1979), was später nochmals durch die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierungen bestätigt wurde (s. Abschnitt 1.4.2.3).

Um die Struktur der beiden NO-Chromosomenpaare I und V während der Samenentwicklung genauer zu studieren (Forino et al. 1979), wurden die Chromosomen-Abschnitte erstmalig nach einer festgelegten Nomenklatur beschrieben (Paris Conference 1972). Die Polytänchromosomen wurden danach in Regionen unterteilt, die Banden numeriert und der kurze bzw. lange Arm der Chromosomen mit den Symbolen „p" bzw. „q" gekennzeichnet. Weitere Analysen gaben

Hinweise auf eine unterschiedliche Ausprägung, selbst zwischen Homologen (Cionini et al. 1982) und verschiedenen Polytänchromosomen (Tagliasacchi et al. 1983).

1.4.2.3 In situ*-Hybridisierungen*

Die Technik der *in situ*-Hybridisierung (ISH) wurde vor 29 Jahren etwa zeitgleich von drei Arbeitsgruppen entwickelt (Gall und Pardue 1969; John et al. 1969; Buongiorno-Nardelli und Amaldi 1970). Die ISH machte es möglich, markierte DNA- oder RNA-Sequenzen als Sonden zu verwenden und ihr Vorkommen im Genom direkt „an Ort und Stelle“ (*in situ*) auf dem Chromosom nachzuweisen. Die Auswahl an Sonden-DNA/RNA war anfangs auf Satelliten-DNA und ribosomale RNA beschränkt, die durch physikalische Trennung gewonnen werden konnten. Erst die Vervielfältigung nahezu beliebiger DNA-Fragmente durch molekularbiologische Methoden wie z. B. die Klonierung in Plasmid-Vektoren (Bolivar et al. 1977) oder die Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1985; Mullis et al. 1986) erlaubten es, auch andere DNA/RNA-Sequenzen in ausreichender Menge zu produzieren und daraus markierte Sonden herzustellen.

Lange Zeit war die Markierung der Sonden mit radioaktiven Isotopen wie z. B. ^{3}H oder ^{125}I und deren Detektion durch Autoradiographie die einzige Nachweismethode. Sie ist heute von den verschiedenen Varianten der nichtradioaktiven ISH abgelöst. Bei ihr wird in die Sonden-DNA/RNA entweder einzelne Nukleotide mit Reportermolekülen (z. B. Biotin, Digoxigenin) eingebaut („Markierung“) oder die Sonde wird als ganzes chemisch modifiziert. Die Detektion der Reportermoleküle bzw. der modifizierten Sonde erfolgt mit Antikörpern oder dem Protein Avidin (bzw. Streptavidin oder Derivaten von beiden), die jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym gekoppelt sind (indirekte Detektion). Während die Fluorochrome eine umgehende Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop ermöglichen, ist für den Nachweis mittels enzym-gekoppelter Verfahren eine zusätzliche Reaktion notwendig, um ein farbiges Präzipitat zu erhalten. Eine noch schnellere Detektion erlaubt die Verwendung von Sonden, in die bereits bei der Markierung Fluoreszenzfarbstoffe eingebaut werden (direkte Detektion). Basierend auf diesen Grundtechniken wurden zahlreiche Varianten mit unterschiedlichen Reportermolekülen, Fluorochromen, Antikörpern und Enzymen entwickelt (Übersichten bei Lichter et al. 1991; Speel et al. 1995). Die am häufigsten verwendete Variante ist die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit indirekter oder direkter Detektion (vgl. McNeil et al. 1991; Trask 1991). Mit der FISH wurden bis dato Fragestellungen auf den verschiedensten Gebieten wie z. B. numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, Kartierung von Genen und DNA-Fragmenten, Aufbau der Kernstruktur, Struktur und Evolution von Chromosomen bis hin zur DNA-Replikation und Gen-Amplifikaton untersucht (Heng et al. 1997). Dabei spielte oftmals auch die Möglichkeit mehrere Sonden gleichzeitig und in unterschiedlichen Fluorochromen (oder Mischungen von Fluorochromen) darzustellen, eine wichtige Rolle (Le Beau 1996).

Die ersten Versuche mittels FISH erlaubten allgemein nur den Nachweis von repetitiven Sequenzen wie z. B. Satelliten-DNA oder die Gene der 18S-25S und 5S RNAs (z. B. Baumann et al. 1981; Langer-Safer et al. 1982; Manuelidis et al. 1982). Die Sensitivität der indirekten Detektion wurde jedoch gesteigert, um auch kürzere und nur in wenigen Kopien vorliegende Zielsequenzen, nachweisen zu können (Viegas-Pequignot et al. 1989). Dazu wird entweder die Zahl der am Nachweis beteiligten Fluorochrom-Moleküle direkt im Präparat vervielfältigt und/oder die schwachen Fluoreszenzsignale mittels hochempfindlicher CCD-Kameras aufgenommen (Ballard und Ward 1993; Ferguson et al. 1996).

Um die Zahl der Fluorochrom-Moleküle im Präparat zu erhöhen (Signalamplifikation) gibt es, je nach Reportermolekül das zum Markieren der Sonde verwendet wurde, im wesentlichen zwei gängige Methoden: Sonden, die mit Biotin markiert und über Fluorochrom-gekoppeltes Avidin detektiert werden, inkubiert man anschließend mit einem Anti-(Strept)Avidin-Antikörper der mit Biotin konjugiert ist. Im nächsten Schritt inkubiert man mit Fluorochrom-gekoppeltem Avidin (Pinkel et al. 1986). Sonden, die mit anderen Reportermolekülen wie z. B. Digoxigenin (DIG) markiert wurden, inkubiert man mehrfach mit einem anderen, jeweils passenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, so daß eine Kaskade entsteht. Auf weitere Detektionsmöglichkeiten mittels enzymatischer Umsetzung von Fluorochrom- bzw. Reportermolekül-konjugierten Substraten (Raap et al. 1995; Kagiyama et al. 1995; Paragas et al. 1997) oder Chemilumineszenz (Musiani et al. 1998) soll hier nicht eingegangen werden.

Die Anwendung der ISH an Chromosomen von Pflanzen stand hinter der an Chromosomen von Tieren zurück (Übersichten bei: Jiang und Gill 1994; Lavania 1998). Die erste nichtradioaktive ISH wurde erst im Jahr 1985, drei Jahre nach den Untersuchungen an Polytänchromosomen von *Drosophila* und Metaphasechromosomen von Mäusen veröffentlicht (Rayburn und Gill 1985). Der Hauptgrund ist, daß die Anforderungen, die an die Präparate für nichtradioaktive ISH gestellt werden müßen, für Chromosomenpräparate aus pflanzlichen Zellen nur unter erheblichem Aufwand und mit viel Erfahrung zu erfüllen sind (Hinnisdaels et al. 1994). Die Bedingungen sind viele nicht überlappend liegende Chromosomen, die weder von der Zellwand überdeckt sind, noch auf Resten von Cyto-, oder wie hier bei Polytänchromosomen, Nukleoplasma liegen.
Wie bei der ISH an tierischen Chromosomen, so ist auch die Detektion von *low-copy* Sequenzen bei pflanzlichen Chromosomen sehr schwierig. Bei allen bisherigen Berichten über den Nachweis von Sequenzen in geringer Kopienzahl oder gar einmaligen Sequenzen betrug die Länge der Zielsequenz immer mehr als 10 kbp (siehe Ausführungen bei Jiang und Gill 1994). Wie bei den Untersuchungen an tierischen Chromosomen hat sich auch bei der Anwendung an pflanzlichen Chromosomen die FISH mit all ihren Varianten (GISH, Multicolor-FISH, Interphase FISH) als eine Standardmethode bei der Genom-Kartierung durchgesetzt (Jiang und Gill 1996).

An den Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* wurde die erste ISH mit ^{3}H-markierter ribosomaler 18S-5,8S-25S RNA als Sonde durchgeführt (Avanzi et al. 1972; Brady und Clutter 1972). Brady und Clutter beobachteten Signale nur auf den beiden SAT-Chromosomenpaaren I und V. Avanzi et al. hingegen fanden Signale auf insgesamt drei Paaren: I, V und zusätzlich II. Eine Anzahl von drei Chromosomen mit Loci der 18S-25S rDNA konnte auch von anderen Autoren unter Verwendung von radioaktiver ISH sowie FISH bestätigt werden (Schumann et al. 1990; Tagliasacchi et al. 1993; Nenno et al. 1994). Desweiteren wurde die Verteilung der Gene für die ribosomale 5S RNA untersucht, und ihre Position auf den Chromosomen I und VI bestimmt (Durante et al. 1977).

Durante et al. (1987) untersuchten an Polytänchromosomen die Verteilung von zwei hochrepetitiven DNA-Fraktionen, die durch isopyknische Zentrifugation gewonnen wurden. Eine Fraktion bestand aus *fast renaturating sequences* (FRS), die 20,8% der gesamten DNA ausmachten und die zweite Fraktion aus Satelliten-DNA mit der Dichte 1,702 g/ml. Um Mißverständnissen vorzubeugen sei darauf hingewiesen, daß der Ausdruck „Satelliten-DNA“ nichts mit dem „Satelliten“ eines Chromosoms zu tun hat (vgl. Rieger et al. 1991). Die stärksten Signale beider Fraktionen lagen präferentiell in den heterochromatischen Bereichen um das Centromer. Zusätzlich waren sie im interkalaren Heterochromatin sowie an den Enden mancher Chromosomen lokalisiert. Die Signalintensität in den heterochromatischen Regionen war dabei variabel. Auffallend war, daß der mediane Bereich von Chromosom II, der im Idiogramm von 1967 als heterochromatisch beschrieben worden war, weder Signale mit den FRS noch mit der Satelliten-DNA aufwies. Die Autoren machten darauf aufmerksam, daß eben dieser Bereich, wie auch die interkalaren Heterochromatinbereiche auf den anderen Chromosomen, eher dekondensiert erscheint und daher mehr den Eindruck von Eu- als von Heterochromatin macht.

Als erste *low-copy* Sequenzen bei *P. coccineus* konnten die Gene des Hauptspeicherproteins Phaseolin mittels radioaktiver ISH auf Chromosom 3 lokalisiert werden (Schumann et al. 1990). Bald darauf folgte der Nachweis von *low-copy* Genen des Polygalacturonase-hemmenden Proteins (PGIP) bei *P. vulgaris* auf Chromosom X (Frediani et al. 1993). Nach Frediani entspricht das Idiogramm der Polytänchromosomen von *P. vulgaris* dem von *P. coccineus*.

In der ersten FISH an Polytänchromosomen von *P. coccineus* wurde eine humane Telomer-Sequenz als Sonde eingesetzt, die die Enden der Polytänchromosomen markierte (Nagl 1991). Versuche mit anderen repetitiven Sequenzen, wie z. B. der 18S-25S rDNA, zeigten aber nur vergleichsweise schwache Fluoreszenzsignale. Erst mit der Einführung der Pepsin/HCl-Vorbehandlung für die Präparate der Polytänchromosomen ließ sich die Signalintensität der 18S-25S rDNA-Signale steigern und die Loci auf den drei NO-Chromosomen nachweisen (Nenno et al. 1994). Darüber hinaus ermöglichte die Vorbehandlung mit der Pepsin/HCl erstmals auch die nichtradioaktive Detektion der *low-copy* Gene von Phaseolin mittels FISH, die zuvor nur mittels radioaktiver ISH nachgewiesen werden konnten.

1.5 Mini- und Mikrosatelliten als DNA-Sonden

Das Genom von *P. coccineus* besteht zu 65% aus repetitiver DNA (Nagl et al. 1983). Allgemein unterteilt man die Familie der repetitiven DNA in kodierende und nicht-kodierende Sequenzen. Als Beispiele für kodierende repetitive DNA seien die Gene für ribosomale RNA, Transfer-RNA und Histone genannt (Kahl 1995). Nicht-kodierende repetitive DNA gliedert man entsprechend ihrer Verteilung im Genom in zwei Gruppen, die dispers verteilten bzw. die tandemartig angeordneten repetitiven Sequenzen (Charlesworth et al. 1994). Letztere Gruppe wurde wiederum anhand der Länge ihrer Wiederholungseinheiten (Motive oder *repeats*) in drei Klassen eingeteilt: Satelliten-DNA (mindestens ca. 300 bp), Minisatelliten (9-100 bp) und Mikrosatelliten oder *simple sequences* (1-6 bp) (Tautz 1993).

Die bekannteste praktische Anwendung von Mini- und Mikrosatelliten-Sonden ist das DNA-Fingerprinting (Jeffreys et al. 1985). Jeffreys verwendete klonierte Sequenzen (33.15 und 33.6) als Fingerprint-Sonden beim Menschen. Doch bereits kurze Zeit später wurden synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von 15-16 Nukleotiden als Sonden eingesetzt (Ali et al. 1986), die auch für das DNA-Fingerprinting an Pflanzen Verwendung finden (Übersicht bei Weising et al. 1995). Der Vorteil von synthetischen Oligonukleotiden als DNA-Sonde ist, daß sie sich in großen Mengen und hochgereinigt herstellen lassen und damit die Klonierung zur Herstellung der Sonde entfällt (Ali und Epplen 1991). Bei *Phaseolus* wurden synthetische Oligonukleotid-Sonden aus Mikrosatelliten-Motiven (z. B. $(GATA)_4$) erfolgreich beim nichtradioaktiven DNA-Fingerprinting eingesetzt (Hamann et al. 1995).

Mini- und Mikrosatelliten eignen sich auch als Sonden für die ISH, da sie an mehreren Stellen im Genom jeweils mit etwa 10^3 bis 10^7 Kopien vorkommen können. Damit liegt die Gesamtlänge pro Locus erheblich über 10 kbp, also in ausreichender Zahl, um ein nachweisbares Signal zu erzeugen. Außerdem erlaubt die Kürze der synthetischen Oligonukleotid-Sonden eine gute Penetration des Chromatins, welche für den Nachweis von Zielsequenzen in dicht gepacktem Heterochromatin von Vorteil sein kann. Dies ist für Metaphasechromosomen von Pflanzen von besonderer Bedeutung, da ihr Chromatin 3,5 bis 6,5 mal dichter gepackt ist als das von menschlichen Chromosomen (s. Ausführungen bei Schweizer et al. 1990).

Die ersten Oligonukleotide, die als Sonden für Mikrosatelliten bei der nichtradioaktiven ISH eingesetzt wurden, waren $(CAC)_5$, $(TCC)_5$, $(GATA)_4$, $(GACA)_4$. Deren Verteilung wurde auf Metaphasechromosomen von Mensch, anderen Primaten, dem Huhn und der Maus untersucht (Zischler et al. 1989; Nanda et al. 1991). Die Mikrosatelliten-Motive wurden an verschiedenen Stellen, wie z. B. dem Heterochromatin von Sex-Chromosomen [(GATA/GACA bei der Maus;

$(TCC)_5$ beim Huhn] bzw. im Bereich der NOR [$(GACA)_4$ bei Primaten] nachgewiesen, oder sie führten zu einem R-Bandenmuster [$(CAC)_5$ beim Menschen]. Über den Einsatz spezifischer Oligonukleotid-Sonden von Minisatelliten für die FISH gibt es nur wenige Berichte (z. B. Kipling et al. 1994). Untersuchungen über das Vorkommen von Mikrosatelliten-Motiven an Polytänchromosomen von *Drosophila melanogaster* wurden ausschließlich mittels radioaktiv markierten Oligomeren (100-200 bp) durchgeführt (Pardue et al. 1987; Lowenhaupt et al. 1989). Nur drei der sechs untersuchten Mikrosatelliten ließen sich nachweisen. Die Motive CA/TG, CT/AG und C/G waren ungleichmäßig über die euchromatischen Bereichen verteilt und besonders gehäuft auf dem X-Chromosom. Im Bereich des β-Heterochromatins im Chromozentrum waren sie hingegen unterrepräsentiert. Das Verteilungsmuster ist sowohl zwischen entfernt verwandten Arten als auch zwischen den verschiedenen Stämmen derselben Art konserviert. Lohe et al. (1993) kartierten klonierte Mikrosatelliten-Sequenzen mit Motivlängen von 5-10 bp im Heterochromatin von Metaphasechromosomen von *Drosophila melanogaster*.

Bei Pflanzen wurden Mikrosatelliten-Motive bei der ISH sowohl zur Untersuchung ihrer generellen chromosomalen Verteilung (Schmidt und Heslop-Harrison 1996), als auch zur Identifizierung einzelner Chromosomen eingesetzt (Pedersen und Linde-Laursen 1994; Pedersen und Langridge 1997). Einen Sonderfall stellt der sog. „GAA-Satellit“ dar, der sich wiederum aus verschiedenen Mikrosatelliten-Motiven (GAA, GAG, GCA und GGA) zusammensetzt (Pedersen et al. 1996). Beispiele für ISH an pflanzlichen Chromosomen, bei denen synthetische Oligonukleotide als Sonden für Minisatelliten eingesetzt wurden, ließen sich in der bisherigen Literatur nicht finden. Allerdings gelang es die sieben Chromosomen von *Hordeum vulgare* anhand des Hybridisierungsmusters einer artspezifischen repetitiven DNA (Flavell et al. 1981) eindeutig zu identifizieren (Busch et al. 1995).

1.6 Ziel der Arbeit

Die Struktur der elf Paare von Polytänchromosomen aus dem Suspensor von *Phaseolus coccineus* stand seit ihrer Entdeckung bereits in zahlreichen Untersuchungen im Vordergrund. Ein wichtiger Schritt war dabei die Erstellung eines vorläufigen Idiogramms (Nagl 1967), das den Grundstein für viele cytogenetische Arbeiten zur Struktur dieser Chromosomen legte. Die Variabilität in der Ausprägung der chromosomenspezifischen Merkmale (Verteilungsmuster von Eu-, Heterochromatin und „Querscheiben“, sowie die Chromosomenlänge) behinderte allerdings weitgehend eine eindeutige Identifizierung einzelner Polytänchromosomen oder ließ zumindest Zweifel an ihrer Richtigkeit aufkommen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, einen anderen Weg bei der Charakterisierung der Polytänchromosomen einzuschlagen, der eine verläßlichere Identifizierung jedes einzelnen Chromosoms ermöglichen sollte. Das centromerische Heterochromatin erschien dafür als Merkmal besonders geeignet. Es tritt einerseits vergleichsweise konstant auf, und einzelne Markierungs- und Bänderungsergebnisse gaben Hinweise darauf, daß dieser Bereich eine differentielle, möglicherweise chromosomenspezifische Strukturierung besitzt. Zudem sollte die Charakterisierung der Polytänchromosomen auch eine Identifizierung an Präparaten ermöglichen, die für die FISH verwendet wurden, um Loci von Genen und anderen DNA-Sequenzen kartieren zu können. Als erste sollten die Loci der Gene der ribosomalen 18S-5,8S-25S RNA und des Hauptspeicherproteins Phaseolin neu bestimmt und in eine cytogenetische Karte eingetragen werden.

Erstmals sollte im Rahmen dieser Arbeit das Vorkommen von Mikro- und Minisatelliten auf Chromosomen von *Phaseolus* durch FISH untersucht werden. Dabei sollte ihrer Verteilung in Eu- und Heterochromatin analysiert und ihre Loci kartiert werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich die Polytänchromosomen alternativ zur morphologischen Klassifizierung anhand des Hybridisierungsmusters eines Mikrosatelliten-Motivs oder eines Minisatelliten identifizieren lassen.

Die Verteilung der Telomer-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* bei Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* war noch nicht bekannt und sollte in diese Untersuchung mit einbezogen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Anzucht und Fixierung des Pflanzenmaterials

Samen von *Phaseolus coccineus*, Sorte Preisgewinner (Fa. Hild, Marbach), wurden in den Sommermonaten im Botanischen Garten der Universität Kaiserslautern ausgekeimt und daraus Pflanzen angezogen. Von diesen wurden unreife Hülsen mit einer Länge von ca. 20 cm geerntet und für 4-7 Tage bei +4°C in einem verschweißten Folienschlauch kühl gelagert. Anschließend wurden die Samen entnommen und nur solche mit einer Länge von 8-12 mm weiter verwendet. Die Kotyledonen dieser Samen füllten ca. 50-75% des Embryosackes aus, was dem frühen bis mittleren Entwicklungsstadium entspricht (Voß 1992).

Vor der Fixierung wurden die Samen mit einem Längsschnitt im unteren Drittel geöffnet, um das Eindringen des Fixiergemisches (Ethanol:Eisessig, 3:1 v/v) zu beschleunigen. Nach den ersten 24 h bei +4°C wurde das Fixiergemisch gewechselt, und die Samen verblieben eine weitere Woche bei +4°C im Fixans. Nach mehrmaligen Spülen mit 96% Ethanol (zum Auswaschen der Essigsäure) wurden die Samen in 70% Ethanol bei -20°C gelagert. Material mit einem Alter von bis zu 12 Monaten war für die Präparationen geeignet. Länger gelagertes Samenmaterial sprach auf die anschließenden Behandlungen schlechter an (z. B. blieb das Nukleoplasma stark strukturiert und dunkel) und zeigte bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) kaum noch Signale.

2.2 Chromosomenpräparation

Die etablierte Methode zur Präparation der Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor von *Phaseolus coccineus* (Schumann et al. 1990; Nenno 1992; Nenno et al. 1994; Nagl 1996) wurde in einigen Details weiterentwickelt, um die Chromosomen besser zu spreiten.
Dazu war es notwendig, jeden einzelnen Zellkern, vor dem Spreiten der Chromosomen aus der Zelle, freizulegen und einer zusätzlichen Mazeration in Essigsäure zu unterziehen. Ferner wurde der erste Wässerungsschritt des fixierten Materials sowie alle anschließenden zeitlich deutlich ausgedehnt.
Die Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin erfolgte nach der Methode von Huang et al. (1983).

Material, Chemikalien und Lösungen

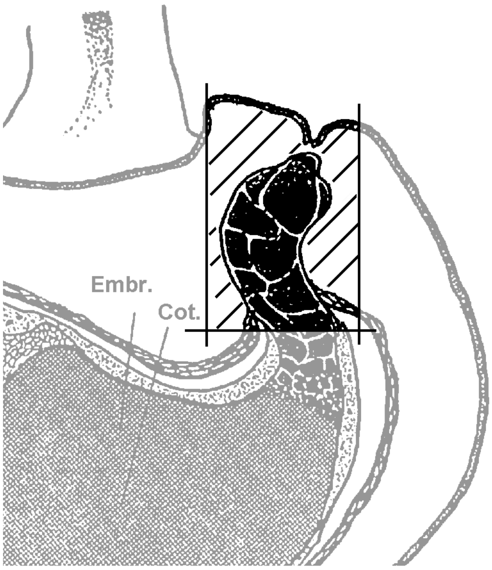
Kälteplatte (FTS Systems)
Stereomikroskop mit Durchlicht, 0,8-6,4fach, STEMI SV8 (Zeiss) und Phasenkontrast-Mikroskop (Zeiss)
MES (2[N-Morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma, M-3023)
Poly-L-Lysin(M_w 300.000, Sigma, P-1524)-Lösung, 1 mg/ml in Aqua dest.
Sucrose (SERVA, 35580)
Pektinase (Fluka, 76290)
Propionsäure, 99.5%

Milchsäure, DL-Lactic acid (Serva)
MES-Sucrose-Puffer: 25 mM MES mit 6% (w/v) Sucrose, pH 5,5
Pektinase-Gemisch: 10% (w/v) Pektinase in MES-Sucrose-Puffer

Durchführung

Vorbereitung

- um 6-8 Präparate herzustellen, werden die Suspensoren von ca. 60-80 Samen benötigt
- fixierte und bei -20°C aufbewahrte Samen in 70% Ethanol (RT) überführen und auf RT bringen
- Ethanol durch mehrmaliges Mischen der Lösung mit Aqua dest. im Verhältnis 50:50 auswaschen, bis die Samen beim Schütteln keine Schlieren mehr ziehen und sich am Boden absetzen
- unter dem Stereomikroskop die Samenschale mit einem Oberflächenschnitt von der Mitte des Samens in Richtung Mikropyle bis zur äußeren Samenschale hin öffnen
- den Embryosuspensor mit möglichst wenig umliegendem Gewebe - im folgenden als „Gewebestück“ bezeichnet - herauspräparieren (siehe Abbildung)



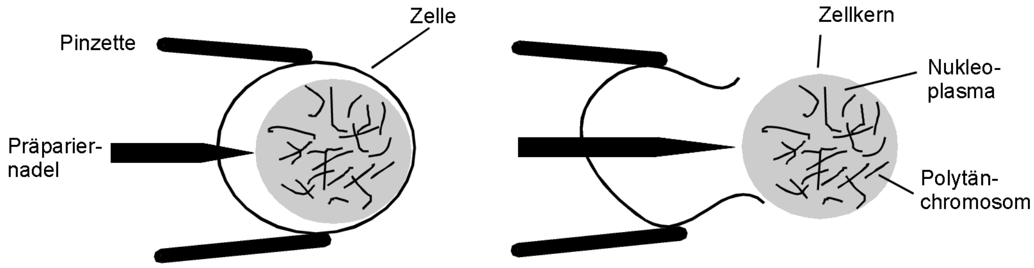
- Gewebestücke sammeln, 2 mal in Aqua dest. spülen und über Nacht bei +4°C aufbewahren

Enzymatische Mazeration

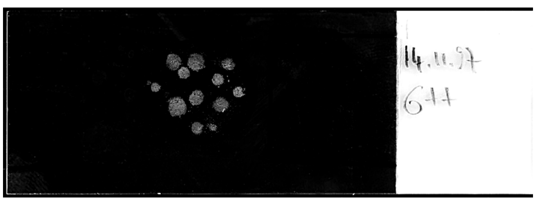
- aus den Gewebestücken letzte Reste von Ethanol mit Aqua dest. herausspülen
- enzymatische Mazeration der Gewebestücke in 20 ml 10% Pektinase-Lösung für 3 h bei 37°C in einem Inkubationsschüttler bei 120 rpm
- nach dreimaligem Waschen in Aqua dest. die Gewebestücke für 3 h in 10 ml Propionsäure-Milchsäure-Gemisch (1:1) bei RT nachfixieren
- Fixiergemisch durch mehrmaliges Ersetzen von jeweils der Hälfte der Lösung durch Aqua dest. auswaschen, bis die Gewebestücke beim Schütteln keine Schlieren mehr ziehen
- Gewebestücke für weitere 24 h bei +4°C aufbewahren

Chromosomenpräparation

- mehrere Gewebestücke in einen großen Tropfen 45% Essigsäure auf einen Hohlschliff-OT überführen und die Suspensorzellen vereinzeln
- nur die größten Suspensorzellen mit sehr klarem Cyto- und Nukleoplasma und nicht zu stark kondensierten Chromosomen aussortieren
- 10-20 Zellen mit einer 20 µl-Pipette (mit abgeschnittener Spitze) in einem Tropfen 45% Essigsäure auf einen weiteren Hohlschliff-OT überführen
- *Jede einzelne* Zelle zunächst durch behutsames Drücken mit Präpariernadel und Pinzette öffnen, wobei ihr Inhalt langsam herausquillt. Durch erneutes *vorsichtiges* Drücken den Inhalt von der Zellwand befreien (Abbildung unten). Nach der Größe des Bereiches zu schließen, den die Chromosomen in dem herausgequetschten Zellinhalt ausmachen, besteht er zum überwiegenden Teil aus dem Zellkern.



- Zellkern, auf einen weiteren Hohlschliff-OT in einen großen Tropfen 45% Essigsäure übertragen und weitere (ca. 12) solcher Zellkerne darin sammeln
- Die Kerne 15 bis 20 min in der Essigsäure mazerieren, um das viskose und gallertartige Nukleoplasma etwas aufzulösen bzw. flüssiger zu machen
- die Kerne auf einen Poly-Lysin-beschichteten OT übertragen, ein DG aufgelegen und mit einem Stück Filterpapier abdecken
- die Zellkerne mit der Rückseite einer Präpariernadel durch leichtes Klopfen leicht quetschen, was zu einer Vereinzelung der Chromosomen führt
- Qualität der Präparation im Phasenkontrast (40x) kontrollieren
- das Präparat auf einer Kälteplatte bei -70°C einfrieren und das DG anschließend mit einer Rasierklinge gemäß der Trockeneis-Methode nach Conger und Fairchild (1953) „absprengen“
- Präparate in 99% Ethanol entwässern und über Nacht an der Luft trocknen
  Die Abbildung zeigt einen OT vor schwarzem Hintergrund, auf dem 12 gequetschte „Zellkerne“ zu erkennen sind



- Präparate sollen vor dem weiteren Gebrauch mindestens 3 bis 4 Tage bei RT lagern

2.3 Vorbehandlung

Für die FISH mit DNA-Sonden können sich zwei Bestandteile in den Chromosomenpräparaten als störend erweisen. Dies sind zum einen die verschiedenen Bestandteile des Nukleoplasmas (z. B. Proteine), die die Chromosomen überlagern und ebenso wie chromosomale Proteine die die ISH und nichtradioaktive Detektion erschweren können (Nenno et al. 1994). Zum anderen können auch Reste von RNA im Präparat hinderlich sein, weil die Sonden potentiell auch mit ihnen hybridisieren können und sie damit eine Quelle von falschpositiven Signalen darstellen.
Die Chromosomenpäparate wurden daher mit der Protease Pepsin oder alternativ mit Proteinase K sowie mit RNase A vorbehandelt, um die störenden Bestandteile zu entfernen (Dr. H. Scherthan, persönliche Mitteilung). Die hier angewendeten Protease- und RNase-Vorbehandlung basiert auf dem Protokoll von Nenno (1992).

Material, Chemikalien und Lösungen

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na_3-Citrat*$2H_20$, pH 7,0
PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,4 mM KH_2PO_4, pH 7,3
Proteinase K-Inkubationspuffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM $CaCl_2$
Proteinase K-Gebrauchslösung: 100 µg/ml in Proteinase K-Inkubationspuffer
Proteinase K-Stoppuffer : 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM $CaCl_2$, 50 mM $MgCl_2$
Pepsin porcine, 17 milliAnson U/mg, 2 x cryst. lyophil (Serva)
Pepsin/HCl-Lösung: 1 mg Pepsin/ml in 0,05 M HCl
Proteinase K, lyophilisiert (Boehringer Mannheim, 745 723)
RNase-Lösung: 100 µg/ml RNase A, DNase-frei in 1 x SSC

Abbau der Proteine

Pepsin/HCl

Die Vorbehandlung mit Pepsin/HCl wurde wie von Nenno (1992) und Nenno et al. (1994) beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der HCl-Lösung wurde jedoch von 0,01 M auf 0,05 M erhöht um die Nukleoplasmabestandteile noch stärker abzubauen.

Durchführung

- Präparate für 4,5 h in einer Küvette mit Pepsin/HCl-Lösung bei 37°C inkubieren
- OT kurz in 0,05 M HCl-Lösung und zweimal in 2 x SSC bei RT spülen

Proteinase K (alternative zu Pepsin)

Gegenüber dem Protokoll von Nenno (1992) wurde die Konzentration der Proteinase K von 1 mg/ml auf 100 µg/ml reduziert, um die Morphologie der Chromosomen nicht zu stark zu beeinträchtigen.

Durchführung

- frische Proteinase K-Gebrauchslösung herstellen
- OT 2 mal 5 min in Proteinase K-Inkubationspuffer bei RT spülen

- 100µl/OT Proteinase-Gebrauchslösung auftropfen, DG auflegen und 15-30 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren
- OT 3 mal 5 min in Proteinase K-Stoppuffer bei RT spülen
- Präparate ca. 3 min in 2 x SSC spülen und direkt anschließend denaturieren, ansonsten nach dem Spülen über aufsteigende Ethanolreihe entwässern und lufttrocknen

Abbau der RNA

Durchführung

- pro OT 30 µl DNase-freie RNase-Lösung auftropfen und DG auflegen
- Präparate 45 min in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren
- Präparate 30 min in PBS bei 60°C waschen
- OT in PBS bei RT 10 min abkühlen lassen

2.4 Fluorochrom-Bänderung

Für die DAPI-Bänderung wurden die Polytänchromosomen 10 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Um eine farbliche Differenzierung in Form einer blau-rosa-weißen Bänderung zu erhalten, wurden die Präparate mit einem Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid (DAPI/PI) gefärbt. Als Ausgangsmaterial dienten dazu vorbehandelte Präparate (s.o.), die älter als 24 Stunden waren oder Präparate nach der FISH. Die Dokumentation der DAPI/PI-Bänderung erfolgte konventionell auf fotografischem Wege wie im Abschnitt 2.7 beschrieben.

Chemikalien und Lösungen

DABCO: Diazabicyclo[2.2.2]octan (Sigma)
DAPI-Stammlösung: 0,2 mg/ ml 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol·2HCl·H_20 (Serva) in Aqua dest.
Propidiumiodid-Stammlösung: 1 mg/ml Propidiumiodid in Aqua dest.
Färbelösung: 20 µl DAPI-Stammlsg. und 20 µl PI-Stammlösung in 60 ml PBS
PBS: 0,13 M NaCl, 0,007 M NaH_2PO_4, 0,03 M Na_2HPO_4, pH 7,4
Einbettmedien entweder: a) Vectashield (Serva) oder b) 1 Teil Tris-HCl pH 7,4 und 9 Teile Glycerin mit 2,3% (w/v) DABCO und 0,02% NaN_3

Durchführung der DAPI/PI Bänderung

- frische Färbelösung herstellen und vor Licht geschützt aufbewahren
- Präparate mindestens über Nacht in 60 ml Färbelösung an einen dunkeln Ort bei RT stellen
- OT kurz in PBS abspülen und abtropfen lassen
- Präparate in jeweils 10 µl Einbettmedium einschließen und mindestens 30 min im Dunkeln liegen lassen bevor sie im Fluoreszenzmikroskop bei UV-Anregung (auch bei DAPI/PI) untersucht werden

2.5 DNA-Sonden

Hybridisierungen wurden sowohl mit Sonden von klonierten DNA-Sequenzen für kodierende Gene als auch mit synthetischen Oligonukleotiden für verschiedene Mikrosatelliten, auch „simple sequence repeats“ oder „SSRs“ genannt, durchgeführt.

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Antikörper, Enzyme, gekoppelte Nukleotide, Kontroll-DNA und Kits von der Firma Boehringer Mannheim bezogen.

2.5.1 Sonden aus klonierten DNA Sequenzen

Als DNA-Sonden für die Gene der ribosomalen 18S, 5,8S und 25S (18S-25S) sowie 5S RNA und die Phaseolin-Gene wurden klonierte Sequenzen aus Plasmid-Klonen eingesetzt (Tabelle 2). Die Klone zur Sondenherstellung wurden von folgenden Personen dankenswerterweise zur Verfügung gestellt: *pTa250*: Prof. Dr. N. Blin (Universität des Saarlandes, Homburg), *pTa794*: Dott. I. Galasso (Istituto del Germoplasma, Bari, Italien) und *AG-pPvPh3.0*: Prof. J.L. Slightom (Michigan, USA).

Tabelle 2: Liste der verwendeten klonierten Sequenzen und Plasmid-Klone

	Klon			**Referenz**
Klonierte Sequenz	Name	Klon-Länge	Insert-Länge	
18S-25S rDNA	pTa250	12,9 kb	8,8 kbp	Gerlach und Bedbrook (1979)
5S rDNA	pTa794	4,8 kb	0,4 kbp	Gerlach und Dyer (1980)
Phaseolin	AG-pPvPh3.0	7,3 kb	1,8 kbp	Hall et al. (1983)

2.5.1.1 Sondenherstellung aus Plasmid-Klonen und Markierung

Bakterienanzucht und Plasmidisolation

Die Bakterienanzucht und Plasmidisolation zur Herstellung der Sonden für die 18S-25S rDNA und Phaseolin wurden gemäß Standardtechniken durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Dazu wurden die entsprechenden Klone zunächst unter Antibiotika-Selektion in Luria-Bertani(LB)-Medium angezogen. Anschließend erfolgte eine Lyse in NaOH/SDS in Gegenwart von RNase A (Birnboim und Doly 1979),(Birnboim 1983) um die Bakterien aufzuschließen. Sodann wurde die Plasmid-DNA über eine Silica-Säule gemäß dem „Maxi-Plasmid Purification Protocol“ des verwendeten Isolations-Kits (Qiagen) rückgewonnen und aufgereinigt.

Markierung mit Biotin bzw. Digoxigenin

Biotin-Markierung

Die Markierung der Plasmid DNA mit Biotin erfolgte nach dem Verfahren der Nick-Translation (Rigby et al. 1977) mit einem Nick-Translation-Kit. Anschließend wurde die markierte Sonden-DNA, wie unter 2.5.3 beschrieben, mit Ethanol gefällt.

Material, Chemikalien und Lösungen

Biotin-16-dUTP , 0,4 mmol/l
dTTP, dATP, dCTP, dGTP je 0,4 mmol/l (Nick Translation Kit)
10x Nick Translation Puffer (Nick Translation Kit)
Enzymmischung: DNA Polymerase I und DNase I in 50% (v/v) Glycerin (Nick Translation Kit)
EDTA, 0,2 M, pH 8,0

Durchführung

- Herstellung eines dNTP-Gemisches aus: 1 Vol. Biotin-16-dUTP, 2 Vol. dTTP, 3 Vol. dATP, 3 Vol. dCTP und 3 Vol. dGTP
- Folgende Bestandteile werden in einem Reaktiongefäß gemischt und anschließend mit sterilem, Aqua dest. auf 18 µl aufgefüllt: 0,1 - 2 µg gereinigte Plasmid-DNA, 10 µl dNTP-Gemisch und 2 µl 10x Puffer
- Dem Reaktionsansatz 2 µl Enzymmischung hinzufügen und 90 min bei 15°C inkubieren
- Markierungsreaktion stoppen durch Zugabe von 2 µl EDTA und Erwärmen auf 65°C

Digoxigenin-Markierung

Zur Markierung der Sonden mit Digoxigenin-11-dUTP wurde das DIG-High-Prime-Kit verwendet. Das dabei verwendete Verfahren der „random primed“ DNA-Markierung basiert auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984). Die Fällung der markierten Sonden-DNA erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben.

Material, Chemikalien und Lösungen

DIG-High-Prime-Gemisch (DIG-High Prime Kit)
EDTA, 0,2 M, pH 8,0

Durchführung

- 1 µg gereinigte Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit sterilem Aqua dest. auf ein Endvolumen von 16 µl auffüllen
- Plasmid-DNA durch 10 minütiges Erhitzen in einem Wasserkocher denaturieren und schnell in einem Eis/Ethanol-Gemisch abschrecken
- 4 µl DIG-High Prime zugeben, mischen und kurz zentrifugieren
- Gemisch für 20 h bei 37°C inkubieren
- Reaktion stoppen durch Zugabe von 2 µl EDTA und Erhitzen auf 65°C

2.5.1.2 Sondenherstellung und Markierung mittels PCR

Die Sonde zum Nachweis der 5S ribosomalen RNA Gene wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung des Klons pTa794 als *Template*-DNA und dem Einbau von Biotin- bzw. Digoxigenin-markierten Nukleotiden hergestellt.

Material, Chemikalien und Lösungen

PCR-Cycler (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer)
10x PCR Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 30 mM $MgCl_2$, 0,1% (w/v) Gelatine
unmarkierte Nukleotide: jeweils 2 mM dATP, dCTP, dUTP in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
Digoxigenin-11-dUTP, 1 mM
Biotin-11-dUTP, 0,4 mM (Sigma)
pBR322 Primer-1: *Bam* HI Sequenzierungs-Primer, clockwise (Promega)
pBR322 Primer-2: *Bam* HI Sequenzierungs-Primer, counterclockwise (Promega)
Taq-Polymerase: 5 U/µl
DNA: pTa794, 20 ng/µl
Mineralöl (Sigma)
0,5 ml Reaktionsgefäße für PCR
Na-Acetat
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

Durchführung

– Zusammenstellen von drei Reaktionsansätzen (Tabelle 3):

Tabelle 3: PCR-Reaktionsansätze

	unmarkierte Kontrolle [µl]	mit DIG [µl]	mit Biotin [µl]
dATP, dCTP, dUTP	-	5,0	5,0
dNTP-Mix, 2 mM	5,0	-	-
dTTP, 1 mM	-	7,5	5,0
Digoxigenin-11-dUTP, 1 mM	-	1	-
Biotin-11-dUTP, 0,4 mM	-	-	5,0
pBR322 Primer-1	2,0	2,0	2,0
pBR322 Primer-2	2,0	2,0	2,0
10x PCR-Puffer	5,0	5,0	5,0
Taq-Polymerase	0,5	0,5	0,5
Aqua dest.	33,5	23,5	23,5
Template-DNA	2,0	2,0	2,0
Gesamtvolumen	50,0	50,0	50,0

– Reaktionsansätze mischen, kurz zentrifugieren und jeweils mit 1-2 Tropfen Mineralöl überschichten

– Auf einem PCR-Cycler folgendes Programm festgelegen:

  * 5 min Denaturierung bei 93°C
  * 35 Zyklen von:
    0,5 min Denaturierung bei 94°C
    0,5 min Annealing bei 56°C
    1,5 min Elongation bei 72°C
  * 5 min bei 72°C
  * abkühlen lassen bei 4°C

– Reaktionsansätze vorsichtig unter dem Mineralöl abziehen

Fällen der DNA

– zu jeweils 45 µl Reaktionsansatz 5 µl kaltes 3 M Na-Acetat und 100 µl eiskalten abs. Ethanol geben
– zum Fällen über Nacht bei -20°C stellen
– 30 min zentrifugieren mit 13.000 x g bei +4°C
– Niederschlag zweimal mit 70% kaltem Ethanol waschen, an der Luft trocknen lassen und in jeweils 20 µl TE-Puffer lösen

2.5.2 Synthetische Oligonukleotide als DNA-Sonden

2.5.2.1 Endmarkierte Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 4) wurden von der Firma Biometra (Göttingen) synthetisiert und waren am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert. Die Basenabfolgen der in Tabelle 4 angegebenen *Core*-Konsensus-Sequenzen für die Minisatelliten M13 und das 33bp Repeat wurden den Arbeiten von Vassart et al. (1987) bzw. Jeffreys et al. (1985) entnommen. Die Telomer-Sequenz $(TTTAGGG)_5$ aus *Arabidopsis thaliana* wurde von Richards und Ausubel (1988) übernommen.

Tabelle 4: Liste der als DNA-Sonden eingesetzten synthetischen Oligonukleotide

Kategorie		synthetische Oligonukleotide
Mikrosatelliten-Motive aus		
	Mononukleotiden:	$(C)_{16}$
	Dinukleotiden:	$(AT)_8$, $(AG)_8$, $(CA)_8$, $(GC)_8$
	Trinukleotiden:	$(AAG)_5$, $(AAT)_5$, $(CAC)_5$, $(GCC)_5$
	Tetranukleotiden:	$(AATG)_4$, $(GACA)_4$, $(GATA)_4$
Minisatelliten *Core*-Konsensus-Sequenzen		
	M13con:	GAGGGTGGCGGTTCT
	33con:	GGAGGTGGGCAGGAAG
Telomer Sequenz		
	Arabidopsis thaliana:	$(TTTAGGG)_5$

2.5.2.2 Tailing von Oligonukleotiden

Die beiden Oligonukleotide $(C)_{16}$ sowie die Telomer-Sequenz $(TTTAGGG)_5$ wurden auch unmarkiert bezogen und am 3'-Ende mit Hilfe eines DIG-Oligonukleotide-Tailing-Kit (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers markiert. Die Reportermoleküle für die Markierung bestanden dabei entweder aus Digoxigenin-11-dUTP, Biotin-16-dUTP oder FITC-12-dUTP. Die Fällung der markierten Oligonukleotide erfolgte wie unter 2.5.3 ausgeführt.

Material, Chemikalien und Lösungen

Reaktions-Puffer, 5 x konz.:
1 M Kaliumkadodylat; 0,125 M Tris-HCl, 1,25 mg/ml BSA, pH 6,6
DIG-11-dUTP, BIO-16-dUTP oder FITC-12-dUTP jeweils 1 mM
Terminale Transferase-Lösung: 50 U/µl in 0,2 M Kaliumkadodylat, 1 mM EDTA, 200 mM KCl und 0,2 mg/ml ml Rinderserumalbumin, pH 6,6
Glykogen-EDTA-Lösung: 1 µl Glykogen-Lösung (20 mg/ml) und 200 µl 0,2 M EDTA pH 8,0

Durchführung

- Folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß auf Eis mischen: 4 µl Reaktions-Puffer, 4 µl 25 mM $CoCl_2$, 1 µl Oligonukleotid (100 pmol), 1 µl DIG-11-dUTP (oder Bio-16-dUTP bzw. FITC-12-dUTP), 1 µl 20 mM dATP und 1 µl Terminale Transferase-Lösung
- Ansatz mit sterilem, Aqua dest. auf 20 µl auffüllen und mischen
- Markierungsreaktion 15 min bei 37°C durchführen und dann auf Eis stellen
- Reaktion durch Zugabe von 2 µl Glykogen-EDTA-Lösung stoppen

2.5.3 Ethanolfällung und Überprüfung der Einbaueffizienz

Ethanolfällung der Sonden-DNA

Die Sonden wurden nach der Markierung mit Ethanol gefällt. Die zugrundeliegenden Anweisungen entstammen Sambrook et al. (1989) und dem Protokoll aus dem DIG-High-Prime-Kit.

Material, Chemikalien und Lösungen

Ethanol, abs., auf -20°C vorgekühlt
Ethanol, 70%, auf -20°C vorgekühlt
4 M LiCl
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0

Durchführung

- dem 20 µl-Markierungs-Ansatz 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl abs. Ethanol zugeben und gut mischen
- DNA über Nacht bei -20°C fällen
- 15 min mit 13.000 x g bei +4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Niederschlag mit 70% Ethanol waschen
- Überstand verwerfen und Niederschlag an der Luft trocknen lassen

- Niederschlag in entsprechendem Volumen TE-Puffer bzw. sterilem, Aqua dest. aufnehmen, so daß sich eine Endkonzentration 50 ng/µl (klonierte Sequenzen) bzw. 10 pmol/µl (Oligonukleotide) ergibt

Überprüfung der Einbaueffizienz der markierten Sonden

Um zu testen, ob die Markierung der Sonden ausreichend hoch ist um später eine Detektion zu ermöglichen, wurde die Einbaueffizienz der markierten Nukleotide in die Sonden-DNA geprüft. Das unten genannte Protokoll ist eine Modifikation des Protokolls aus dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ (Nr. 1093 657, Boehringer Mannheim). Durch den gleichzeitigen Einsatz von Antikörpern für Biotin und Digoxigenin lassen sich auch verschieden markierte Sonden simultan testen.

Material, Chemikalien und Lösungen

Nylon-Membran: Hybond-N (Amersham)
Biotin-markierte Kontroll-DNA: DNA-Längenstandard II, Biotin-markiert
Digoxigenin-markierte Kontroll-DNA: linearisierte pBR328 DNA
TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0
DIG-Puffer-1: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
DIG-Puffer-2: 1% (w/v) Blocking-Reagenz (Boheringer Mannheim) in DIG-Puffer-1
DIG-Puffer-3: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl
Wasch-Puffer: 0,3% (v/v) Tween 20® (Fluka) in DIG-Puffer-1
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper aus Maus-Maus Hybridzellen
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (BRL)
NBT: 4-Nitrobluetetrazoliumchlorid, 75 mg/ml in 70% Dimethylformamid (Boehringer Mannheim)
X-Phosphat: 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat, 50 mg/ml in Dimethylformamid (Boehringer Mannheim)

Durchführung

- Pro Sonde wird eine Verdünnungsreihe mit 5 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg der zu prüfenden, markierten DNA pro 10 µl in TE-Puffer erstellt. Als Kontrolle dient Biotin- bzw. Digoxigenin-markierte Kontroll-DNA
- 1 µl von jeder Verdünnungsstufe auf die Nylon-Membran auftragen (vgl. Schema, unten) und anschließend ca. 2 min antrocknen lassen

5 ng	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	0,1 pg	
.	.	.	.	.	.	Kontroll-DNA
.	.	.	.	.	.	Sonde 1
.	.	.	.	.	.	Sonde 2

- durch zweistündiges Backen bei 80°C wird die Sonden-DNA auf der Nylon-Membran fixiert
- Alle weiteren Schritte werden bei RT und unter ständigem leichten Schütteln durchgeführt
- Nylon-Membran in einer Plastik-Box passender Größe für 5 min (30 min bei Biotin-markierten Sonden) bei RT waschen
- 15 min in DIG-Puffer-2 inkubieren
- Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper (1:5.000) bzw. Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Antikörper (1:1.000) in 5 ml mit DIG-Puffer-2 verdünnen
- Nylon-Membran zweimal je 15 min mit Wasch-Puffer spülen

- Farblösung aus 5 ml DIG-Puffer-3, 22,5 µl NBT und 17,5 µl X-Phosphat (bzw. BCIP) ansetzen
- Nylon-Membran 3 min in DIG-Puffer 3 äquilibrieren
- Farblösung gleichmäßig über die Nylon-Membran verteilen und lichtdicht abgedeckt stehen lassen
- Nach 5 min, 10 min und 45 min die Anzahl der erkennbaren Präpzipitate (*Dots*) kontrollieren und dokumentieren
- Farbreaktion durch Zugabe von techn. Ethanol stoppen

Sonden, bei denen sich 10 bis 25 pg und weniger markierte Sonden-DNA mit dieser Methode nachweisen ließen, wurden als ausreichend gut markiert erachtet und für die weiteren Experimente verwendet.

2.6 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

2.6.1 Hybridisierungen

2.6.1.1 Hybridisierungen mit klonierten DNA Sequenzen

Die Durchführung der Hybridisierung mit den Sonden für die 5S und 18S-25S ribosomalen RNA- sowie Phaseolin-Gene erfolgte gemäß dem Protokoll von Nenno (1992) und Nenno et al. (1994).

Die Ausbildung von DNA-Doppelsträngen aus zwei komplementären Einzelsträngen ist ein reversibler Prozess, der von verschiedenen Faktoren beeinflußt wird. Diese sind der prozentuale Gehalt der Basen Guanin und Cytosin (%GC), die Länge des DNA-Doppelstranges (n), die Konzentration monovalenter Kationen (z. B. $[Na^+]$) und ggf. Doppelstrang-destabilisierender Agenzien (z. B. Formamid). Miteinander stehen diese Faktoren nach einer empirisch ermittelten Formel in Zusammenhang (Meinkoth und Wahl 1984). Mittels dieser Formel läßt sich die Schmelztemperatur (*temperature of melting*, T_m) eines Doppelstranges berechnen.

$$T_m = 81{,}5°C + 0{,}41 * (\%GC) + 16{,}6 \log [Na^+] - 500/n - 0{,}61 * (\%Formamid) \qquad (1)$$

In der praktischen Anwendung im Laufe der letzten Jahre hat sich allerdings gezeigt, daß die nach dieser Formel berechnete Schmelztemperatur nicht als absolut anzusehen ist, sondern nur einen geeigneten Anhaltspunkt liefert. Vermutlich verhalten sich DNA-Doppelstränge *in situ* nicht so wie in Lösung (Leitch et al. 1994).

Nach Britten und Kohne (1968) läßt sich aus der mit (1) errechneten Schmelztemperatur die optimale Hybridisierungstemperatur berechnen.

$$T_h = T_m - 25°C \qquad (2)$$

Setzt man in (1) einen GC-Gehalt von 39,3% für Phaseolin, eine Natrium-Konzentration von 0,39 M, eine Länge von ca. 200 Basenpaare (gängige angenomme Fragmentgröße nach Nick-Translation) und 50% Formamid ein, so erhält man eine Schmelztemperatur (T_m) von 58°C und aus (2) eine Hybridisierungstemperatur (T_h) von 33°C. Unter Berücksichtigung dieser Richtwerte wurden die Sonden aus klonierten Sequenzen unter den genannten Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C hybridisiert, was als hoch stringent anzusehen ist.

Material, Chemikalien und Lösungen

Fixogum: Montagekleber (Marabu 290117000)
20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na_3-Citrat*$2H_20$, pH 7,0
Formamid-Lösung: 70% deionisiertes Formamid (Biomol) in 2 x SSC
kalte Ethanolreihe: 70% und 85% Ethanol, 100% Ethanol abs., lagern bei -20°C
Dextransulfat: 50% (w/v) in Aqua dest.

Durchführung

Denaturierung und Hybridisierung

Präparate	Hybridisierungslösung
– Präparate 4 min in Formamid-Lösung bei 70°C denaturieren	
– Präparate je 5 min/Stufe in -20°C kalter Ethanolreihe entwässern. – OT für ca. 1 min in einen OT-Halter stellen und Ethanol ablaufen lassen	– Pro OT 10 µl Hybridisierungslösung in einem Reaktionsgefäß mischen: 5 µl 100% (v/v) deionisiertes Formamid 1 µl 20 x SSC 1 µl 50% Dextransulfat 1 µl Sonden-DNA (ca. 40 ng/µl) 2 µl Aqua dest.
– Präparate 15 min im Exsikkator unter Vakuum trocknen	– Sonde in der Hybridisierungslösung für 10 min im Wasserbad bei 82°C denaturieren – Hybridisierungslösung *schnell* auf Eis überführen und 5 min abkühlen lassen – Lösung auf Vortex-Schüttler mischen, in Tischzentrifuge abzentrifugieren und bis zum Auftropfen auf Eis stehen lassen
– pro OT 10 µl Hybridisierungslösung auftropfen, DG möglichst luftblasenfrei auflegen und mit Fixogum abdichten – OT in Wärmeschrank legen und Fixogum 30 min trocknen lassen – OT in feuchte Kammer legen und darin über Nacht bei 37°C hybridisieren	

Post-Hybrisisierungs-Waschung

– Fixogum vorsichtig vom OT lösen und in 2 x SSC stellen bis sich das DG vom OT gelöst hat

– 3 mal je 2 min in einer Küvette mit 2 x SSC bei 42°C spülen

Stringenz-Waschung

– 3 mal je 3 min in einer Küvette mit BT-Puffer bei 42°C waschen

2.6.1.2 Hybridisierungen mit endmarkierten Oligonukleotiden

Die Hybridisierung mit endmarkierten, synthetischen Oligonukleotiden erfolgte in Anlehnung an die Hybridisierung mit klonierten DNA-Sequenzen. Die geringere Länge der Oligonukleotide erfordert gegenüber den längeren klonierten Sequenzen Änderungen bei der Schmelz- und Hybridisierungstemperatur.

Die Schmelztemperaturen (T_m) der verschiedenen 5'-endmarkierten Oligonukleotide (Tabelle 5) wurden nach einer empirisch ermittelten Formel (3) für Sequenzen kürzer als 20 Nukleotide berechnet und die Oligonukleotide bei (T_m-5°C) bis (T_m-10°C) hybridisiert (Suggs et al. 1981; Thein und Wallace 1986).

Formel zur Berechnung von T_m von Oligonukleotiden in 1 M Na^+:

$$T_m = 4*(G + C) + 2*(A + T) \tag{3}$$

Tabelle 5: Schmelz (T_m)- und Hybridisierungstemperaturen (T_h) der verwendeten 5'-endmarkierten Oligonukleotid-Sonden. Werte in Klammern kennzeichnen die Temperaturen unter denen die Hybridisierung wiederholt wurden.

Oligonukleotid	T_m [°C]	T_h [°C]
$(C)_{16}$	64	59 (50,40)
$(AT)_8$	32	27
$(AG)_8$	48	43
$(CA)_8$	48	43
$(GC)_8$	64	59 (50,40)
$(AAT)_5$	30	25
$(AAG)_5$	40	35
$(CAC)_5$	50	45
$(GCC)_5$	60	55 (40)
$(AATG)_4$	40	35
$(GACA)_4$	48	43
$(GATA)_4$	40	35
M13con	50	45
33con	54	49

Da die Hybridisierungen mit $(C)_{16}$ und $(GC)_8$ bei 59°C keine Signale zeigten, wurden die beiden Oligonukleotide in zusätzlichen Versuchen bei 40° und 50°C hybridisiert.

Chemikalien und Lösungen

Oligonukleotid-Sonde: 5'-endmarkiertes Oligonukleotid, 10 pmol/µl

Oligo-Hybridisierungsmix bestehend aus: 5 x SSPE, 5 x Denhardts, 0,1% SDS, 1% BSA
20 x SSPE: 3 M NaCl, 0,2 M $Na_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,02 M Na_2 EDTA, pH 7,4
50 x Denhardts: 5 g Ficoll (Typ 400), 5 g Polyvinylpyrrolidon
6 x SSC: 300 ml 20 x SSC add 1000 ml
20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na_3-Citrat $\cdot$ $2H_20$, pH 7,0

Durchführung

Denaturierung und Hybridisierung

- Die Hybridisierungslösung für 10 µl/OT setzte sich aus 9 µl Oligonukleotid-Hybridisierungsmix und 1 µl Oligonukleotid-Sonde zusammen
- Alle anderen Arbeitschritte der Denaturierung und Hybridisierung erfolgten wie unter Abschnitt 2.6.1.1 angegeben
- Präparate über Nacht in einer feuchten Kammer bei T_m -5°C hybridisieren

Post-Hybridisierungs-Waschung

- Fixogum vorsichtig vom OT lösen, und diesen in 6 x SSC stellen bis sich das DG vom OT gelöst hat
- OT 3 mal je 20 min in 6 x SSC bei RT spülen

Stringenz-Waschung

- OT 3 min in 6 x SSC bei T_m-(5 bis 10)°C waschen
- OT 3 min in 6 x SSC bei RT spülen

2.6.1.3 Hybridisierungen mit getailten Oligonukleotiden

Die Hybridisierung des getailten Oligonukleotids für die *Arabidopsis*-Telomer-Sequenz basiert auf dem Protokoll von Schwarzacher und Heslop-Harrison (1991) und erfolgte wie von Gortner et al. (1998) für *Cicer arietinum* beschrieben.
Das getailte Mikrosatelliten-Motiv $(C)_{16}$ hingegen wurde unter den Bedingungen für die 5'-endmarkierte Oligonukleotide hybridisiert und gewaschen, was für ein getailtes Hexadekamer mit 100% GC-Gehalt als niedrigstringent anzusehen ist.

Chemikalien und Lösungen

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na_3-Citrat $\cdot$ $2H_20$, pH 7,0
50% (w/v) Dextransulfat in Aqua dest.
10% (w/v) SDS
getailtes Oligonukleotid, 7-10 pmol/µl
Poly(A)-Lösung, 10 mg/ml (Bohringer Mannheim)
Formamid-Lösung: 25% (v/v) deionisiertes Formamid (Biomol) in 2 x SSC

Durchführung

Denaturierung und Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung für 10 µl/OT setzte sich zusammen aus: 25% (v/v) deionisiertes Formamid, 2 x SSC, 10% (w/v) Dextransulfat, 0.5% (v/v) SDS, 1 pmol/µl getailtes Oligonukleotid und 0,1 mg/µl Poly(A)-Lösung.

Alle anderen Arbeitsschritte der Denaturierung und Hybridisierung erfolgten wie unter Abschnitt 2.6.1.1 angegeben.

Post-Hybridisierungs- und Stringenz-Waschung

- Fixogum vorsichtig vom OT lösen, und diesen in 2 x SSC stellen bis sich das DG vom OT gelöst hat
- OT 5 min in 25%iger Formamid-Lösung bei 37°C waschen
- OT 2 mal je 5 min in 2 x SSC bei 37°C spülen

2.6.2 Detektionssysteme

Um die hybridisierten Sondenmoleküle nachzuweisen, wurden sie entweder direkt oder indirekt mit Hilfe des Avidin/Biotin-Systems oder mit Anti-Digoxigenin- und weiteren Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert.

2.6.2.1 Direkte Detektion

Für die direkte Detektion ist nach der Hybridisierung und Stringenzwaschung kein zusätzlicher Arbeitsschritt notwendig. Die Präparate können umgehend untersucht werden.

2.6.2.2 Avidin/Biotin

Die beiden Moleküle Avidin und Biotin haben eine sehr hohe Bindungsaffinität und eignen sich daher besonders gut als histochemisches Nachweissystem. Biotin-markierte Sonden lassen sich durch Inkubation mit Avidin-Molekülen sichtbar machen, indem letztere mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind. Die am häufigsten verwendeten Fluorochrome sind FITC (grün/gelb), TRITC (rot) oder Cy3 (rot).
Bei Zielsequenzen, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen, ist es notwendig, die Intensität der Fluoreszenz am Ort der Hybridisierung (Signal) zu erhöhen. Dazu inkubiert man nach der ersten Lage Fluorochrom-gekoppeltem Avidin zusätzlich mit Biotin-makierten Anti-Avidin-Antikörpern und dann wiederum mit Fluorochrom-gekoppeltem Avidin, und erhält so eine Verstärkung der Fluoreszenzsignale, was als Signalamplifikation bezeichnet wird (Pinkel et al. 1986).
Zur Detektion der mittelreptitiven Gene der 18S-25S RNA genügte eine einfache Amplifikation, bestehend aus 2 Lagen FITC-konjugiertem Avidin. Für den Nachweis der nur in geringer Kopienzahl vorliegenden Phaseolin-Gene hingegen waren bis zu 4 Lagen FITC-gekoppeltem Avidin notwendig (Abbildung 2).

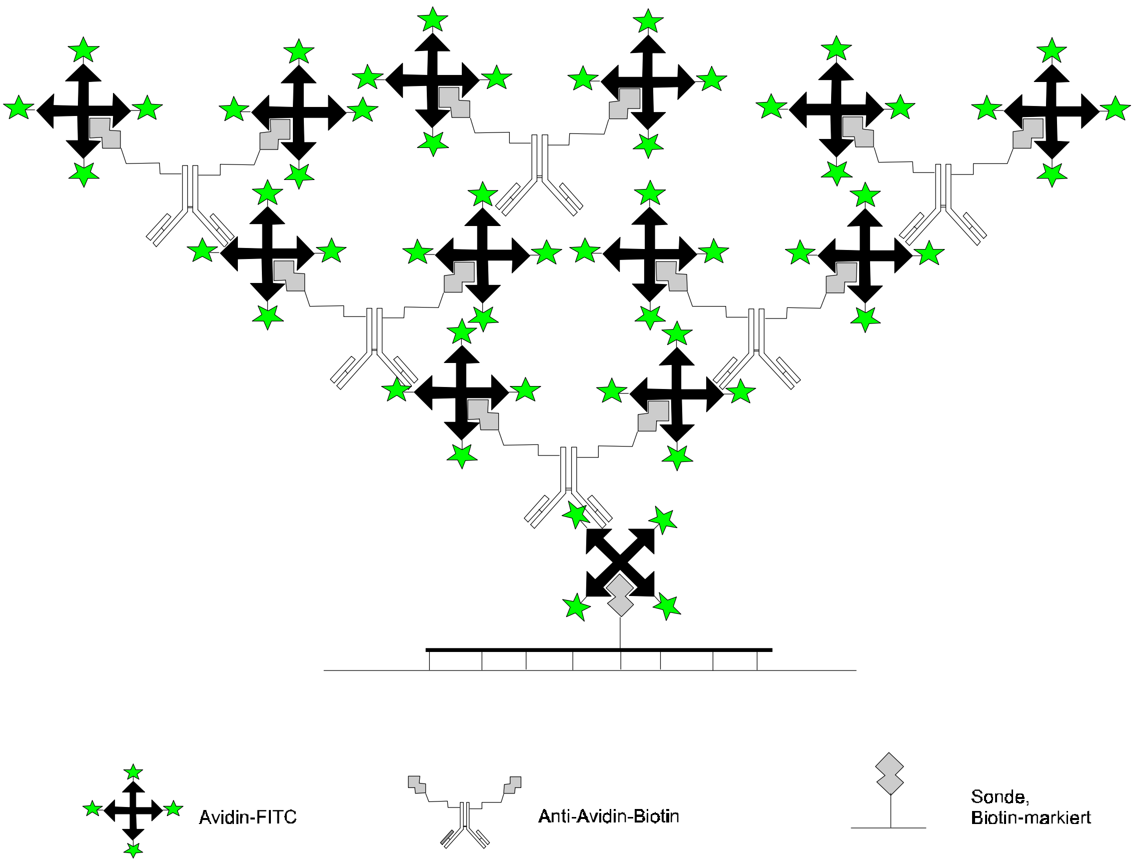


Abbildung 2: Detektionsschema der Signalamplifikation im Avidin/Biotin-System (4 Lagen)

Material, Chemikalien und Lösungen

BT-Puffer: 0,05% (v/v) Tween 20® (Fluka) in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3
Blockierungs-Lösung-1: 5% (w/v) BSA (Sigma, A-7906) in BT-Puffer
Avidin-FITC-Lösung-1:
  Avidin DN-FITC (Vector) 1:100 verdünnt (5 µg/ml) in Blockierungs-Lösung
  alternativ wurde auch ExtrAvidin-FITC (Sigma) oder ExtrAvidin-TRITC (Sigma) verwendet
Blockierungs-Lösung-2: 5% (w/v) Ziegenserum in BT-Puffer
Anti-Avidin-Lösung:
  Anti-Avidin D (Vector) 1:50 verdünnt (10 µg/ml) in Blockierungs-Lösung-2
Avidin-FITC-Lösung-2:
  Avidin DN-FITC (Vector) 1:50 verdünnt (10 µg/ml) in Blockierungs-Lösung-1
  alternativ wurde auch ExtrAvidin-FITC (Sigma) oder ExtrAvidin-TRITC (Sigma) verwendet

Durchführung

Detektion und Signalamplifikation im Avidin/Biotin-System erfolgte nach Pinkel et al. (1986).

Die Waschschritte, Blockschritte und Antikörper-Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei RT (Oligonukleotide) bzw. bei 37°C (klonierte Sequenzen) durchgeführt. Die Volumenangaben verstehen sich pro Objektträger (OT).

– Präparate 3 min in BT-Puffer äquilibrieren

1. Lage: Detektion mit Avidin-FITC

– 100 µl Blockierungs-Lösung-1 auftropfen und 5 min blocken
– Lösung abschütteln, 50 µl Avidin-FITC-Lösung-1 auftropfen, DG auflegen und 60 min inkubieren
– 3 mal 5 min in BT-Puffer waschen

Signalamplifikation

Anti-Avidin-Biotin

– 100 µl Blockierungs-Lösung-2 auftropfen und 5 min blocken
– Lösung abschütteln, 50 µl Anti-Avidin-Lösung auftropfen, DG auflegen und 45 min inkubieren
– 3 mal 5 min in BT-Puffer waschen

2. Lage: Avidin-FITC

– 100 µl Blockierungs-Lösung-1 auftropfen und 5 min blocken
– Lösung abschütteln, 50 µl Avidin-FITC-Lösung-2 auftropfen, DG auflegen und 60 min inkubieren
– 3 mal 5 min in BT-Puffer waschen

Die Signalamplifikation wurde je nach Signal-Hintergrund-Verhätnis bis zu zweimal wiederholt, bevor die Chromosomen mit DAPI gefärbt wurden (vgl. Abschnitt 2.7).

2.6.2.3 Signalamplifikation für Digoxigenin-markierte Sonden

Zur Detektion von Sonden, die mit Digoxigenin (DIG) markiert sind, verwendet man generell Anti-DIG-Antikörper. Handelt es sich bei der nachzuweisenden Zielsequenz um eine hoch- oder mittel-repetitive Sequenz oder ist die Länge des verwendeten Sondenmoleküls relativ groß (z. B. Cosmid- oder YAC-Klone), reicht eine Lage Fluorochrom-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper meist aus.
Liegen die Zielsequenzen dagegen nur in geringer Kopienzahl vor oder werden sehr kurze Sondenmoleküle verwendet, ist eine Vertstärkung des Signals notwendig. Im einfachsten Fall verwendet man dazu Fluorochrom-gekoppelte Anti-DIG-Antikörper, z. B. aus der Maus, und verstärkt das Signal mit einer zweiten Inkubation mit Fluorochrome-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper. Durch Einfügen eines Digoxigenin-gekoppelten Antikörpers läßt sich eine dreischichtige Kaskade bestehend aus Maus-Anti-DIG-, Anti-Maus-DIG- und Fluorochrom-

gekoppeltem Anti-DIG-Antikörper (Abbildung 3) aufbauen. Diese Kombination von Antiköpern wird als Set unter dem Namen „Fluorescent Enhancer Set for DIG Detection“ kommerziell von der Firma Boehringer Mannheim angeboten. Prinzipiell ließe sich die Kaskade durch zwischgeschaltete, abwechselnde Lagen von Maus-Anti-DIG und DIG-Anti-Maus und noch weiter ausbauen. Da die notwendigen Antikörper aber deutlich konzentrierter eingesetzt werden als die entsprechenden Agenzien beim Avidin/Biotin-System und darüber hinaus vergleichsweise teuer sind, wurde darauf verzichtet.
Für den Nachweis der Telomer-Sequenz mit Hilfe des Digoxigenin-getailten Oligonukleotids wurde, wie in der Arbeit von Gortner et al. (1998) beschrieben, eine dreischichtige Detektions-Kaskade verwendet (Abbildung 3).

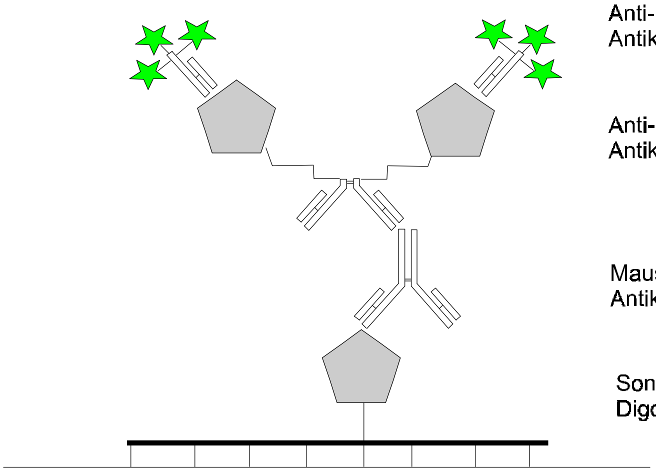


Abbildung 3: Dreischichtiges Detektionsschema für Digoxigenin-markierte Sonden

Material, Chemikalien und Lösungen

DIG-Puffer-1: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
DIG-Puffer-1/Tween: 0.2% (v/v) Tween 20® (Fluka) in DIG-Puffer-1
DIG-Puffer-2: 0.5 % (w/v) DIG-Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim) in DIG-Puffer-1
Maus-Anti-Digoxigenin -Lösung:
Maus-Anti-Digoxigenin-AK (monoklonal) 1:300 verdünnt (0,3 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Anti-Maus-DIG-Lösung:
Digoxigenin-gekoppelter Anti-Maus-AK (F(ab’)2-Fragment) 1:8 verdünnt (25 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Anti-DIG-FITC-Lösung:
FITC-gekoppelter Anti-Digoxigenin-AK (Fab-Fragment) 1:8 (25 µg/ml) in DIG-Puffer-2

Durchführung

Waschschritte und Antikörper-Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei RT durchgeführt. Die Volumenangaben verstehen sich pro Objektträger (OT).

Präparate 3 min in DIG-Puffer-1 äquilibrieren

Maus-Anti-DIG

- 100 µl DIG-Puffer-2 auftropfen, DG auflegen und in feuchter Kammer 15 min blocken
- DG abschütteln, 50 µl Maus-Anti-Digoxigenin -Lösung auftropfen, DG auflegen und 60 min inkubieren
- 3 mal 5 min in Küvette mit DIG-Puffer-1/Tween waschen

Anti-Maus-DIG

- 300 µl DIG-Puffer-2 auftropfen und 5 min blocken
- Puffer abschütteln, 50 µl Anti-Maus-DIG-Lösung auftropfen, DG auflegen und 45 min inkubieren
- 3 mal 5 min in Küvette mit DIG-Puffer-1/Tween waschen

Anti-DIG-FITC

- 300 µl DIG-Puffer-2 auftropfen und 5 min blocken
- Puffer abschütteln, 50 µl Anti-DIG-FITC-Lösung auftropfen, DG auflegen und 45 min inkubieren
- 3 mal 5 min in Küvette mit DIG-Puffer-1/Tween waschen

Anschließend werden die Chromosomen, wie im Abschnitt 2.7 beschrieben, mit DAPI gefärbt.

2.6.2.4 Digoxigenin-Biotin-Amplifikations-System

Um die sehr kurzen Sequenzen von Oligonukleotiden nachzuweisen, wurde ein von Dr. T. Becker (persönliche Mitteilung) vorgeschlagenes „Hybrid“-System zur Signalamplifikation von DIG-markierten Sonden (Köhler 1992) eingesetzt. Dazu erfolgte ein erster Inkubationssschritt mit Maus-Anti-DIG-Antikörper und ein zweiter Schritt mit Biotin-gekoppeltem Anti-Maus-Antikörper. Darauf aufbauend fährt man gemäß dem Avidin-Biotin-Amplifikationsschema (Abschnitt 2.6.2.2) fort. Damit verbindet man DIG-markierte Sonden mit der einfachen und kostengünstigen Signalamplifikation des Avidin-Biotin-Systems. Diese Kombination soll im folgenden als „Digoxigenin-Biotin-Amplifikations-System“ oder kurz DBA-System bezeichnet werden (Abbildung 4).

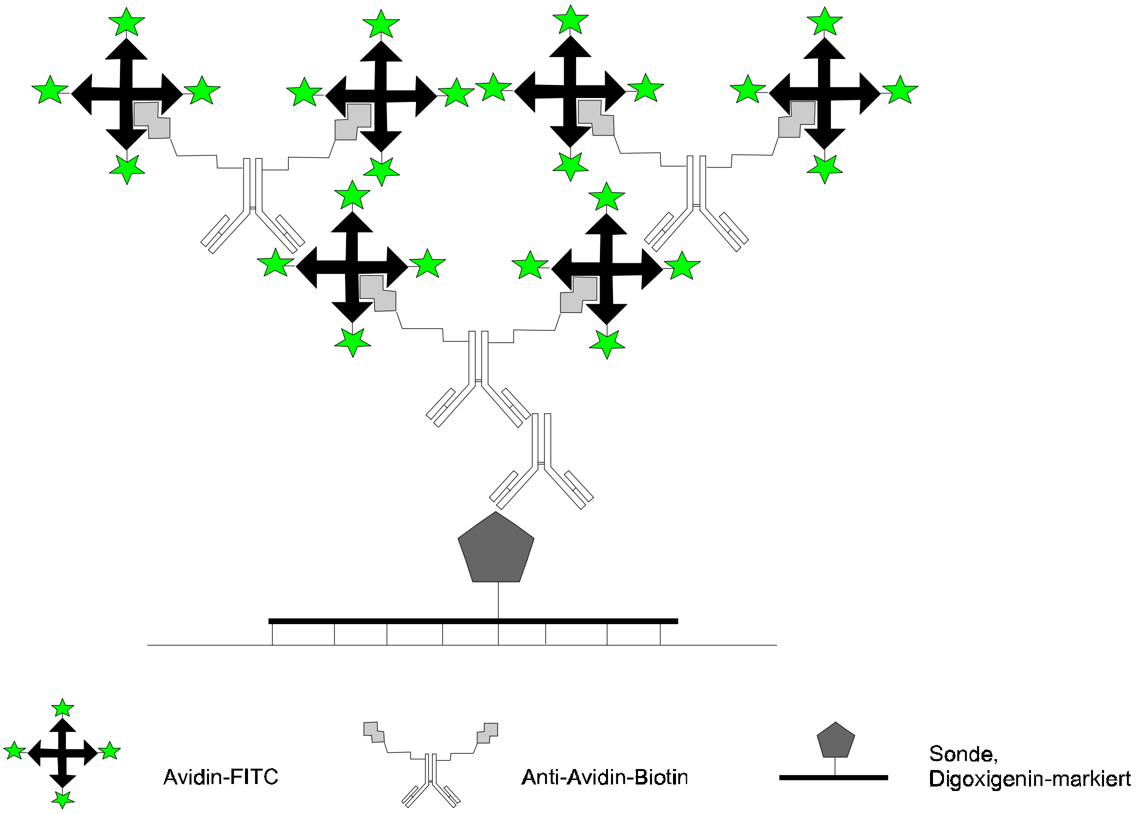


Abbildung 4: Schema des Digoxigenin-Biotin-Amplifikations-System (DBA-System)

Material, Chemikalien und Lösungen

Maus-Anti-DIG-Lösung:
Maus-Anti-Digoxigenin-AK (monoklonal) 1:300 verdünnt (0,3 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Anti-Maus-Biotin-Lösung:
Biotin-gekoppelter Anti-Maus-AK, F(ab')2-Fragment, 1:300 verdünnt (1,7 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Avidin-FITC-Lösung-1:
Avidin DN-FITC (Vector) 1:100 verdünnt (5 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Anti-Avidin-Lösung:
Anti-Avidin D (Vector) 1:50 verdünnt (10 µg/ml) in DIG-Puffer-2
Avidin-FITC-Lösung-2:
Avidin DN-FITC (Vector) 1:50 verdünnt (10 µg/ml) in DIG-Puffer-2

Durchführung

Das Protokoll des DBA-Systems entspricht dem für die dreischichtigen Signalamplifikation für DIG-markierte Sonden (Abschnitt 2.6.2.4), aber mit folgenden Antikörpern:

– 1. Schicht: Maus-Anti-DIG-Lösung
– 2. Schicht: Anti-Maus-Biotin-Lösung
– 3. Schicht: 1. Lage Avidin-FITC-Lösung

Signalamplifikation

- 4. Schicht: Anti-Avidin-Lösung
- 5. Schicht: 2. Lage Avidin-FITC-Lösung

Die Signalamplifikation wurde je nach Signal-Hintergrund-Verhätnis, einmal wiederholt, und die Chromosomen anschließend mit DAPI gefärbt (vgl. Abschnitt 2.7).

2.7 Mikroskopie und Bild-Dokumentation

DAPI-Färbung

Nach der Detektion wurden die Chromosomen mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol (DAPI) gefärbt und für die Untersuchung eingebettet. Die verwendeten Einbettmedien enthielten spezielle Substanzen wie Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO), die das Ausbleichen der Fluoreszenzsignale hinauszögern und damit stabiler machen.

Chemikalien und Lösungen

DABCO: Diazabicyclo[2.2.2]octan (Sigma)
DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenyl-indol · 2HCl · H_20 (Serva)
Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie (Merck, 4095)
DAPI-Stammlösung: 0,2 mg/ ml in Aqua dest.
DAPI-Färbelösung: 20 µl DAPI-Stammlösung und 20 µl PI-Stammlösung in 60 ml PBS-Puffer
Einbettmedien waren entweder (a) Vectashield (Serva) oder (b) 1 Teil Tris-HCl pH 7,4 und 9 Teile Glycerin mit 2,3% (w/v) DABCO und 0,02% NaN_3

Durchführung

- frische DAPI-Färbelösung herstellen und vor Licht geschützt aufbewahren
- Präparate für 10 min in Färbelösung an einen dunkeln Ort bei RT stellen
- OT kurz in BT-Puffer oder DIG-Puffer-1 abspülen und abtropfen lassen
- Präparate in jeweils 10 µl Einbettmedium einschließen und mindestens 30 min im Dunkeln liegen lassen, bevor sie fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden

Die Präparate wurden mit einem Axioplan (Zeiss) in Epifluoreszenz untersucht. Dazu wurden je nach Farbstoff die entsprechenden Filtersätze verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Verwendete Fluoreszenz-Filtersätze

Fluoreszenzfarbstoff	Filtersatz
DAPI	Zeiss 02
DAPI und Propidiumiodid	Zeiss 02
FITC	Zeiss 17 (Schmalband-Filter)
TRITC und Cy3	Zeiss 15

Zur Dokumentation der mikroskopischen Bilder wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Die intensive und stabile Fluoreszenz der Fluorochrom-Bänderung ließ sich gut auf konventionellem fotografischen Wege dokumentieren, während die schwachen, schnell ausbleichenden Signale der FISH mit Hilfe einer gekühlten CCD Kamera festgehalten wurden.

Fotografie

Die Fluorochrom-Bänderung mit dem Gemisch von DAPI und Propidiumiodid wurde mit einer MC100 Kamera (Zeiss) fotografiert und auf Farbnegativfilm (Ultra 50, Agfa) oder Diafilm (Elite II 100, Kodak) aufgenommen. Anschließend wurden die Papierabzüge mittels eines Flachbettscanners (Argus II, Agfa) bei 600 dpi bzw. die Dias mit einem Filmscanner (Photo Scanner, Hewlett Packard) bei 1200 dpi in einen Personal Computer eingescannt. Nach Anpassung von Helligkeit und Kontrast wurden und die Einzelbilder der Chromosomen mit einem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop, Adobe) elektronisch zu Bildtafeln montiert.

Elektronische Bilderfassung und Bildbearbeitung

Die Dokumentation der Signale der FISH erfolgte mit einer gekühlten 12 bit Schwarzweiß CCD-Kamera (CH250A, Kodak CCD Chip KAF1400, Grade 3, Auflösung 1317 x 1035 Pixel, Pixel-Größe 6,8 x 6,8 µm, Photometrics). Diese besitzt selbst im Vergleich zu höchstempfindlichen fotografischen Filmen mit 3200 ASA noch eine ca. 1000fach höhere Lichtempfindlichkeit (pers. Mitteilung, Photometrics), und erlaubt daher Aufnahmen von extrem schwachen Fluoreszenzsignalen. Die Aufnahmen der CCD-Kamera wurden mit einem Macintosh Computer (Quadra 650, Apple) von dem Bildverarbeitungsprogramm IPLab Spectrum (Signal Analytics) gesteuert. Typischerweise wurden die einzelnen Schwarz-Weiß-Bilder dann mit Hilfe der Programm-Erweiterung „Multiprobe“ von IPLab Spectrum einzeln in Rot, Grün oder Blau eingefärbt, die Signalverschiebung korrigiert, Helligkeit und Kontrast angepaßt und die Einzelaufnahmen zu einem überlagerten Bild zusammengefügt, um die Position der Hybridisierungssignale auf den Chromosomen zu zeigen. Die Erstellung der Bildtafeln erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm (Photoshop, Adobe). Die Parameter der Präparate und Aufnahme wurden mit dem Datenbankprogramm FileMaker Pro (Claris) in einer eigens dazu erstellten Datenbank verwaltet.

2.8 Karyotypisierung

Zur Karyotypisierung wurden die Bilder der Chromosomen von 11 nahezu vollständigen Kernen ausgewertet. Um alle Chromosomen eines Kernes zu erfassen, waren meist bis zu fünf Bilder notwendig. Weiterhin machte es die relativ große Dicke der Chromosomen von ca. 5 µm (gemessen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, Leica) notwendig, ein Objektiv mit geringer (16facher) Vergrößerung und großer Tiefenschärfe einzusetzen. Erst damit war es möglich, alle Details der Chromosomenmorphologie aus den verschiedenen Ebenen in einem Bild zu dokumentieren.

Zur Auswertung wurden die Bilder zu einem sog. „Karyotyp-Navigator“ zusammengestellt. Dieser besteht aus einer Sammlung von Dateien in HTML-Format, in der die Bilder strukturiert und durch Hyperlinks miteinander verbunden dargestellt werden. Die Konvertierung der Orginalbilder aus dem IPLab-eigenen Bildformat in das komprimierte JPEG-Format erfolgte mit dem Programm Grafikkonverter (Lemke Software). Die HTML-Seiten wurden zum größten Teil mit den HTML-Editoren der Programme Netscape Navigator Gold 3 Beta und Communicator Beta 4.04 (Netscape) erstellt oder direkt in einem ASCII-Editor (Notepad, Microsoft) geschrieben.

Für die Längenmessungen der Chromosomen anhand der elektronisch erfaßten Bilder, wurden die Bildverarbeitungsprogramme IPLab Spectrum (Signal Analytics) und Scion Image (Scion Corp., Frederick, USA) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Präparation

Gegenüber den bisherigen Präparationsmethoden (Nagl 1974; Baumann 1991; Nenno 1992; Nenno et al. 1994) wurden folgende zwei Änderungen eingeführt: Erstens wurden sowohl das Wässern der fixierten Samen als auch das Spülen in Aqua dest. nach dem Herauspräparieren und der Mazeration der Gewebestücke auf eine Dauer von 24 h ausgedehnt. Zweitens wurde jede einzelne Zelle von der Zellwand befreit und einer 15-20minütigen Mazeration in 45% Essigsäure unterzogen, noch bevor sie gequetscht und die Chromosomen gespreitet wurden. Diese Maßnahmen bewirkten zum einen, daß das Nukleoplasma der Zellen durchsichtiger wurde, aber vor allem, daß die Viskosität des gallertartigen Nukleoplasmas verringert wurde. Erst dadurch konnte eine gute Spreitung der Chromosomen erzielt werden (Abbildung 5). Ferner traten auch bei etwas stärkerem Quetschen vergleichsweise selten Chromosomenfragmente auf, und die Nukleolus-organisierenden Chromosomen blieben zumeist vollständig erhalten und am Nukleolus hängen.

3.2 Definition von „Euchromatin“ und „Heterochromatin“

Bereits bei der Präparation unter dem Stereomikroskop war zu erkennen, daß die Polytänchromosomen nicht in allen Suspensorzellen gleich stark kondensiert vorlagen. Noch deutlicher ließen sich diese Unterschiede anhand der Helligkeit im Phasenkonstrast-Mikroskop beobachten.

Bei etwa 90% der Kerne ließen sich an den Chromosomen drei unterschiedlich helle Abschnitte feststellen. Im Centromerbereich befand sich meist ein besonders heller Bereich und an den Enden in der Regel sehr dunkel bis schwarz erscheinende punktförmige Strukturen. Die dazwischen liegenden Bereiche erschienen in einem mittleren Grau, das etwas dunkler war als der Hintergund (Abbildung 5a).

Nach Heitz (1928) werden solche Bereiche als heterochromatisch bezeichnet, die auch während der Interphase kondensiert bleiben und sich stärker anfärben als die Masse des Euchromatins. Wendet man den ersten Teil der Definition auf die oben erwähnte Beobachtung an, so läßt sich daraus für die Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*, die Interphasechromosomen darstellen, folgendes ableiten:
Die stark lichtbrechenden und daher hellen Abschnitte der Centromerregion sowie die dunklen punktförmigen Strukturen der Chromosomenenden stellen dicht gepacktes (kondensiertes) Chromatin dar und werden im folgenden als heterochromatisch angesehen. Die

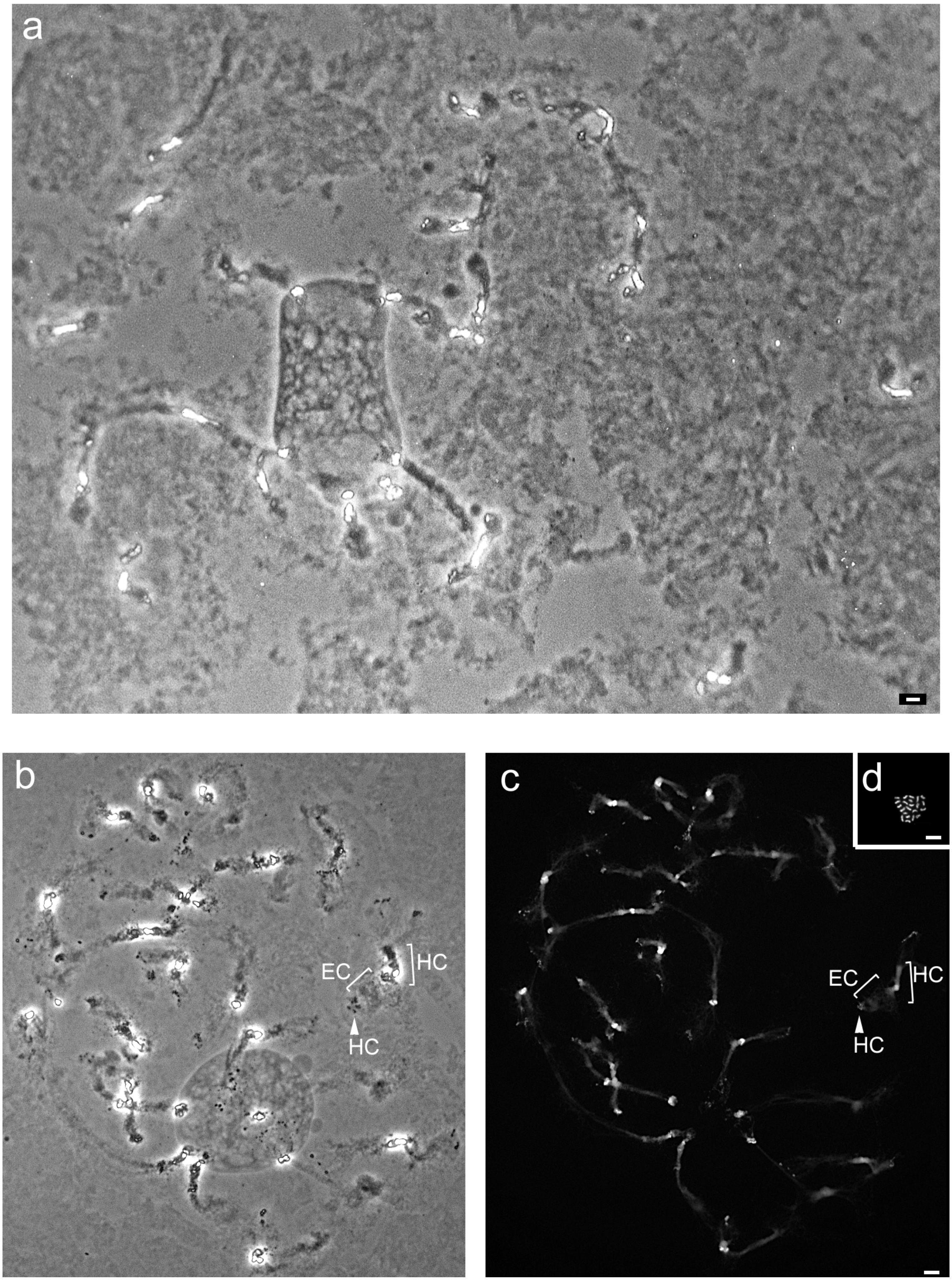


Abbildung 5: Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor und Metaphasechromosomen aus Wurzelspitzen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner. (**a**) Kern mit 22 Polytänchromosomen direkt nach der Quetschpräparation im Phasenkontrast. (**b** und **c**) Vergleichende Darstellung von Eu- und

Heterochromatin der Polytänchromosomen im Phasenkonstrast bzw. nach DAPI-Färbung. (**c**) Im Phasenkontrastbild sind heterochromatische Bereiche entweder stark lichtbrechend oder dunkel, während die euchromatischen Bereiche in mittleren Grau erscheinen. (**c**) In der Schwarzweiß-Darstellung der DAPI-Fluoreszenz des gleichen Kerns wie in (c) erscheinen die heterochromatische Bereiche im Centromerbereich und an den Enden stärker angefärbt (mittleres Grau bis Weiß) als die dazwischenliegenden euchromatischen Abschnitte (Dunkelgrau). Die Chromosomen sind in (b) und (c) zum Teil stark gestreckt. (**d**) 22 Metaphasechromosomen im selben Maßstab wie Polytänchromosomen. Maßstab entspricht 10 µm.

dazwischenliegenden Chromosomenabschnitte, die weder stark lichtbrechend noch dunkel erscheinen, stellen lockeres (dekondensiertes) Chromatin dar und sind damit als euchromatisch anzusehen.

Vergleicht man die Helligkeitsverteilung innerhalb der Chromosomen eines Kerns im Phasenkontrast mit der Fluoreszenzintenstität nach DAPI-Färbung, so läßt sich eine weitgehende Übereinstimmung beobachten. Die nach obiger Definition heterochromatischen Bereiche färben sich mit DAPI stärker an als die dazwischenliegenden euchromatischen Chromosomenabschnitte (vgl. beschriftetes Chromosom in Abbildung 5c und d).

3.3 Morphologische Merkmale der Polytänchromosomen

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß die Morphologie der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* sehr variabel sein kann, was sowohl ihre Gesamtlänge als auch die Verteilung heterochromatischer Banden/Querscheiben im Euchromatin betrifft (Nagl 1965; Nagl 1967; Nagl 1981).

Es wurde daher nach anderen Merkmalen gesucht, die eine verläßlichere Klassifizierung der Chromosomen als bisher ermöglichen. Insbesondere sollte eine individuelle Identifikation der Polytänchromosomen in Präparaten nach Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ermöglicht werden. Die Präparate für die Karyotypisierung wurden daher derselben Vorbehandlung mit RNase und Pepsin/HCl unterzogen wie die FISH-Präparate und mit DAPI bzw. einem bei der FISH gebräuchlichen Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid gefärbt.

3.3.1 Centromernahes Heterochromatin (cHC)

Sowohl im Phasenkontrast als auch in der DAPI-Fluoreszenz war auffällig, daß von der morphologischen Variablität der Polytänchromosomen vor allem die euchromatischen Bereiche betroffen waren. Demgegenüber zeigte sich die Ausprägung des centromernahen Heterochromatins (cHC) als vergleichsweise konstant. Insbesondere konnten an den cHC-Bereichen vier verschiedene Merkmale festgestellt werden, die eine individuelle Identifizierung der Chromosomen erlaubten (Abbildung 6):

1. Die Lage des Centromers
2. Ein oder zwei Banden, die sich mit DAPI stärker anfärben ließen als das restliche cHC
3. Eine oder mehrere sekundäre Einschnürungen
4. Bereiche mit Verbreiterung, d.h. die deutlich breiter bzw. beidseitig überstehend erscheinen

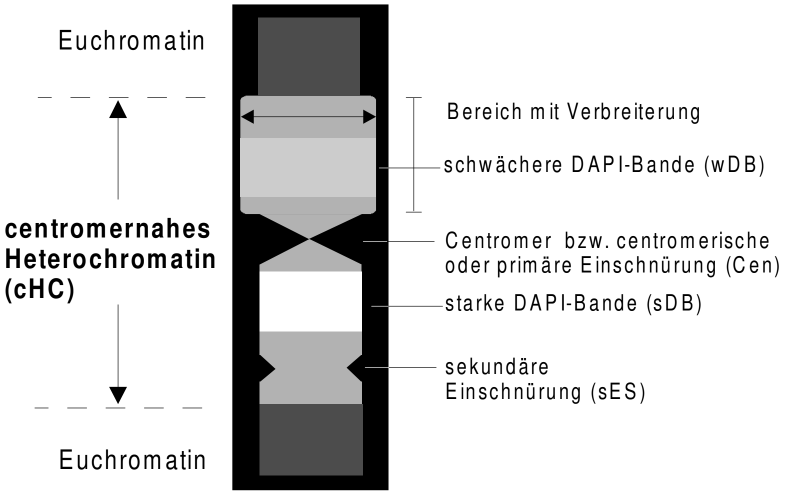


Abbildung 6: Schematische Darstellung der vier Merkmale des centromernahen Heterochromatins (cHC) die zur Identifizierung der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner verwendet wurden.

Die beiden erstgenannten Merkmale, die Lage des Centromers und die der DAPI-Banden, waren bei allen 11 Chromosomen zu beobachten. Allgemein ist der Bereich des Centromers (Cen) durch eine deutliche Einschnürung charakterisiert, die auch als „primäre Einschnürung" bezeichnet wird (Darlington 1937). Bei zwei Chromosomen lag das Centromer mittig innerhalb des cHC während es bei den übrigen Chromosomen das cHC asymmetrisch teilte. In unterschiedlichen Abständen vom Centromer ließen sich im cHC DAPI-Banden beobachten, die aufgrund ihrer stärkeren Fluoreszenz aus dem sie umgebenden cHC hervortraten. Jedes Chromosom wies zumindest eine solche Bande auf, manche Chromosomen auch zwei. Wenn zwei DAPI-Banden vorkamen, war eine Bande stärker gefärbt (starke DAPI-Bande = sDB) als die andere Bande (schwächere DAPI-Bande = wDB).

Die beiden anderen Merkmale, sekundäre Einschnürungen (sES) und beidseitig überstehende Abschnitte des cHC, traten unabhängig voneinander nur bei einigen Chromosomen auf.

Wichtig ist anzumerken, daß sich die Lage des Centromers, die sekundären Einschnürungen und die beidseitig überstehenden Abschnitte auch ohne Vorbehandlung erkennen ließen. Die starken und schwachen DAPI-Banden jedoch, lassen sich erst nach der Pepsin-Vorbehandlung deutlich vom Rest des cHC unterscheiden.

Die chromosomenspezifische Ausprägung der Merkmale des cHC erlaubte auch dann noch eine Identifikation der meisten Chromosomen, wenn die Kerne unvollständig waren. Dies ist besonders wichtig, da nur selten alle Chromosomen eines Kerns auf dem Präparat verbleiben.

Färbung mit DAPI und Propidiumiodid

Es zeigte sich, daß sich verschiedene Abschnitte der Polytänchromosomen mit einem Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid (DAPI/PI) differentiell anfärben ließen (Abbildung 7). Dazu wurden die Präparate über Nacht (oder länger) in der Färbelösung inkubiert und bei UV-Anregung mit einem Filtersatz für die DAPI-Fluoreszenz betrachtet.

Euchromatische Bereiche wiesen danach eine dunkelblaue Färbung auf. Centromerisches und telomerisches Heterochromatin (Abschnitt 3.3.3) hingegen erscheinen rosa. Besonders auffällig waren weiße Banden im rosa gefärbten cHC-Bereich einiger Chromosomen. Ihre Lage entsprach der starken DAPI-Banden (s.o.). Bei der DAPI/PI-Färbung hoben sich die starken DAPI-Banden somit nicht nur aufgrund ihrer größeren Helligkeit, sondern auch durch ihre farbliche Differenzierung deutlich vom Rest des cHC ab.

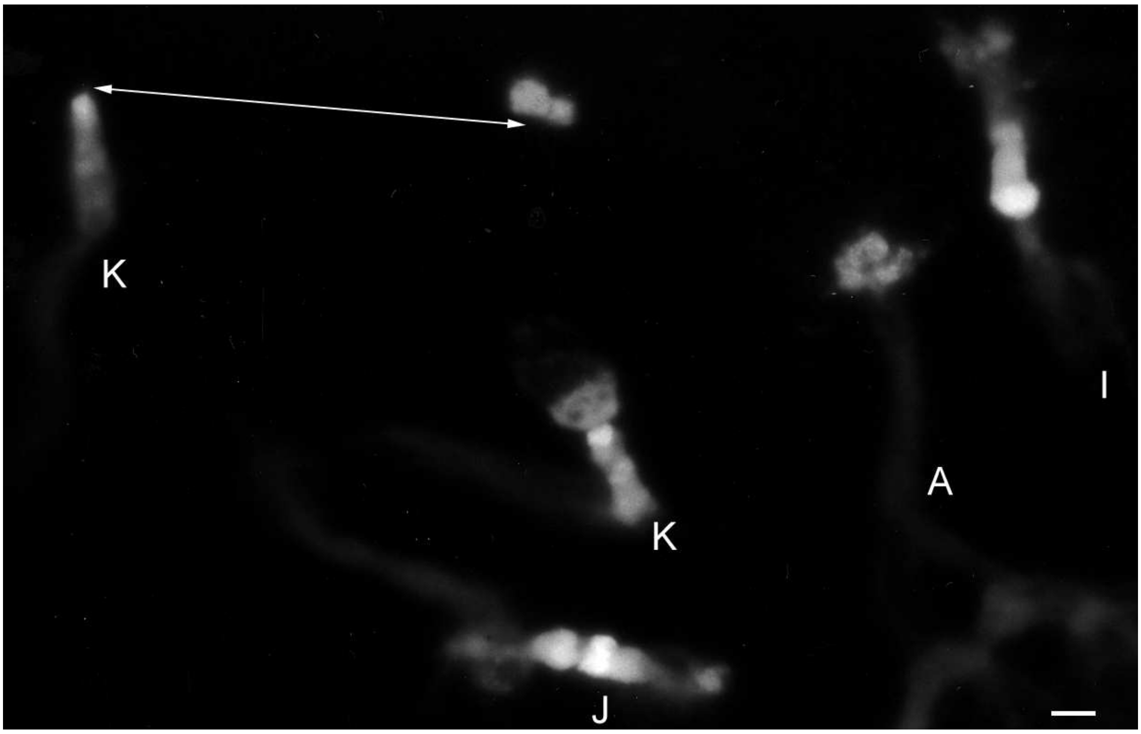


Abbildung 7: Differentielle Färbung der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner mit einem Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid bei UV-Anregung im Filtersatz für DAPI-Fluoreszenz. Euchromatin ist dunkelblau, Heterochromatin ist rosa bzw. weiß gefärbt. Ein Chromosom K ist hier bei der Präparation auseinandergerissen (Doppelpfeil). Maßstab entspricht 10 µm.

3.3.2 Nukleolus-organisierende Region

In vollständigen Kernen wurden immer 6 Chromosomen mit jeweils einer terminal gelegenen Nukleolus-organisierenden Region (NOR) beobachtet. Meist war ein Teil jeder NOR stark dekondensiert, und mehrere solcher stark aufgelockerter Bereiche bildeten zusammen einen großen Sammelnukleolus. Dieser ließ sich aufgrund seiner Größe und Struktur bereits ohne Vorbehandlung und Färbung im Phasenkontrast-Mikroskop erkennen (Abbildung 8). Die Form eines Sammelnukleolus war variabel und reichte von nahezu kreisförmig bis unregelmäßig. Anstelle eines Sammelnukleolus aus 6 NORs kamen auch entsprechend mehrere kleinere Sammelnukleoli vor, die dann aus den NORs von nur 2 bis 5 Nukleolus-organisierenden(NO)-Chromosomen bestanden. Ebenso konnten in einem Kern ein oder mehrere kleinere Sammelnukleoli vorkommen und dennoch einzelne NO-Chromosom einen eigenen Nukleolus ausbilden. Daß aber alle 6 NO-Chromosomen jeweils einen separaten Nukleolus ausbildeten, wurde nicht beobachtet.

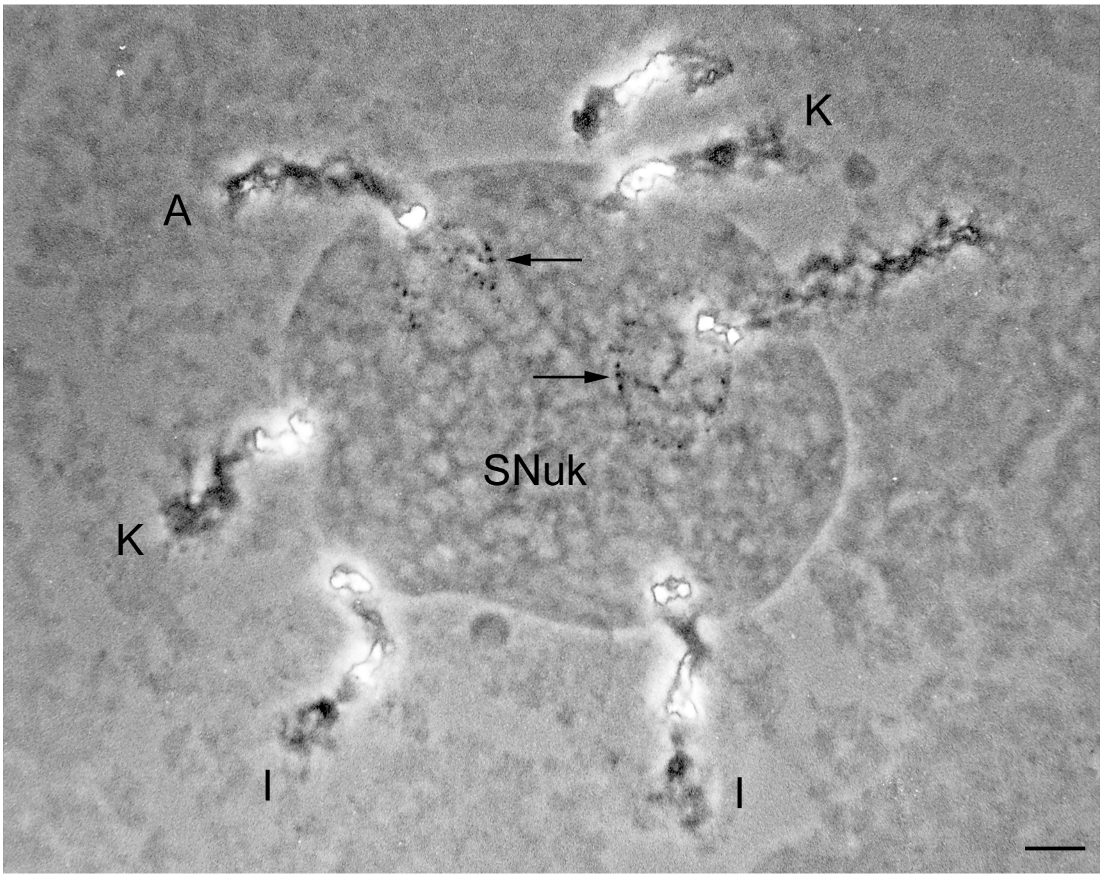


Abbildung 8: Sammelnukleolus mit sechs Nukleolus-organisierenden Chromosomen (Paar A, I und K). Die kleinen punktförmigen schwarzen Strukturen (Pfeile) werden von telomerischem Heterochromatin gebildet (s. Abschnitt 3.3.3). SNuk= Sammelnukleolus. Maßstab entspricht 10 µm.

3.3.3 Telomerisches Heterochromatin (tHC)

An den Enden fast aller Polytänchromosomen ließen sich punktförmige Verdichtungen von Chromatin erkennen, die im Phasenkontrast schwarz bzw. in der DAPI-Fluoreszenz sehr hell erschienen (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9). In ihrem Vorkommen und ihrer Ausprägung entsprechen die punktförmige Verdichtungen dem von Schweizer (1976b) beschriebenen telomerischen Heterochromatin. Die einzelnen „Punkte“ des telomerischen Heterochromatin (tHC) lagen je nach Kondensationzustand des umgebenden Chromatinbereiches unterschiedlich dicht zusammen (vgl. Abbildung 9b). War das Chromatin aufgelockert, so waren die punktförmigen Strukturen des tHC einzeln erkennbar (Pfeile). Erschien das Chromatin in unmittelbarer Umgebung des tHC jedoch kondensiert, bildeten die punktförmigen Sturkturen des tHC eine dicht gepackte Anhäufung. Diese Anhäufungen konnten verschiedene Formen annehmen, wie z. B. die einer Bande in Abbildung 9b (siehe Pfeilspitze).

Bei den NO-Chromosomen mit ihrem stark aufgelockerten Chromatinanteil der NOR liegt das punktförmig tHC scheinbar „auf“ dem Nukleolus (vgl. Abbildung 9a, links). Vermutlich wird das tHC beim Dekondensieren der NOR zur Seite gedrängt und kommt nach dem Quetschen daher auf dem Nukleolus zu liegen.

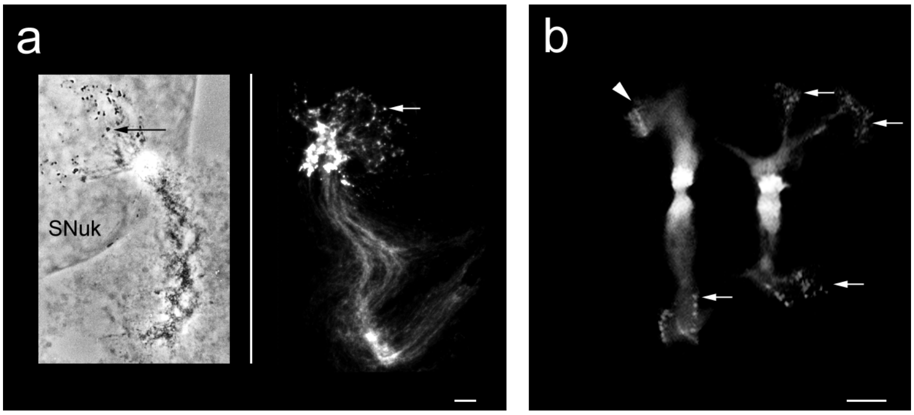


Abbildung 9: Telomerisches Heterochromatin (tHC) bei Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner. (**a**) punktförmige Strukturen des tHC (Pfeile) am Ende eines Chromosoms A im Phasenkontrast (links) und eines anderen Chromosoms A in DAPI-Fluoreszenz (rechts). Bei dem Chromosom im Phasenkontrast (links) scheint das tHC auf dem Sammelnukleolus (SNuk) zu liegen. (**b**) Je nach Auflockerungszustand des umgebenden Chromatinbereiches können die punktförmigen Verdichtungen des tHC einzeln erkennbar (Pfeile) oder aber dicht gepackt (Pfeilspitze, links oben) sein. Maßstab entspricht 10 µm.

3.3.4 Polytäne Strukturen

Bänderung

Eine Querbänderung der Polytänchromosomen war nur relativ selten an ein bis zwei Chromosomen pro Kern zu beobachten. Die Bänderung dehnte sich in der Regel nicht über die gesamte Länge aus, sondern war auf unterschiedlich große Teilbereiche beschränkt (Abbildung 10a).

Vielsträngige Längsstruktur

Der vielsträngige Aufbau von Polytänchromosomen aus zahlreichen dicht nebeneinander liegenden Chromatiden ist im allgemeinen im Lichtmikroskop aufgrund des zu geringen Auflösungsvermögens nicht direkt erkennbar. Stark aufgelockerte Euchromatinbereiche, hauptsächlich bei Chromosom A, lassen allerdings manchmal den vielsträngigen Chromatidencharakter erahnen (Abbildung 10b).

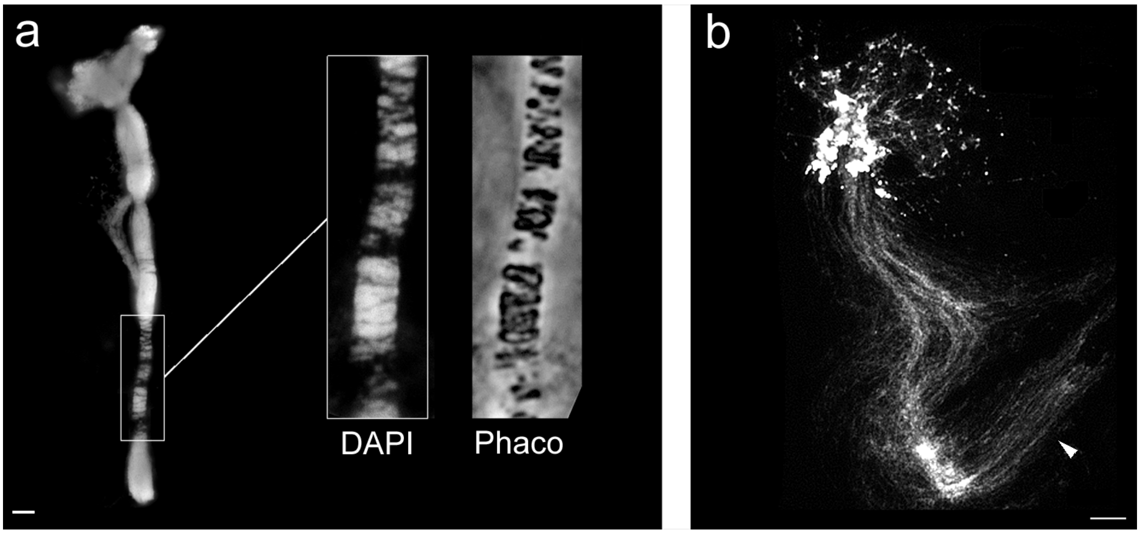


Abbildung 10: Bänderung und vielsträngige Längstruktur der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner nach Färbung mit DAPI. (**a**) Bänderung in einem Teilbereich eines Polytänchromosoms. Die Vergrößerung zeigt den Ausschnitt sowohl der DAPI-Fluoreszenz als auch im Phasenkontrast. (**b**) Stark aufgelockerte Euchromatinbereiche von Chromosom A mit einem Bereich in dem die vielsträngige Längsstruktur sichtbar wird (Pfeilspitze). Maßstab entspricht jeweils 10 µm.

3.4 Karyotypisierung

Da es sich bei der Identifizierung der Polytänchromosomen anhand der Ausprägung des cHC um eine neue Art der Klassifizierung der Polytänchromosomen handelt, werden sie im folgenden nicht wie nach Nagl (1967) mit den römischen Ziffern I-XI, sondern mit den Buchstaben A bis K bezeichnet.

3.4.1 Längenmessungen

Als Grundlage für die Beschreibung eines Karyotyps dient traditionell die Gesamtlänge der Chromosomen und das Verhältnis ihres längeren zum kürzeren Arm. Bei der Darstellung im Karyogramm und Idiogramm werden die Chromosomen entsprechend ihrer Gesamtlänge sortiert angeordnet (vom Größten zum Kleinsten) und der kürzere Arm nach oben ausgerichtet. Um auch die Polytänchromosomen nach diesem gängigen Schema darzustellen, wurden die Armlängen und die Armlängenverhältnisse ermittelt, auch wenn diese variieren können (vgl. 3.3). Zusätzlich wurden die Längen der Bereiche des cHC bestimmt, für die bisher keine Angaben vorlagen.
Die Längenmessungen wurden an Polytänchromosomen von elf Kernen nach Vorbehandlung mit RNase und Pepsin/HCl sowie anschließender Färbung mit DAPI bzw. mit DAPI/PI durchgeführt. Die dekondensierten Chromatinbereiche der NORs wurden nicht mitgemessen, da sie sich in der Regel zu einem Sammelnukleolus zusammenschließen. Extreme Werte der Armlängen, die sich anhand der morphologischen Veränderung (z.B. Verjüngung im Euchromatin) offensichtlich auf präparationsbedingte Streckung, Stauchung oder Torsion zurückführen ließen, wurden nicht berücksichtigt. Die Identifikation der Chromosomen und Arme ergab sich aus der jeweils spezifischen Ausprägung ihres cHC (vgl. Abschnitte 3.3.1 und 3.4.2).
Aus den Armlängen wurden die Gesamtlänge des Chromosoms, das Armlängenverhältnis (r), der Centromer-Index (i) und der prozentuale Anteil des jeweiligen Chromosoms, bezogen auf die haploide Komplement-Länge (HKL), errechnet (Tabelle 7). Die Position des Centromers (CP) wurde anhand des Armlängenverhältnis nach Levan et al. (1964) bestimmt:

Centromerposition (CP)	**Armlängenverhältnis**
mediane Region (m)	>1,0 bis 1,7
submedian (sm)	>1,7 bis 3
subterminal (st)	> 3,0 bis 7
terminale Region (t)	> 7 bis ∞

Ferner wurde aus den Längen des cHC auf dem jeweils kurzen bzw. langen Arm die Gesamtlänge des cHC und das Verhältnis der Längen sowie der prozentuale Anteil des cHC an der Gesamtlänge des Chromosoms, des gesamten cHC aller Chromosomen und bezogen auf die HKL ermittelt (Tabelle 8).

Demnach besteht der Karyotyp aus acht Chromosomen mit median liegendem Centromer (m) [Chromosomen C, D, E, F, G, H, I, J], einem mit subterminalen Centromer (st) [Chromosom B] und zwei mit dem Centromer in der terminalen Region (t) [Chromosomen A und K], woraus sich die Karyotypformel: 8 m + 1 st + 2 t ergibt. Die mittleren Chromosomenlängen liegen zwischen maximal 95 ± 24 µm [Chromosom A] und minimal 56 ± 12 µm [Chromosom K]. Die HKL wurde mit 828 ± 167 µm berechnet.

Unter Einbeziehung der Standardabweichung variieren die Armlängenverhältnisse der 8 Chromosomen mit median gelegenen Centromer zwischen ca. 1,0 und 1,7 (vgl. Tabelle 7). Dies bedeutet, daß die beiden Arme dieser Chromosomen mehr oder weniger gleich lang sind. Bei solchen Chromosomen kann daher eine ungleichmäßige, präparationsbedingte Streckung leicht zu einer Umkehr des Armlängenverhältnisses führen.

Die Auswertung der Längenmessungen der Bereiche cHC weist den größten mit einer Länge von 25 ± 6 µm [auf den Chromosom C] und den kleinsten cHC-Bereich mit einer Länge von 3 ± 1 µm [auf Chromosom A] aus. Die Summe der cHC-Längen aller elf Chromosomenpaare liegt bei 183 ± 35 µm. Damit beträgt der Anteil der Summe aller cHC-Bereiche an der HKL 22,1 %.

Tabelle 7: Morphometrische Daten des Karyotyps der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner. Die Meßwerte der Armlängen sind als Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) angegeben. Daraus wurden errechnet: das Armlängenverhältnis (r = q/p), der Centromerindex (i = [(100 * p)/(p+q)]) und der Anteil der Chromosomenlänge an der haploiden Komplementlänge (HKL). CP = Position des Centromers: t = terminale Region, st = subterminale Region, m = mediane Region.

	Armlängen kurzer Arm (p)	langer Arm (q)	Gesamt-Länge	Armlängen-verhältnis	Centromer-Index	Proz. HKL	CP	n
Chr.	$\bar{x}$ ± s [µm]	$\bar{x}$ ± s [µm]	$\bar{x}$ ± s [µm]	r q/p	i [µm]	[µm]		
A	5,8 ± 1,4	89,2 ± 22,7	94,6 ± 23,9	16,64 ± 2,77	5,8 ± 1,1	11,4	t	8
B	18,7 ± 2,9	72,1 ± 11,1	90,9 ± 13,5	3,87 ± 0,37	20,6 ± 1,7	11,0	st	7
C	38,1 ± 8,2	46,4 ± 12,0	84,6 ± 18,8	1,22 ± 0,22	45,5 ± 4,4	10,2	m	7
D	35,5 ± 11,2	42,5 ± 11,2	78,0 ± 21,4	1,21 ± 0,18	45,4 ± 3,8	9,4	m	5
E	32,3 ± 6,4	44,4 ± 9,6	76,8 ± 14,5	1,40 ± 0,26	42,2 ± 4,9	9,3	m	9
F	31,8 ± 2,9	41,8 ± 8,3	73,5 ± 7,7	1,33 ± 0,30	43,6 ± 6,4	8,9	m	5
G	31,0 ± 8,9	40,5 ± 8,4	71,5 ± 15,9	1,36 ± 0,33	43,0 ± 5,8	8,6	m	6
H	27,9 ± 5,9	42,0 ± 7,0	70,4 ± 12,9	1,54 ± 0,15	39,4 ± 2,3	8,5	m	8
I	29,3 ± 6,4	37,1 ± 9,2	66,4 ± 15,0	1,27 ± 0,19	44,3 ± 3,7	8,0	m	7
J	30,1 ± 3,1	35,4 ± 4,7	65,6 ± 7,3	1,18 ± 0,11	46,0 ± 2,2	7,9	m	7
K	5,4 ± 1,8	51,4 ± 14,6	55,8 ± 16,2	10,68 ± 3,56	9,4 ± 3,5	6,7	t	5
HKL	-	-	828 ± 167,1	-	-	100,0		

Tabelle 8: Morphometrische Daten des centromernahen Heterochromatins (cHC) der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner. Die Meßwerte des cHC auf dem kurzen bzw. auf dem langen Arm sind als Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (s) angegeben. Daraus wurden errechnet: das Verhältnis des cHC (cHC Verh. = [cHC auf langem Arm]/[cHC auf kurzen Arm), der prozentuale Anteil des cHC bezogen auf die Gesamtlänge des Chromosoms (a), auf die Summe aller cHC-Bereiche (b) und auf die haploide Komplementlänge (c).

	cHC auf kurzem Arm	cHC auf langem Arm	cHC Gesamt	cHC Verh.	a	b	c	n
Chr.	$\bar{x} \pm s$ [µm]	$\bar{x} \pm s$ [µm]	$\bar{x} \pm s$ [µm]		[%]	[%	[%]	
A	2,6 ± 0,7	-	2,6 ± 0,7	-	2,7	1,4	0,3	9
B	-	11,6 ± 1,4	11,6 ± 1,4	-	12,8	6,3	1,4	11
C	8,6 ± 2,1	16,3 ± 4,3	24,9 ± 6,2	1,89 ± 0,26	29,4	13,6	3,0	8
D	4,7 ± 1,5	6,8 ± 2,2	11,5 ± 3,7	1,46 ± 0,16	14,7	6,3	1,4	6
E	15,6 ± 1,7	7,5 ± 1,8	23,1 ± 2,7	0,48 ± 0,11	30,1	12,6	2,8	8
F	5,6 ± 2,1	9,0 ± 2,5	14,6 ± 4,3	1,65 ± 0,30	19,9	8,0	1,8	8
G	7,2 ± 0,8	12,7 ± 2,5	19,7 ± 2,3	1,84 ± 0,58	27,6	10,8	2,4	5
H	5,6 ± 1,1	15,9 ± 2,4	21,5 ± 3,2	2,89 ± 0,43	30,5	11,8	2,6	5
I	7,2 ± 0,8	8,0 ± 0,9	15,2 ± 1,6	1,11 ± 0,09	22,9	8,3	1,9	10
J	11,4 ± 2,1	7,8 ± 2,0	19,0 ± 3,7	0,71 ± 0,16	29,0	10,4	2,3	11
K	-	19,0 ± 4,9	19,0 ± 4,9	-	-	10,4	2,3	9
Ges.	-	-	182,7 ± 34,7	-	-	100,0	22,1	-

3.4.2 Chromosomenbeschreibungen

Als entscheidendes Merkmal zur individuellen Identifizierung der Polytänchromosomen wurde die Ausprägung ihres centromernahen Heterochromatins (cHC) herangezogen (vgl. Abschnitt 3.3.1). Weitere Strukturen, wie eine NOR, telomerisches Heterochromatin oder sekundäre Einschnürungen im Euchromatin stellten ergänzende Merkmale dar. Die Länge der Arme (Abschnitt 3.4.1) spielte für die Identifikation keine Rolle. Bezüglich der Armlängen der Chromosomen mit medianem Centromer muß berücksichtigt werden, daß sich die Längenverhältnisse der Arme im Einzelfall durch präparationsbedingte Streckung umkehren kann.

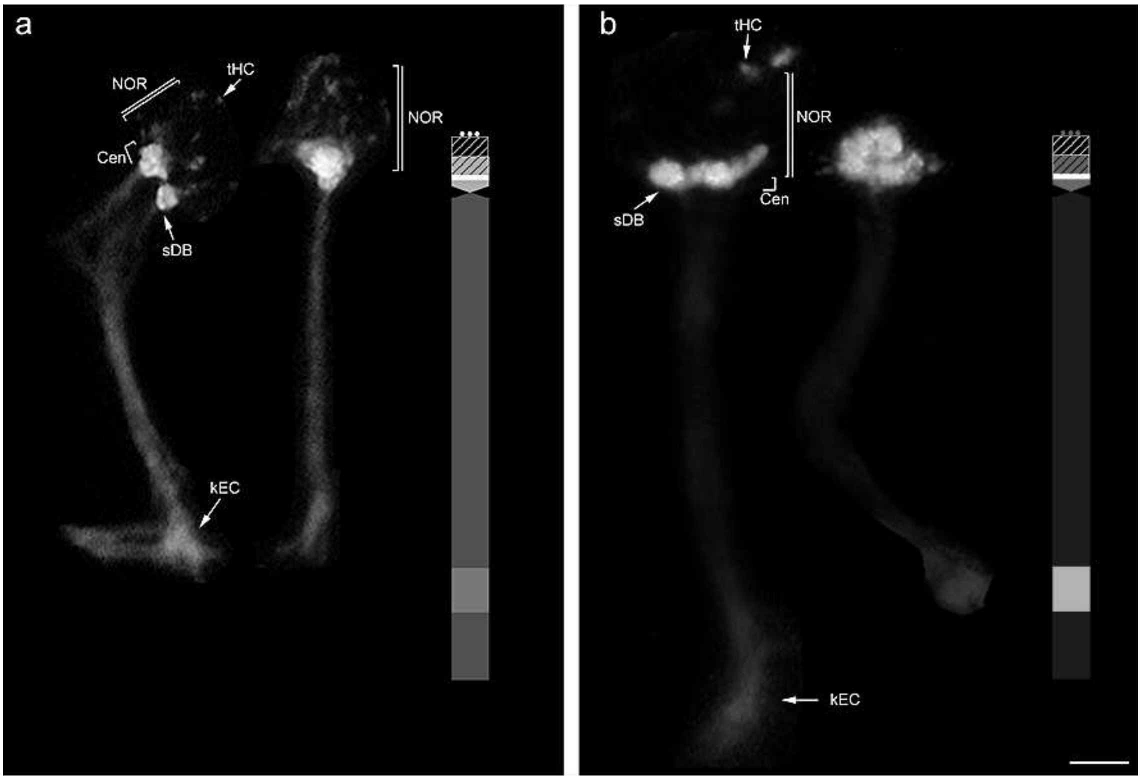
Zur Beschreibung jedes einzelnen Polytänchromosoms werden in den folgenden Abbildungen jeweils in der linken Bildhälfte zwei repräsentative DAPI- (a) sowie zwei DAPI/PI-gefärbte Chromosomen (b) gezeigt. Darin sind die Bereiche des cHC auf einer Seite des Chromosoms mit einer Klammer eingefaßt und die Position des Centromers durch eine längere Linie gekennzeichnet. Die Bereiche der NOR sind durch eine Klammer mit einer Doppellinie markiert.

Wesentliche Merkmale des cHC und anderer Bereiche sind bezeichnet. In der rechten Bildhälfte sind die charakteristischen Merkmale schematisch zusammengefaßt. Für die schematische Präsentation der charakteristischen Merkmale wurde folgende Darstellung gewählt:

- Chromatin nach Färbung mit DAPI (Abbildung a): Die Helligkeit der DAPI-Fluoreszenz im cHC ist durch entsprechende Graustufen und die des Euchromatin-Bereiches in dunklem Grau dargestellt. Die stark fluoreszierenden DAPI-Banden (sDB) sind weiß gelassen.
- Chromatin nach Färbung mit DAPI/PI (Abbildung b): wie im mikroskopischen Bild, sind das cHC und telomerische Heterochromatin (tHC) in rosa, euchromatische Bereiche in dunkelblau und die starken DAPI-Banden entsprechend ihrer Intensität in hellgrau bzw. weiß gehalten.
- Sekundäre Einschnürungen (sES) sind durch eine beidseitige Einkerbung wiedergegeben.
- Nicht regelmäßig erkennbare Strukturen sind in eckige Klammern gesetzt bzw. im Falle der Centromere, mit waagerechten Linien gestrichelt.
- Punktförmige Verdichtungen des tHC sind durch drei große Punkte symbolisiert.
- Die NOR ist diagonal schraffiert und zusätzlich in eine schwarze und eine weiße Hälfte unterteilt. Damit soll darauf hingewiesen werden, daß oftmals ein Teil der NOR kondensiert und der andere gleichzeitig dekondensiert ist.

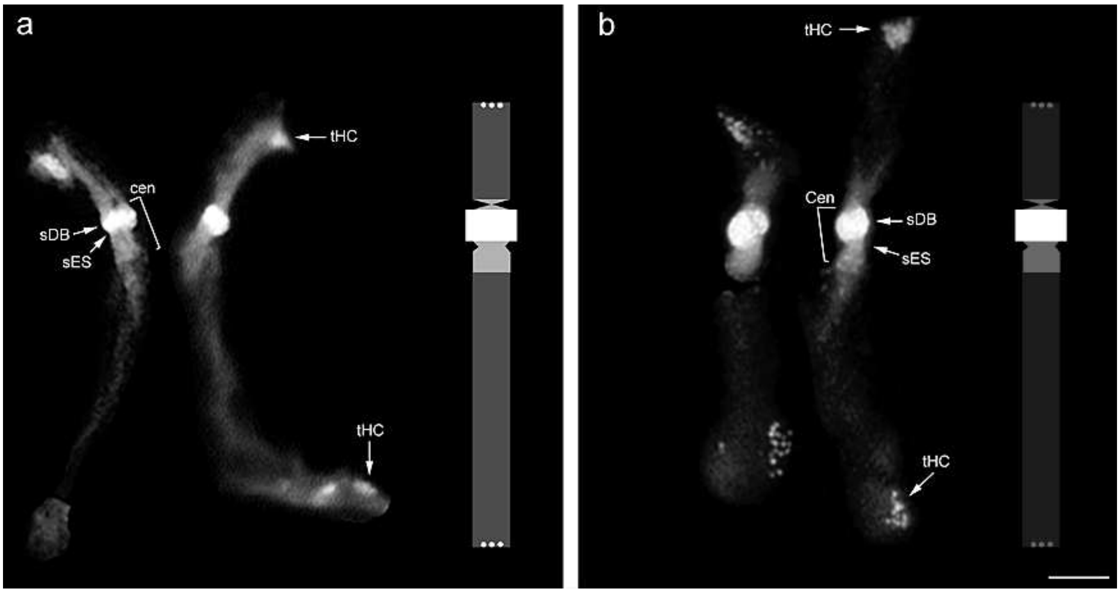
Der angegebene Maßstab entspricht in allen Abbildungen 10 µm.

3.4.2.1 Chromosom A



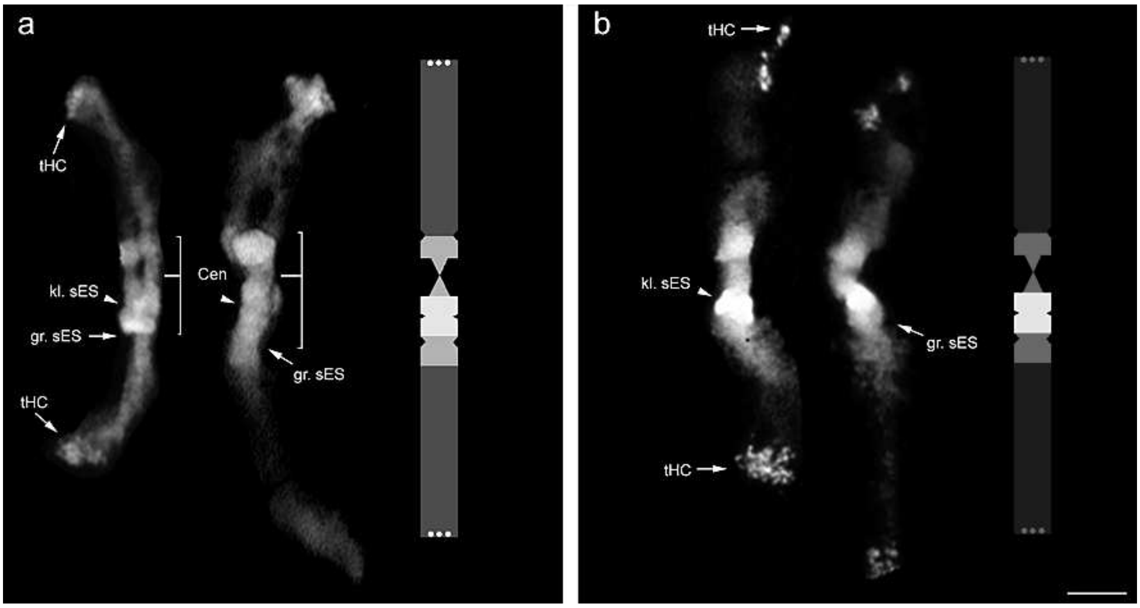
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) befindet sich in der terminalen Region und ist in der Darstellung unterhalb des cHC-Blocks zu erkennen. Nur der kurze Arm trägt einen Block von cHC, der zudem im Vergleich zu dem anderer Chromosomen verhältnismäßig klein ist. Außerdem zeigt es eine sehr schmale starke DAPI-Bande (sDB).
Euchromatin	Der gesamte lange Arm besteht aus Euchromatin. Subtelomer auf dem langen Arm liegt ein kleiner Bereich von stärker kondensiertem Euchromatin (kEC), der immer eine stärkere DAPI-Fluoreszenz aufweist als das ihn umgebende aufgelockerte Euchromatin. Der Bereich wird nicht als heterochromatin angesehen, da seine DAPI-Fluoreszenz immer geringer zu schein scheint als die des cHC.
NOR	Die NOR befindet sich terminal auf dem kurzen Arm.
Telomerisches Heterochromatin	Punktförmige Verdichtungen des tHC kommen nur am kurzen Arm vor (vgl. Abschnitt 3.3.3).

3.4.2.2 Chromosom B



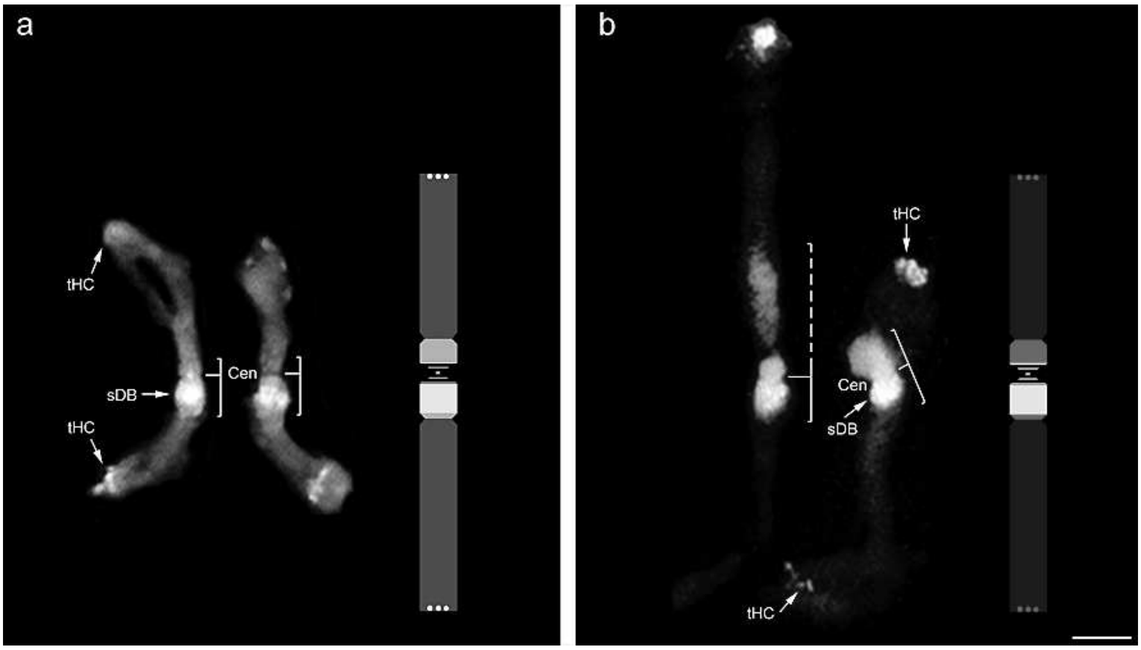
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) liegt subterminal. Die Abbildungen a und b zeigen das Centromer oberhalb des cHC-Blocks. Im Gegensatz zu Chromosom A kommt das cHC bei Chromosom B nur auf dem langen Arm vor. Es gliedert sich in zwei Teile, von denen der proximale sehr markant ist. Er scheint immer über die sonstige Breite des Chromosom hinauszuragen und wird von einer breiten und stark fluoreszierenden DAPI-Bande (sDB) ausgefüllt. Durch eine sekundäre Einschnürung (sES) getrennt, folgt distal der zweite Teil des cHC.
Euchromatin	Die euchromatischen Bereiche der beiden Chromosomenarme sind, wie auch die der anderen Chromosomen, häufig präparationsbedingt gedehnt und gekrümmt.
Telomerisches Heterochromatin	Punktförmige Verdichtungen des tHC finden sich an beiden Chromosomenenden.

3.4.2.3 Chromosom C



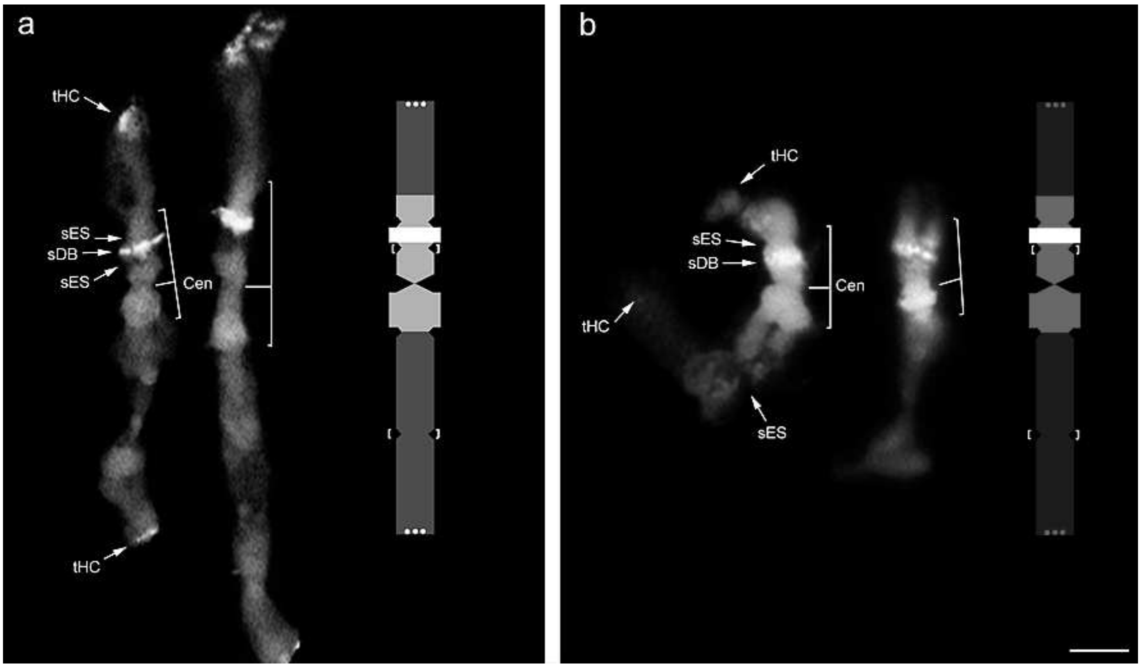
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) in der medianen Region ist immer deutlich größer als die der anderen Chromosomen. Auf dem kurzen Arm - der hier und bei den folgenden Chromosomen nach oben ausgerichtet ist - befindet sich der kleinere Teil des cHC. Der größere Teil des cHC auf dem langen Arm läßt sich in zwei Zonen einteilen. Die proximale Zone zeigt in der Mitte eine kleine sekundäre Einschnürung (kl. sES) und weist in den meisten Fällen eine starke DAPI-Fluoreszenz (sDB) auf. Ihre Intensität ist aber im Vergleich zu der von starken DAPI-Banden anderer Chromosomen geringer. Sie ist daher im Schema nicht weiß sondern hellgrau dargestellt. Distal liegt eine etwas größere sekundäre Einschnürung (gr. sES) an die sich die zweite, kleinere Zone des cHC im langen Arm anschließt.
Euchromatin	Gelegentlich lassen sich in den euchromatischen Bereichen Andeutungen einer Strukturierung beobachten.
Telomerisches Heterochromatin	Beide Chromosomenenden weisen tHC auf.

3.4.2.4 Chromosom D



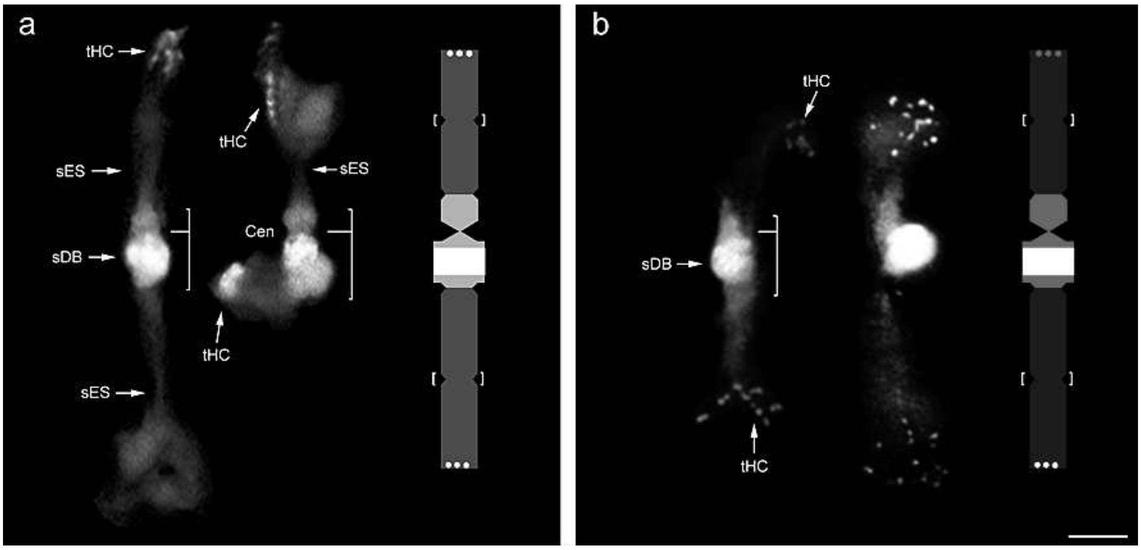
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerischen Einschnürung (Cen) liegt in der medianen Region des Chromosoms. Der Teil des cHC auf dem kurzen Arm ist kleiner als der Teil des cHC auf dem unteren Arm. Der cHC-Bereich auf dem langen Arm ist durch eine starke DAPI-Bande (sDB) gekennzeichnet.
Euchromatin	Keine besonderen Merkmale
Telomerisches Heterochromatin	THC tritt an den Enden beider Arme auf.
Bemerkung	Die Ausprägung des cHC von Chromosom D ähnelt der von Chromosom F. Allerdings ist das cHC im langen Arm von Chromosom D kleiner als das von Chromosom F und es ragt auch nicht wesentlich über die sonstige Breite des Chromosom hinaus (vgl. Abb. bei Chromosom F).

3.4.2.5 Chromosom E



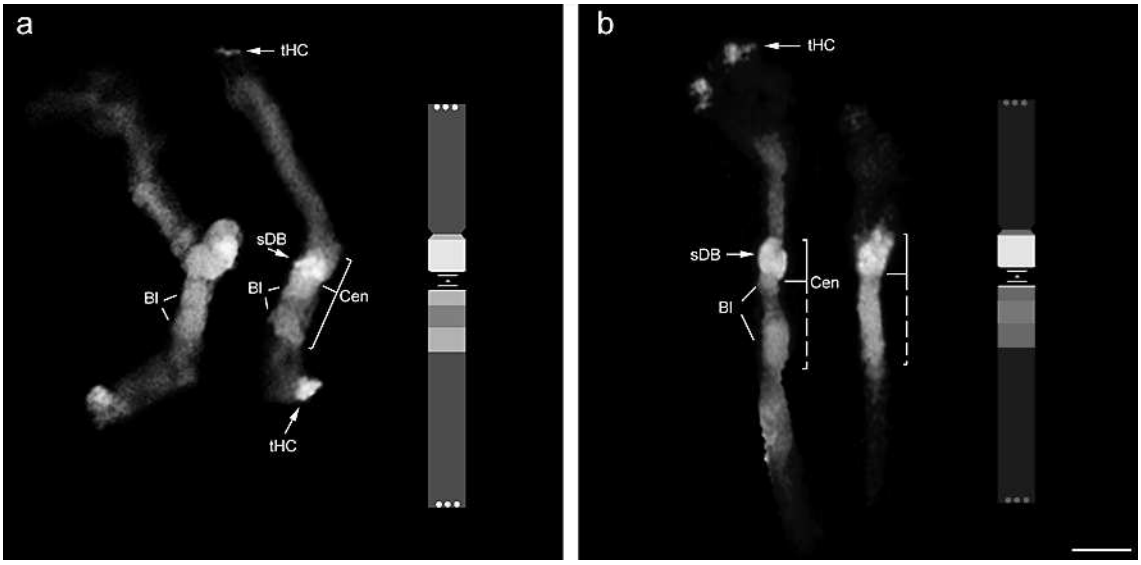
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) liegt in der medianen Region. Der größere Teil des cHC liegt auf dem kurzen Arm. Besonders auffällig ist eine schmale starke DAPI-Bande (sDB), die oftmals beidseitig über die sonstige Breite des Chromosoms hinausragt. Proximal und distal dieser DAPI-Bande liegt jeweils eine sekundäre Einschnürung (sES), von denen meistens nur die distal gelegene regelmäßig erkennbar ist. Der cHC-Block im langen Arm ist kleiner und erscheint in der Regel etwas breiter als das sonstige Chromosom.
Euchromatin	Im euchromatischen Teil des langen Arms läßt unregelmäßig eine sekundäre Einschnürung (sES) beobachten.
Telomerisches Heterochromatin	THC ist an beiden Enden des Chromosoms erkennbar (in Abb. b allerdings sehr schwach).

3.4.2.6 Chromosom F



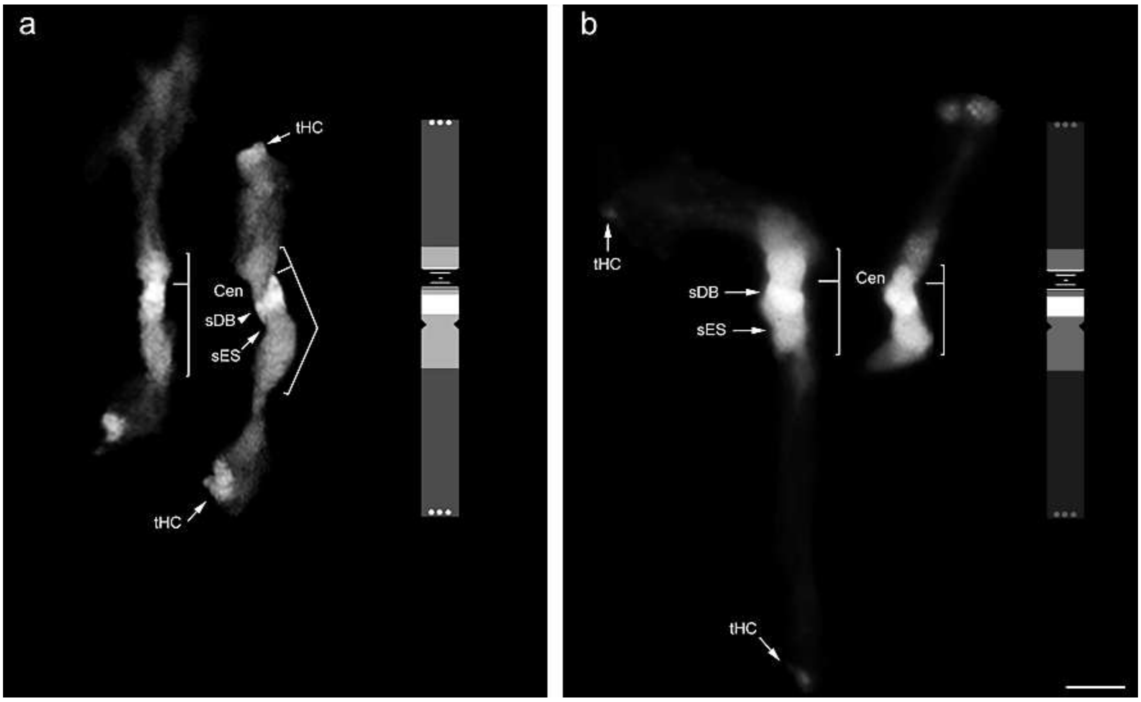
Centromerisches Heterochromatin	Die Position der centromerischen Einschnürung (Cen) ist median. Das kleine cHC-Bereich im kurzen Arm nimmt immer in etwa die Breite des Chromosoms ein. Der größere cHC-Bereich im langen Arm hingegen ist breiter als die übrigen Abschnitte des Chromosoms. Außerdem zeigt dieser cHC-Teil eine starke DAPI-Bande (sDB).
Euchromatin	Die euchromatischen Bereiche beider Chromosomenarme zeigen je eine unregelmäßig auftretende sekundäre Einschnürung (sES).
Telomerisches Heterochromatin	THC kommt an den beiden Enden des Chromosoms vor.

3.4.2.7 Chromosom G



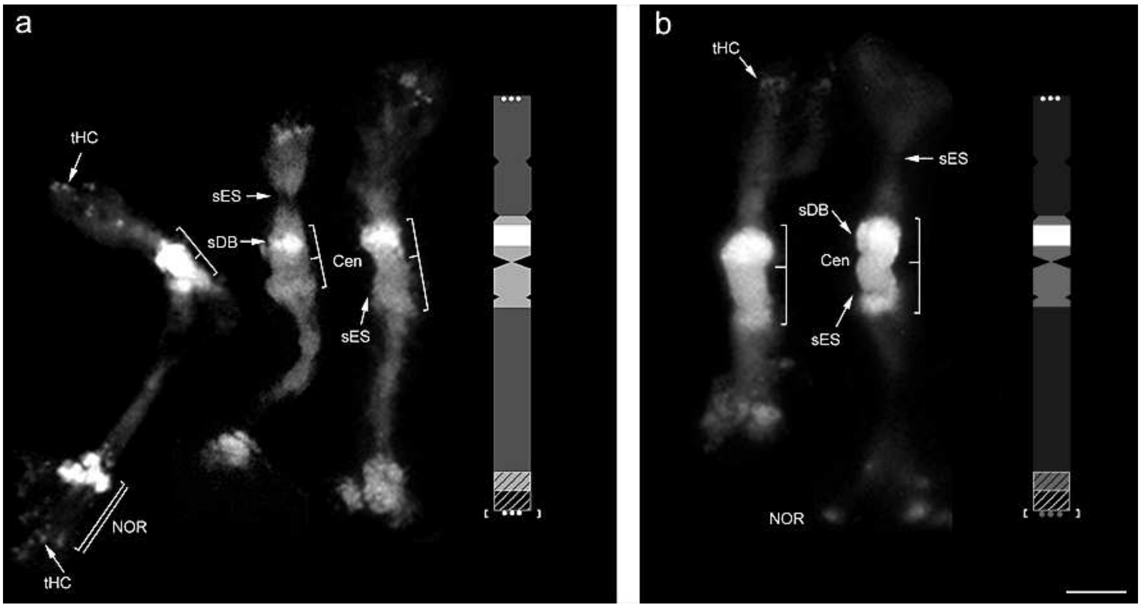
Centromerisches Heterochromatin	Die median liegende centromerische Einschnürung (Cen) läßt sich nur bei gestreckten Chromosomen deutlich erkennen (vgl. Abbildung b). Der kleinere Teil des cHC im kurzen Arm fällt durch seine starke DAPI-Bande (sDB) auf. Der größere cHC-Teil auf dem unteren Arm ist durch zwei Blöcke (Bl) gekennzeichnet, zwischen denen ein schwächer fluoreszierender Bereich liegt. Die Größe der beiden Blöcke kann je nach Streckung variieren (vgl. in Abbildung a und b).
Euchromatin	Keine besonderen Merkmale
Telomerisches Heterochromatin	THC ist an beiden Chromosomenenden erkennbar (in Abbildung b nur z.T. sichtbar).

3.4.2.8 Chromosom H



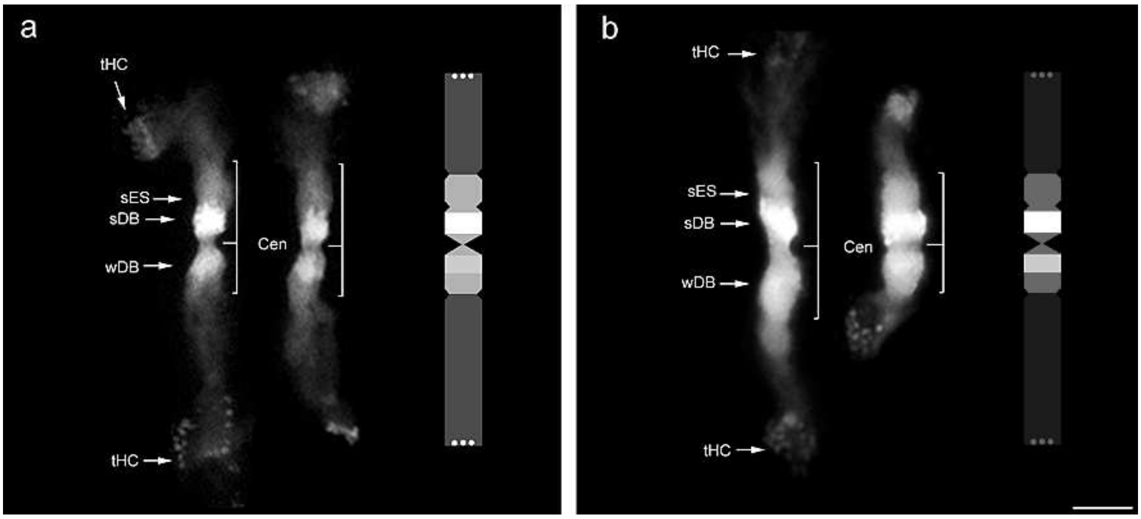
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) liegt in der medianen Region des Chromosoms und ist nicht immer deutlich ausgeprägt. Der kurze Arm trägt den kleineren Teil des cHC. Auf dem langen Arm liegt der größere Teil des cHC, in dessen proximalem Teil eine starke DAPI-Bande (sDB) auffällt. Durch eine sekundäre Einschnürung (sES) getrennt, schließt sich distal ein weniger stark anfärbbarer Teil des cHC an.
Euchromatin	Keine besonderen Merkmale (beim rechten Chromosom in Abbildung b ist der euchromatische Teil des langen Armes abgerissen)
Telomerisches Heterochromatin	THC kommt an beiden Chromosomenenden vor.

3.4.2.9 Chromosom I



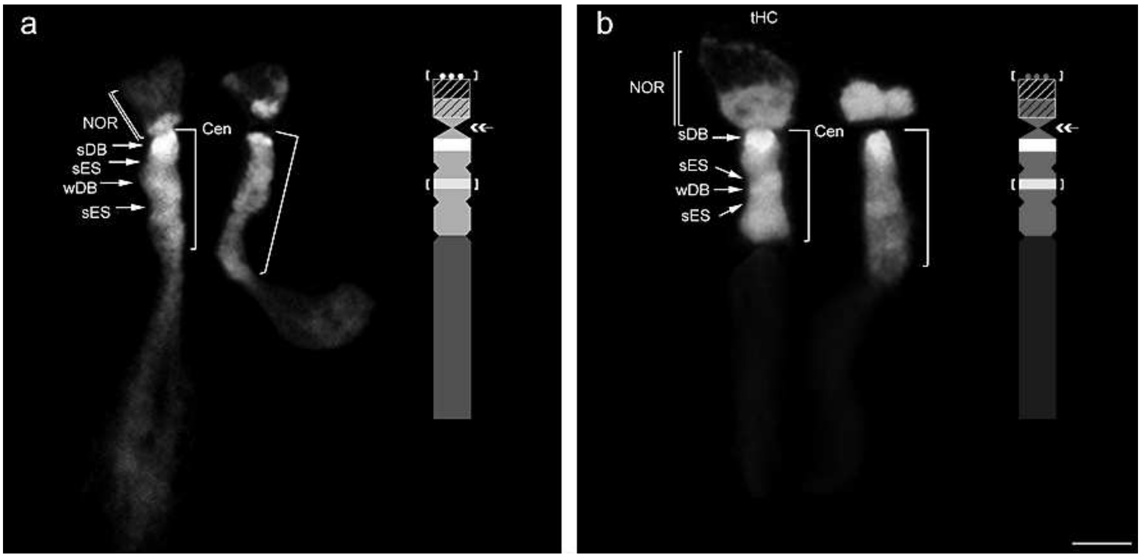
Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) befindet sich in der medianen Region. Charakteristisch für das cHC auf dem kurzen Arms ist die breite und starke DAPI-Bande (sDB). Das cHC im langen Arm zeigt distal eine sekundäre Einschnürung (sES).
Euchromatin	Der euchromatische Bereich im kurzen Arm zeigt in der Regel eine sekundäre Einschnürung (sES).
Telomerisches Heterochromatin	THC ist zwar an beiden Enden vorhanden, aber am langen Arm läßt es sich nur bei stark gestreckten Chromosomen beobachten (vgl. Abbildung a, am Chromosom ganz links, unten)
NOR	Die NOR liegt terminal auf dem langen Arm. Ein Teil des nukleolären Chromatins bleibt in der Regel kondensiert (wie auch bei Chromosom A und K) und erweckt daher den Eindruck, als handle es sich um Heterochromatin (vgl. Diskussion)

3.4.2.10 Chromosom J



Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) liegt median und ist im Vergleich zu der aller anderen Chromosomen außer Chromosom K außergewöhnlich deutlich ausgeprägt. Das Centromer gliedert das cHC in zwei fast gleich große und symmetrische Teile. Dieser Eindruck wird dadurch unterstützt, daß die cHC-Bereiche auf dem kurzen und langen Arm proximal jeweils eine deutlich erkennbare DAPI-Bande tragen. Dennoch weisen die beiden cHC-Teile Unterschiede auf. Der Teil des cHC auf dem kurzen Arm weist die stärke DAPI-Bande (sDB) und distal von dieser eine kleine sekundäre Einschnürung (sES) auf. Der cHC-Teil auf dem langen Arm hingegen ist kleiner und die Fluoreszenzintensität seiner DAPI-Bande (wDB) erscheint schwächer.
Euchromatin	Keine Besonderheiten.
Telomerisches Heterochromatin	Das tHC an beiden Enden ist immer erkennbar.
Bemerkung	Abbildung b verdeutlicht den präparativ bedingten unterschiedlichen Streckungsgrad der euchromatischen Bereiche der Arme, während die Ausprägung der cHC-Bereiche mehr oder weniger unverändert ist.

3.4.2.11 Chromosom K



Centromerisches Heterochromatin	Die centromerische Einschnürung (Cen) liegt in der terminalen Region, ist immer gut erkennbar, aber auch äußerst fragil (s.Bemerkung). Der kurze Arm wird nahezu vollständig von der NOR ausgefüllt. Das cHC auf dem langen Arm gliedert sich in drei Abschnitte. Der erste proximale Abschnitt zeigt eine schmale starke DAPI-Bande (sDB), an die sich eine sekundäre Einschnürung (sES) anschließt. Darauf folgt das zweite Segment, in dem manchmal eine weitere, aber deutlich schwächere DAPI-Bande (wDB) zu erkennen ist. Daran schließt sich distal wiederum eine sekundäre Einschnürung (sES) und der dritte Abschnitt an, der etwas weniger stark gefärbt erscheint.
Euchromatin	Keine besonderen Merkmale.
Telomerisches Heterochromatin	THC läßt sich nur am Ende des kurzen Armes beobachten und auch nur bei gedehnter NOR (vgl. Abbildung b).
NOR	Die NOR befindet sich auf dem kurzen Arm.
Bemerkung	Wird ein Chromosom K, das an einem Sammelnukleolus hängt, bei der Präparation stark gequetscht, reißt es sehr häufig am Centromer auseinander. Der kurze Arm bliebt dann mit Sammelnukleolus verbunden, während der lange Arm in deutlichem Abstand vom Nukleolus zu liegen kommt (fragile Centromerregion) (vgl. Abbildung 7).

3.4.3 Karyogramm und Idiogramm

Die Karyogramme in Abbildung 11 zeigen jeweils ein vollständiges Komplement der 22 Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner nach DAPI- bzw. nach DAPI/PI-Färbung. Dazu wurden solche Chromosomen ausgewählt, an denen die spezifische Ausprägung des centromernahen Heterochromatins (cHC) und andere Merkmale (vgl. Abschnitt 3.4.1) am deutlichsten zu erkennen sind. Die Reihenfolge, in der die Chromosomen angeordnet sind, folgt der *gemittelten Gesamtlänge* (vgl.Tabelle 7), und der kurze Arm ist jeweils nach oben ausgerichtet. Die Gesamtlänge der dargestellten Chromosomen kann im Einzelfall aufgrund der erheblichen Variationsbreite vom rechnerischen Mittelwert abweichen. Erste Priorität in dem dargestellten Karyogramm haben die zur Identifizierung wichtigen chromosomenspezifischen charakteristischen Merkmale, insbesondere die des cHC.

Der schematischen Darstellung des Karyotyps als Idiogramm in Abbildung 12 liegen sowohl die Längenmessungen der Arme und des cHC (Tabelle 7 und Tabelle 8) als auch die chromosomenspezifischen Merkmale (vgl. Abschnitt 3.4.1) zugrunde. Die Zonen, in denen diese Merkmale liegen, sind im Idiogramm gekennzeichnet und numeriert. Die Einteilung in Regionen sowie die Numerierung erfolgte wie die der Bänderungsmuster bei Humanchromosomen gemäß dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995). Auch die Kurzbezeichnung des kurzen Arms mit „p“ und des langen Arms mit „q“ wurde von dieser Nomenklatur übernommen.

Für die im nächsten Textabschnitt folgende Lagebeschreibung der Signale der FISH mußten einige Chromosomenabschnitte künstlich weiter werden, auch ohne daß eine Helligkeits-, Farb- oder Strukturdifferenzierung vorlag. Diese zusätzliche Untergliederung wird durch einen Punkt und eine „gestrichene“ Zahl (1', 2' oder 3') nach der Positionsnummer gekennzeichnet. Dabei steht „1’“ für das proximale, „2’“ für das zentrale und „3’“ für das distale Segment. So beschreibt beispielsweise Aq11.2’ das zentrale Segment des Abschnitts Aq11.

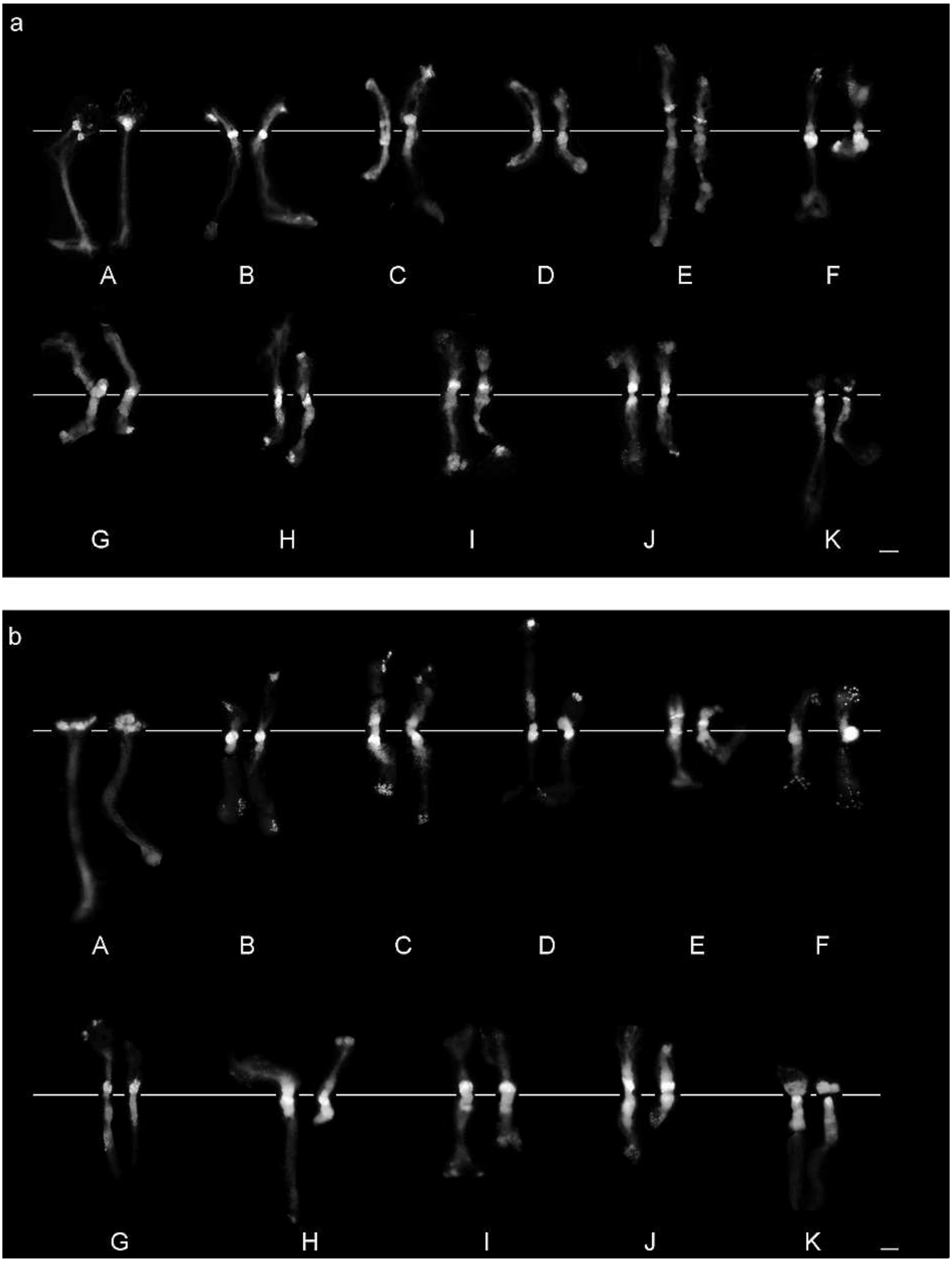


Abbildung 11: Karyogramm der 22 Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner nach Fluorochrom-Bänderung mit (**a**) DAPI bzw. mit (**b**) einem Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid. Maßstab entspricht 10 µm.

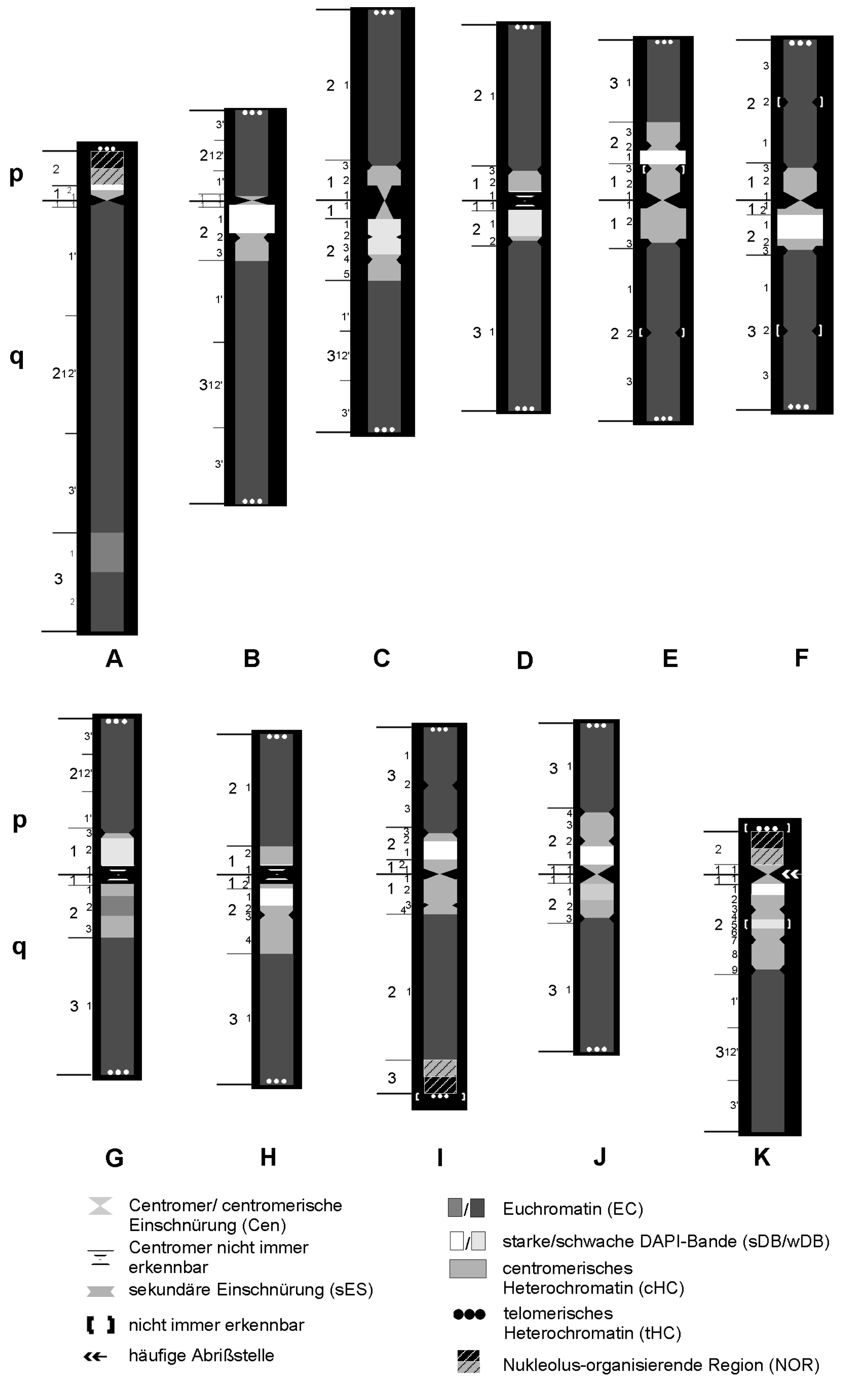


Abbildung 12: Idiogramm der DAPI-gefärbten Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner.

3.5 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Auswirkung der stärkeren Protease-Vorbehandlung für die Signale

Bereits in den früheren Arbeiten (Nenno 1992; Nenno et al. 1994) hat sich die Vorbehandlung der Präparate mit Pepsin als geeignet erwiesen, um das Chromatin für die FISH zugänglicher zu machen und die störenden Cyto- und Nukleoplasmareste (damals wurden ganze Zellen gequetscht) zu verringern.
In der vorliegenden Arbeit wurde die HCl-Konzentration von ursprünglich 0,02 M auf 0,05 M erhöht. Dadurch wurde das Chromatin noch zugänglicher, vor allem aber ließen sich die Reste des Nukleoplasma der gequetschten Kerne weitestgehend auflösen.
Alternativ zur Vorbehandlung mit Pepsin führte auch eine 15minütige Vorbehandlung mit einer Proteinase K (100 µg/ml) zu einer besseren Zugänglichkeit bei der FISH. Im Gegensatz zu Pepsin verblieben nach der Behandlung mit Proteinase K jedoch noch relativ viele Nukleoplasmareste auf dem Präparat.

Allgemeines zur Ausprägung und Stärke der Signale

Bei den Polytänchromosomen hängt die Ausprägung der Hybridisierungs-Signale neben der Signalstärke (=Menge an Signalpunkten) vor allem vom Kondensationszustand des Chromatins ab. So erscheinen Signale im Heterochromatin als Cluster oder Bande, weil das Chromatin dort kondensiert vorliegt. Signale im Euchromatin hingegen erwecken aufgrund des dekondensierten Zustands des Chromatins eher den Eindruck einer „Punktewolke“.

3.5.1 Loci der klonierten DNA-Sequenzen

Die Gene der 5S, der 18S-25S ribosomalen RNAs (rDNA) sowie des Hauptspeicherproteins Phaseolin wurden bereits in früheren Arbeiten mittels radioaktiver (Avanzi et al. 1972; Durante et al. 1987; Schumann et al. 1990) und, mit Ausnahme der 5S rDNA, auch mittels nicht-radioaktiver *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen (Nenno et al. 1994). Um ihre Loci entsprechend dem neu erstellten Idiogramm zu kartieren, wurden sie nochmals in die Untersuchung mit einbezogen.

Ribosomale 18S-25S RNA Gene

Die Signale der 18S-25S rDNA-Sonde fanden sich immer in den endständigen Nukleolus-organisierenden Regionen (NORs) der kurzen Arme von Chromosom A und K sowie dem langen Arm von Chromosom I (Abbildung 13a). Die drei Loci der 18S-25S rDNA liegen damit in den Abschnitten Ap2, Iq3 und Kp2.

Ribosomale 5S RNA Gene

Die 5S rDNA-Sonde zeigte im cHC der beiden NO-Chromosomen I und K jeweils ein Signal. Auf Chromosom I liegt der 5S rDNA-Locus im distalen Teil des cHC des langen Arms, an Position Iq12. Der zweite 5S rDNA-Locus befindet sich auf Chromosom K etwa in der Mitte des cHC des langen Armes an der Stelle wo die schwächere DAPI-Bande liegt. Diese Position wird mit Kq25 angegeben. Die Doppelhybridisierung mit der 18S-25S rDNA- und der 5S rDNA-Sonde bestätigten die Loci der beiden rDNA-Typen auf den Chromosomen I und K (Abbildung 13b).

Phaseolin

Das Signal der Phaseolin-Gen-Sonde lag auf Chromosom G immer subterminal auf dem kurzen Arm an Position Gp21.3’ (Abbildung 13c).

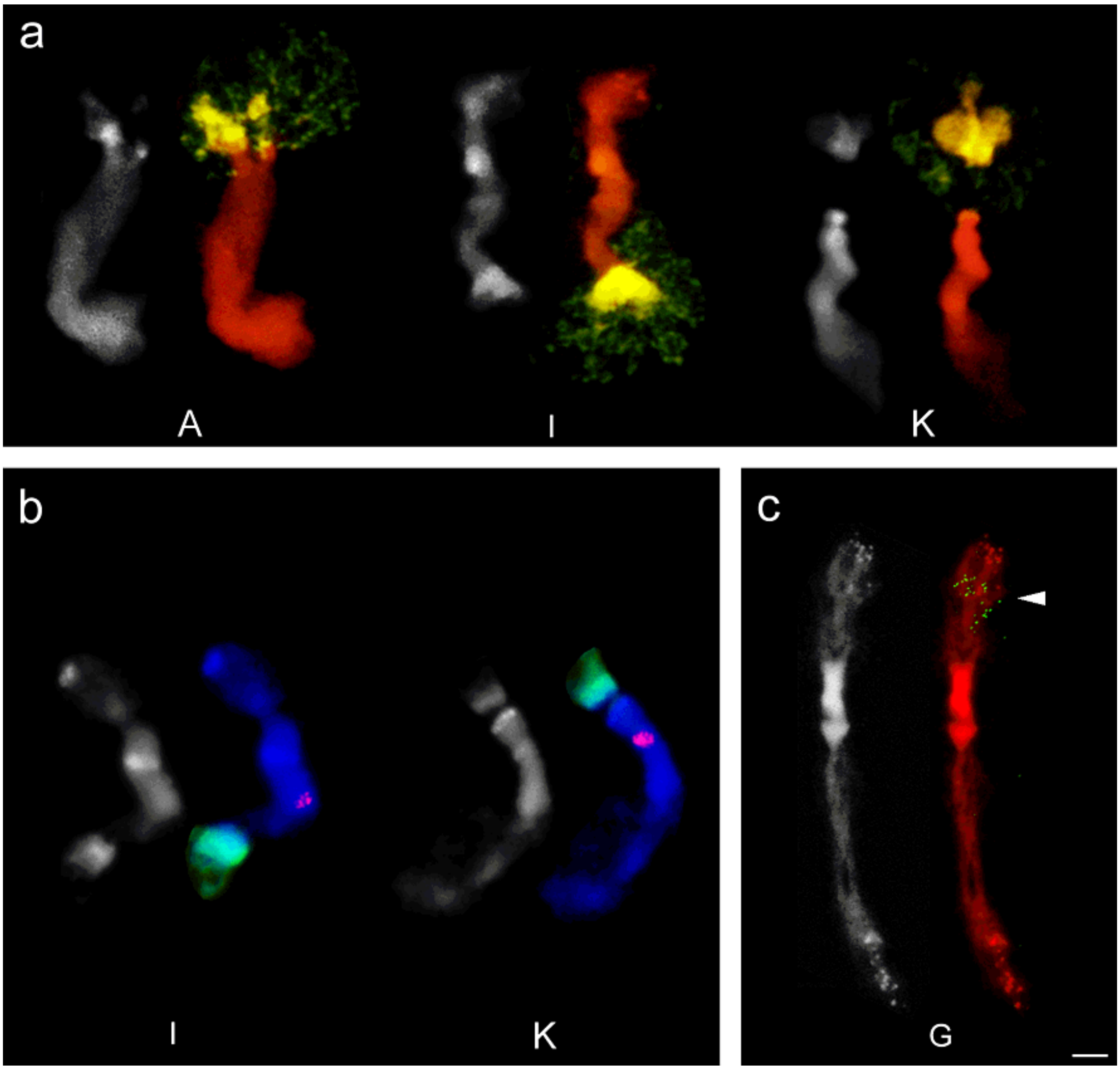


Abbildung 13: FISH-Signale von Sonden der klonierten DNA-Sequenzen für die mittelrepetitiven Gene der ribosomalen 18S-25S bzw. 5S RNA Gene, sowie für die *low-copy* Gene des Hauptspeicherproteins Phaseolin auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*. (**a**) Signale der Sonde für die ribosomalen 18S-25S rDNA (in Gelb/Grün) in den aufgelockerten NORs der Chromosomen A, I und K (links in Grau, rechts in Rot). (**b**) Kolokalisation der 182-25S rDNA (in Grün) sowie der 5S rDNA (in Rot) auf den beiden NO-Chromosomen I und K (jeweils links in Grau, rechts in Blau). (**c**) Signal (Pfeilspitze) der Sonde für Phaseolin-Gene auf Chromosom G. Das hier gezeigte Chromosom G ist sehr stark gedehnt. Maßstab entspricht 10 µm.

3.5.2 Loci der Mikrosatelliten

Die Signalstärke der Mikrosatelliten-Loci war zum Teil sehr unterschiedlich. Sie reichte von Ansammlungen aus nur wenigen Signalpunkten bis zu Anhäufungen, die einen Teil des centromerischen Heterochromatins auszufüllen schienen. Allgemein konnte man beobachten, daß ihr Auftreten um so unregelmäßiger war je schwächer die Signale waren. Es wurden daher nur Loci eines Mikrosatelliten-Motivs berücksichtigt, die sich regelmäßig nachweisen ließen. Für die Detektion der Mikrosatelliten-Loci wurde das Digoxigenin-Biotin-Amplifikations-System mit zwei bis drei Lagen Fluorochrom-gekoppeltem Avidin-FITC verwendet.

3.5.2.1 Hybridisierungssignale der Dinukleotid-Motive

$(AT)_8$

Das Motiv $(AT)_8$ hybridisierte auf den Chromosomen A, B und H an insgesamt fünf Loci (Abbildung 14a). Auf Chromosom A kamen zwei Loci im Euchromatin des langen Armes vor, einmal im mittleren Segment an Position Aq21.2’ und in dem etwas stärker kondensierten Euchromatinbereich bei Aq31. Auf Chromosom B ließen sich ebenfalls zwei Loci auf dem langen Arm beobachten. Das stärkere Signal befand sich an der Stelle der starken DAPI-Bande bei Bq21 und das schwächere Signal terminal (Bqter). Chromosom H trug ein starkes Signal an der Stelle der starken DAPI-Bande an der Position Hq21.

$(AG)_8$

Die Hybridisierungen mit $(AG)_8$ zeigte auf den vier Chromosomen A, B, C und K insgesamt neun Signale (Abbildung 14b). Auf Chromosom A ließen sich zwei Signale beobachten, eines im distalen Segment des Euchromatins bei Aq21.3’ und das andere im Bereich des dichter gepackten Euchromatin bei Aq31. Auf Chromosom B wurden drei Loci festgestellt. Der Locus mit dem stärksten Signal lag an der Stelle der starken DAPI-Bande Bq21. Die beiden anderen, schwächeren Loci lagen jeweils etwa in der Mitte des euchromatischen Bereiches an den Position Bp21.2’ und Bq31.2’. Chromosom C zeigte ebenfalls drei Loci von $(AG)_8$. Einer davon befand sich im mittleren Segment des euchromatischen Teil des langen Arms bei Cq31.2’. Die beiden anderen lagen im cHC des langen Arms an den Positionen Cp12 und Cq21. Chromosom K wies nur einen Locus im cHC an Position Kq22-23 auf.

$(CA)_8$

Bei Verwendung von $(CA)_8$ als Sonde zeigten sich auf den drei NO-Chromosomen A, I und K sowie auf Chromosom B insgesamt acht Loci (Abbildung 14c). Die Signale auf den NO-Chromosomen A, I und K lagen jeweils in Bereichen des kondensierten Anteils des Chromatins der NORs an den Positionen Ap2, Iq3 und Kq2. Chromosom B zeigte ein schwaches Signal auf den Verdichtungen des telomerischen Heterochromatins am Ende des kurzen Armes (Bter) und ein stärkeres Signal im Bereich der starken DAPI-Bande Bq21.

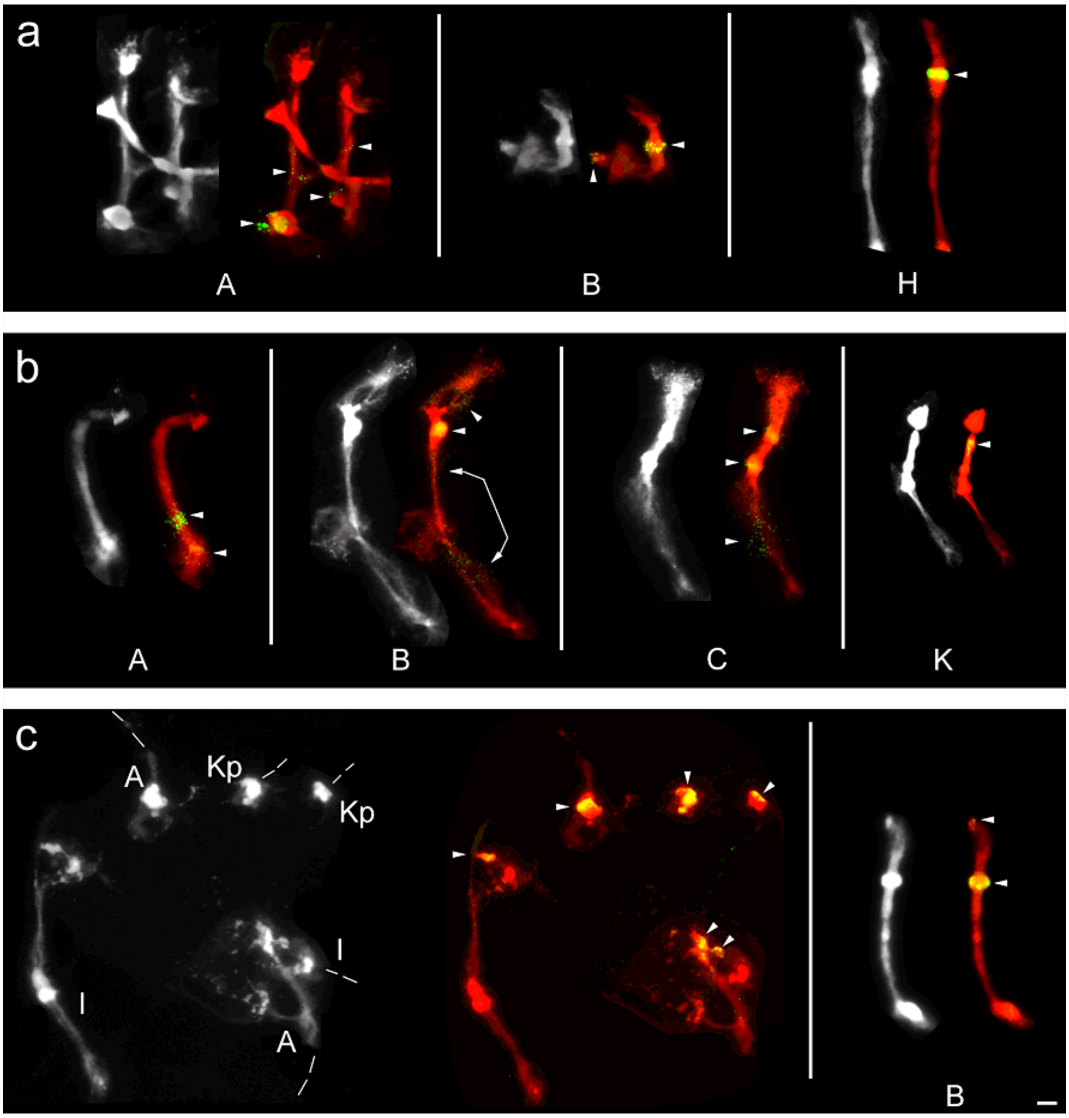


Abbildung 14: FISH-Signale (in Gelb/Grün, mit Pfeilspitzen markiert) der drei Dinukleotid-Motive $(AT)_8$, $(AG)_8$ und $(CA)_8$ auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und sind hier in Grau bzw. Rot dargestellt. (**a**) $(AT)_8$-Signale auf Chromosomen A, B und H. (**b**) Loci von $(AG)_8$ auf den Chromosomen A, B, C und K. Ein Teil des langen Armes ist präparationsbedingt nach unten geklappt. (**c**) Signale von $(CA)_8$ auf dem kondensierten Teil der NORs der drei Chromosomen A, I und K. Im Bild links handelt es sich um einen Sammelnukleolus von dem ein Teil der Chromosomen abgerissen sind. Nur jeweils die Blöcke des kondensierten Chromatinanteils der NOR sind deutlich zu erkennen. Das Bild ganz rechts zeigt zwei $(CA)_8$-Loci auf Chromosom B. Maßstab entspricht 10 µm

3.5.2.2 Hybridisierungssignale der Trinukleotid-Motive

(AAT)$_5$

Die Hybridisierungen mit (AAT)$_5$ zeigten auf den Chromosomen A und B insgesamt drei Signale (Abbildung 15a). Auf Chromosom A kamen zwei unterschiedlich starke Signale vor. Das schwächere Signal lag im mittleren und das stärkere Signal im distalen Segment des großen Euchromatinbereiches an den Positionen Aq21.2' bzw. Aq21.3'. Der Locus auf Chromosom B war im Bereich der starken DAPI-Bande bei Bq21 lokalisiert.

(AAG)$_5$

Bei Verwendung von (AAG)$_5$ als Sonde wiesen die vier Chromosomen A, B, I und K zusammen sechs Hybrisierungssignale auf (Abbildung 15b). Chromosom A trug ein relativ schwaches subterminales Signal im langen Armes an Position Aq32. Auf Chromosom B waren insgesamt drei Loci zu beobachten. Ein sehr starkes Signal im Bereich der starken DAPI-Bande Bq21 und zwei jeweils in den proximalen Euchromatinbereichen des kurzen und langen Armes an den Positionen Bp21.1' und Bq31.1'. Auf Chromosom I lag ein sehr schwaches Signal am distalen Rand des cHC im kurzen Arm bei Position Ip22. Chromosom K wies einen Locus im cHC an Position Kq22, direkt unterhalb der starken DAPI-Bande auf.

(CAC)$_5$

Signale von (CAC)$_5$ fanden sich auf den drei NO-Chromosomen A, I und K an insgesamt drei Loci (Abbildung 15c). Die Fluoreszenzsignale lagen bei den drei Chromosomen jeweils im dichten Chromatin der NORs an den Positionen Ap2, Iq3 und Kp2.

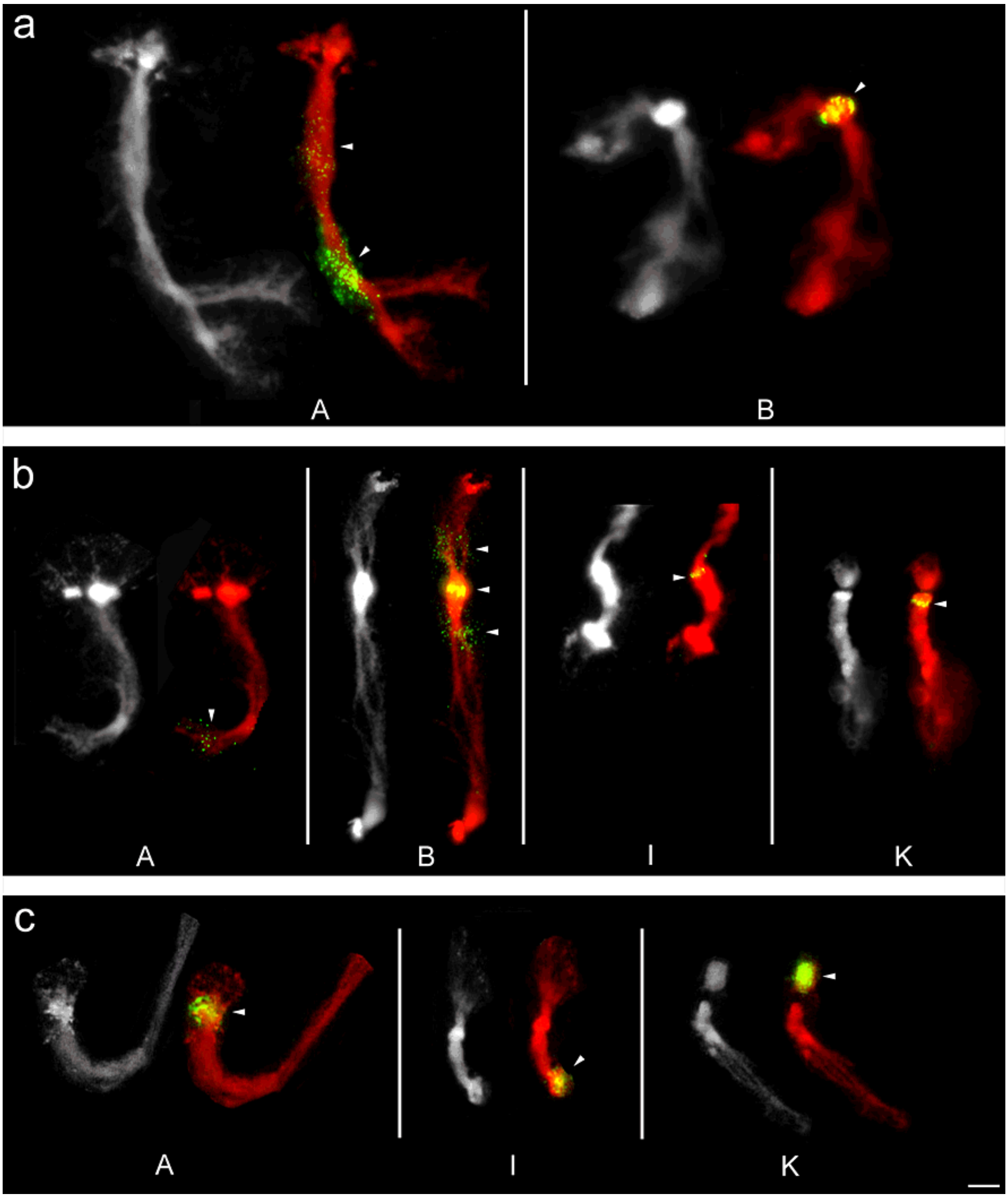


Abbildung 15: FISH-Signale (in Gelb/Grün, mit Pfeilspitzen markiert) der drei Trinukleotid-Motive $(AAT)_5$, $(AAG)_5$ und $(CAC)_5$ auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und sind hier in Grau bzw. Rot dargestellt. (**a**) $(AAT)_5$-Signale auf den Chromosomen A und B. (**b**) Loci von $(AAG)_5$ auf den vier Chromosomen A, B, I und K. (**c**) Signale von $(CAC)_5$ auf den drei NO-Chromosomen A, I und K jeweils im kondensierten Chromatinbereich der NORs. Maßstab entspricht 10 µm.

3.5.2.3 Hybridisierungssignale der Tetranukleotid-Motive

$(AATG)_4$

Die Hybridisierung mit dem Motiv $(AATG)_4$ ergab Signale im cHC aller Chromosomen und im Bereich von dichtem nukleolären Chromatin (Abbildung 16a). Zusätzlich traten noch Signale im Übergangsbereich vom cHC zu den euchromatischen Bereichen auf, die allerdings sehr viel schwächer waren und sehr unregelmäßig auftraten, weshalb sie hier keine Berücksichtigung fanden.

$(GATA)_4$

Die Sonde $(GATA)_4$ zeigte auf den beiden Chromosomen A und B zusammen drei Signale (Abbildung 16b). Auf Chromosom A waren zwei Loci zu beobachten, die beide in dem großen euchromatischen Teil des langen Armes lagen. Ein Locus befand sich im proximalen Segment an Position Aq21.1' und der zweite im distalen Segment an Position Aq21.3. Chromosom B wies nur einen Locus im cHC im Bereich der starken DAPI-Bande Bq21 auf. Zuweilen war die Signalintensität des Bq21-Locus nur schwach ausgeprägt. Bei der direkten Detektion mit FITC-$(GATA)_4$ als Sonde war er jedoch immer nachweisbar.

$(GACA)_4$

Die zwei Signale von $(GACA)_4$ lagen ebenfalls ausschließlich auf den Chromosom A und B (Abbildung 16c). Die Verteilung dieser beiden Hybridisierungssignale weist große Ähnlichkeit zu den Loci von $(GACA)_4$ auf. Allerdings war auf Chromosom A immer nur ein $(GACA)_4$-Locus im distalen Segment an Position Aq21.3' zu beobachten. Auf Chromosom B hingegen befand sich der $(GACA)_4$-Locus ebenfalls im Bereich der starken DAPI-Bande an Position Bq21.

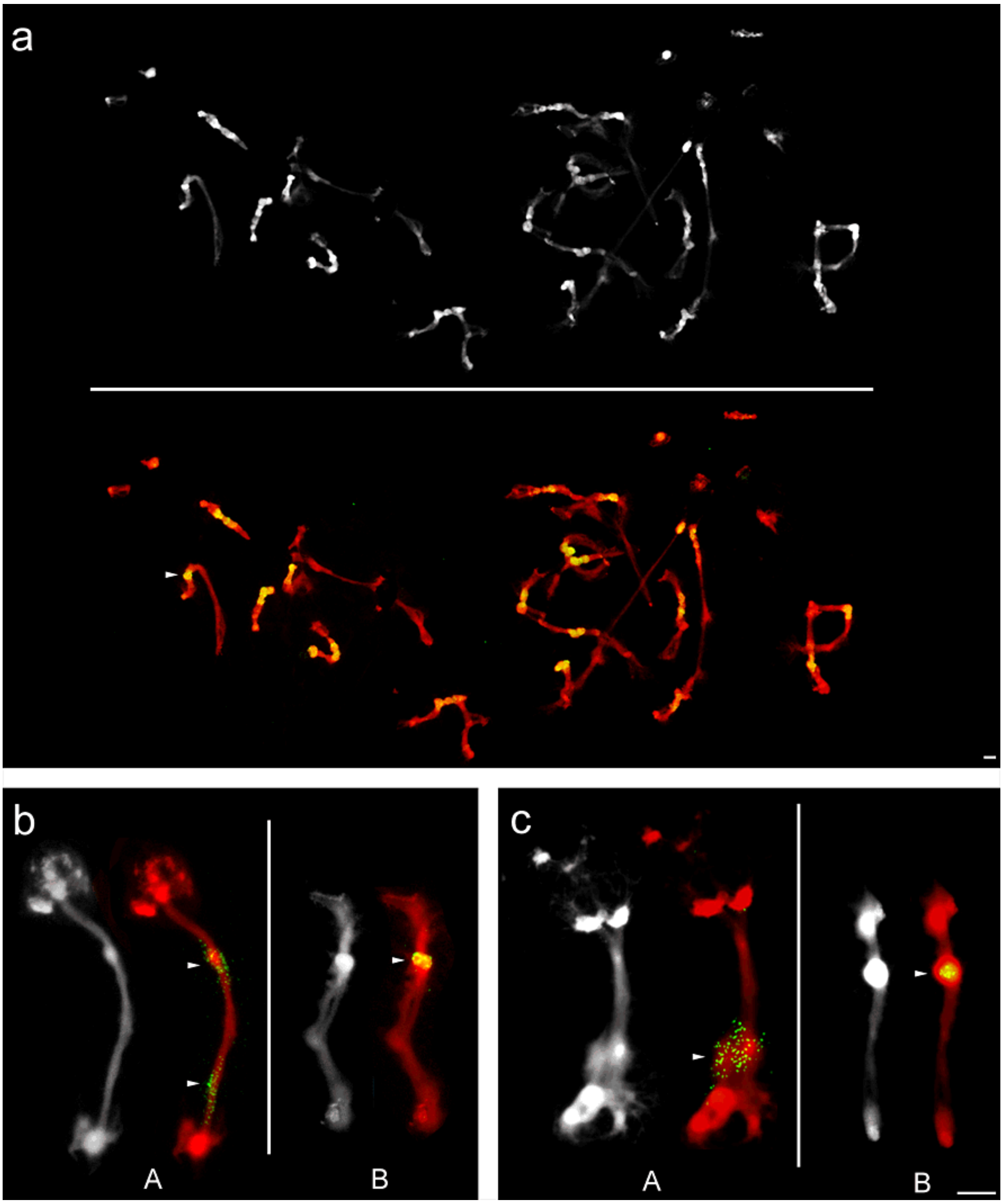


Abbildung 16: FISH-Signale (in Gelb/Grün, mit Pfeilspitzen markiert) der drei Tetranukleotid-Motive $(AATG)_4$, $(GATA)_4$ und $(GACA)_4$ auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und sind hier in Grau bzw. Rot dargestellt. (**a**) Unvollständiger Kern mit Signalen von $(AATG)_4$ auf allen Chromosomen im Bereich des cHCs und dem dichten Chromatin der NORs. (**b**) $(GATA)_4$-Signale auf Chromosom A und B. (**c**) Signale der $(GACA)_4$-Sonde auf den Chromosomen A und B. Maßstab entspricht 10 µm.

3.5.2.4 Loci GC-reicher Mikrosatelliten

Die Hybridisierungen mit den Sonden der beiden 16 Nukleotid langen GC-reichen Motive $(C)_{16}$ und $(GC)_8$ ergaben unter den berechneten Hybridisierungstemperaturen von 59°C keine Signale. Diese Sonden wurden daher zusätzlich unter weniger stringenten Bedingungen bei 40°C und 50°C hybridisiert und gewaschen. Die Sonde des Mononukleotid-Motiv $(C)_{16}$ wurde darüber hinaus auch als getailtes Oligonukleotid eingesetzt, um Signale höherer Fluoreszenzintensität zu erhalten.

$(C)_{16}$

Bei Verwendung der 5'-endmarkierten $(C)_{16}$-Sonde wurden auf den Chromosomen A, B, I insgesamt vier Signale beobachtet (Abbildung 17a). Die getailte $(C)_{16}$-Sonde zeigte weitere vier Signale auf den Chromosomen J und H (Abbildung 17b). Auf Chromosom A lag ein Signal am Ende des langen Armes im euchromatischen Bereich an Position Aq32 (Abbildung 17a). Chromosom B wies jeweils zwei Loci in den proximalen Segmenten der euchromatischen Bereiche an den Positionen Bp21.1' und Bq31.1' auf. Chromosom I zeigte ebenfalls ein Signal in einem proximalen, euchromatischen Segment an Position Ip31.
Auf den Chromosomen H und J waren jeweils zwei Signale im Bereich des cHC zu beobachten (Abbildung 17b). Auf Chromosom H deckte ein Signal das gesamte cHC des kurzen Armes inklusive des Centromers ab (Hp11-12 und Hq11), während das zweite Signal auf den distalen Teil des cHC des langen Armes beschränkt war (Hq22-24). Der Bereich der hellen DAPI-Bande blieb jedoch vom Signal ausgespart. Die Signalverteilung auf Chromosom J war der von Chromosom H ähnlich. Die Signale lagen ebenfalls auf den beiden Armen jeweils im distalen Teil des cHC. Die Positionen der beiden Signale sind Jp22-24 und Jq22-23. Wie schon bei Chromosom H war die Aussparung des Centromers und der DAPI-Bande, hier sowohl im kurzen und langen Arm, sehr augenfällig.

$(GC)_8$

Bei Einsatz von $(GC)_8$ war nur auf Chromosom K ein eindeutiges Signal (Abbildung 17c) zu beobachten. Der Locus lag terminal auf dem langen Arm an Position Kq31.3'.

$(GCC)_5$

Die Hybridisierung mit $(GCC)_5$ bei 50°C und 55°C ergab auf den vier Chromosomen A, B, C und K insgesamt sechs Loci (Abbildung 17d). Auf Chromosom A fand sich ein Signal in dem stärker kondensierten Euchromatinbereich an Position Aq31. Chromosom B zeigte einen Locus im Euchromatin des kurzen Armes an Position Bp21.2' und einen zweiten im Bereich der starken DAPI-Bande bei Bq21. Auf Chromosom C lagen die beiden Signale in den zwei Blöcken des cHC an den Position Cp12 und Cq21-22. Das $(GCC)_5$-Signal auf Chromosom K wurde ebenfalls im cHC direkt unterhalb der starken DAPI-Bande an Position Kq22 lokalisert.

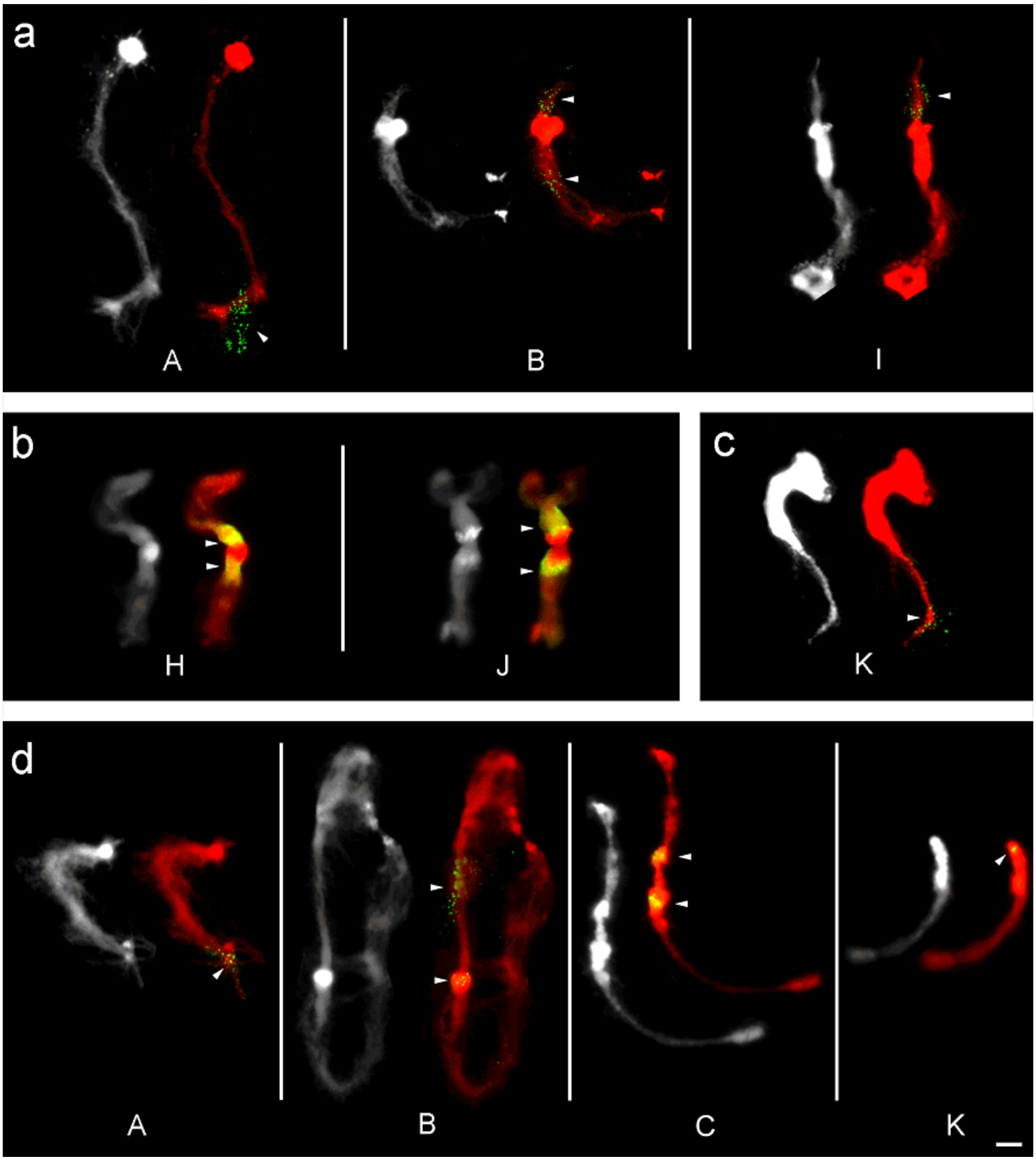


Abbildung 17: FISH-Signale (in Gelb/Grün, mit Pfeilspitzen markiert) der GC-reichen Motive $(C)_{16}$, $(GC)_8$ und $(GCC)_5$ auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und sind hier in Grau bzw. Rot dargestellt. (**a**) Signale der 5'-endmarkierten $(C)_{16}$-Sonde, hybridisiert bei 50°C, auf den Chromosomen A, B und I. (**b**) Signale der getailten $(C)_{16}$-Sonde auf Chromosom H und J. (**c**) $(GC)_8$-Signal im Euchromatin von Chromosom K. (**d**) Signale von $(GCC)_5$, hybridisiert bei 50°C und 55°C, auf den Chromosomen A, B, C und K. Maßstab entspricht 10 µm.

3.5.3 Loci der Telomer-Sequenz und der Minisatelliten

Loci der *Arabidopsis*-Telomer-Sonde

Signale der getailten Oligonukleotid-Sonde für die Telomer-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* waren an allen Chromosomen an beiden Enden zu finden. Bei den Chromosomen mit telomerischem Heterochromatin (tHC) lagen die Signale direkt auf dem tHC (Abbildung 18a).

Loci der Sonden für zwei Minisatelliten-Core-Konsensus-Sequenzen

Die Hybridisierungen mit der Oligonukleotid-Sonde für die Core-Konsensus-Sequenz des 33bp-*repeat*-Minisatelliten (33con) zeigte eine ähnliche Signalverteilung wie die Telomer-Sequenz von *Arabidopsis thaliana*. Die Loci waren an allen Chromosomenenden bzw. im tHC zu finden (Abbildung 18b). Die Signale der Oligonukleotid-Sonde für die Core-Konsensus-Sequenz des M13-Minisatelliten (M13con) lagen zwar ebenfalls auf allen Chromosomen, aber immer im cHC und insbesondere im Bereich der jeweiligen starken DAPI-Bande (Abbildung 18c).

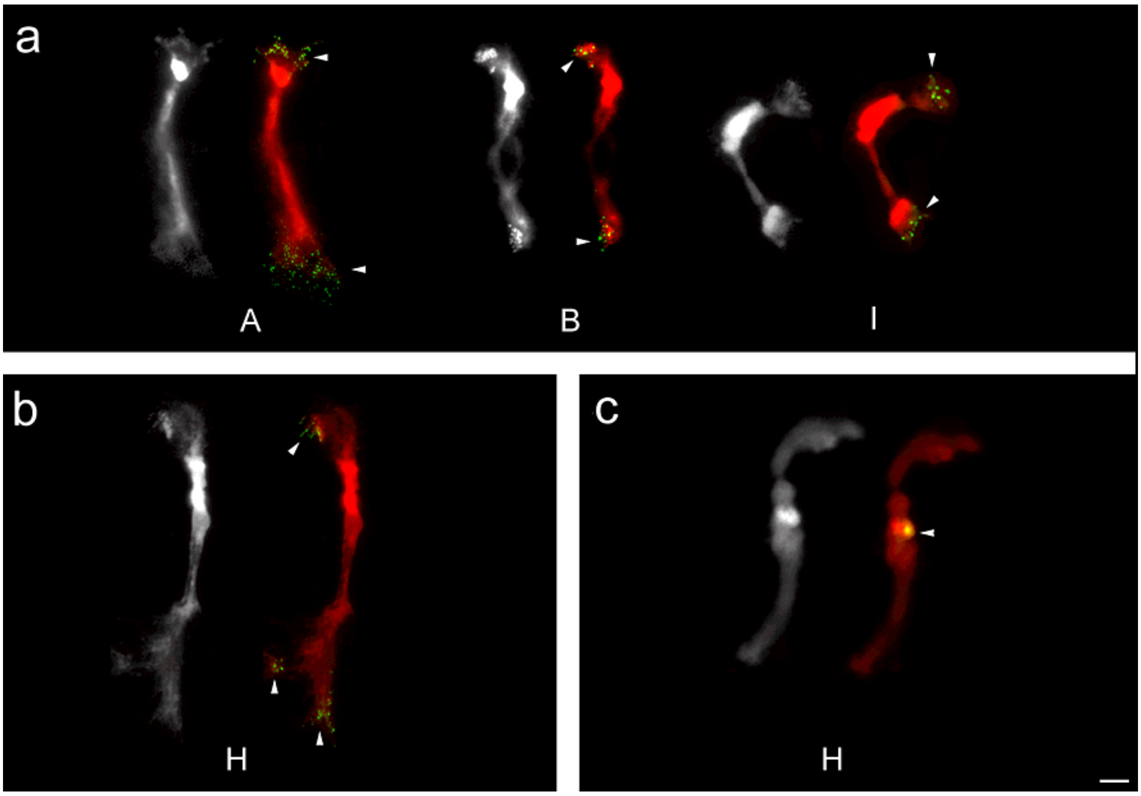


Abbildung 18: FISH-Signale (in Gelb/Grün, mit Pfeilspitzen markiert) der Telomer-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* und zweier Minisatelliten Core-Konsensus-Sequenzen auf Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus*. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt und sind hier in Grau bzw. Rot dargestellt. (**a**) Repräsentative Beispiele für die endständigen Signale die Telomer-Sequenz auf den Chromosomen A, B und I. (**b**) Signale der Core-Konsensus-Sequenz 33con im tHC auf Chromosom H, stellvertretend für alle anderen Chromosomen. (**c**) Repräsentative Signale der Core-Konsensus-Sequenzen von M13con im cHC von Chromosom H als Beispiel für die Lokalisation auch auf den anderen Chromosomen. Maßstab entspricht 10 µm.

3.5.4 Cytogenetische Karte

Um einen Überblick über die Position der FISH-Signale der verschiedenen Sonden zu geben, wurden die Loci in Tabelle 9 tabellarisch zusammengefaßt. Darüber hinaus wurden die Loci in eine erste cytogenetische Karte der Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor von *Phaseolus coccineus* eingetragen (Abbildung 19). Von den insgesamt 57 Loci der Mikrosatellitenmotive, liegen 25 Loci (von 10 Motiven) in euchromatischen Chromosomen-abschnitten und 32 Loci (von 10 Motiven) in heterochromatischen. Signale in der NOR wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 9: Verwendete DNA-Sonden mit den Loci ihrer FISH-Signale in der Übersicht. Die Lage von FISH Signalen innerhalb Banden ohne erkennbare Unterteilung wird duch Angabe von 1' (proximal vom Centromer), 2'(zentral) und 3' (distal vom Centromer) gekennzeichnet. Loci im Heterochromatin sind unterschrichen.

DNA-Sonden	Loci der FISH-Signale
18S-25S	Ap2, Iq3, Kp2
5S	Iq12, Kq25
Phaseolin	Gp21.3'
(AT)$_8$	Aq21.2', Aq31, Bq21, Bqter, Hq21
(AG)$_8$	Aq21.3', Aq31, Bp21.2', Bq21, Bq31.2', Cp12, Cq21, Cq31.2', Kq22-23
(CA)$_8$	Ap2*, Bq21, Bpter, Iq3*, Kp2*
(AAT)$_5$	Aq21.2', Aq21.3', Bq21
(AAG)$_5$	Aq32, Bp21.1', Bq21, Bq31.1', Ip22, Kq22
(CAC)$_5$	Ap2*, Iq3*, Kp2*
(AATG)$_4$	cHC aller Chromosomen u. DNC
(GATA)$_4$	Aq21.1', Aq21.3', Bq21
(GACA)$_4$	Aq21.3', Bq21
(C)$_{16}$	Aq32, Bp21.1', Bq31.1', Ip31, Jp22-24, Jq22-23, Hp11-12, Hq11, Hq22-24
(GC)$_8$	Kq31.3'
(GCC)$_5$	Aq31, Bp21.2', Bq21, Cp12, Cq21-22, Kq22
Telomer-Sequenz	p/qter aller Chromosomen
M13 Konsensus-Sequenz	cHC aller Chromosomen u. DNC
33bp *repeat*-Konsensus-Sequenz	p/qter aller Chromosomen

DNC = dichtes nukleoläres Chromatin

* Bereich des kondensierten Chromatins der NOR (=DNC)

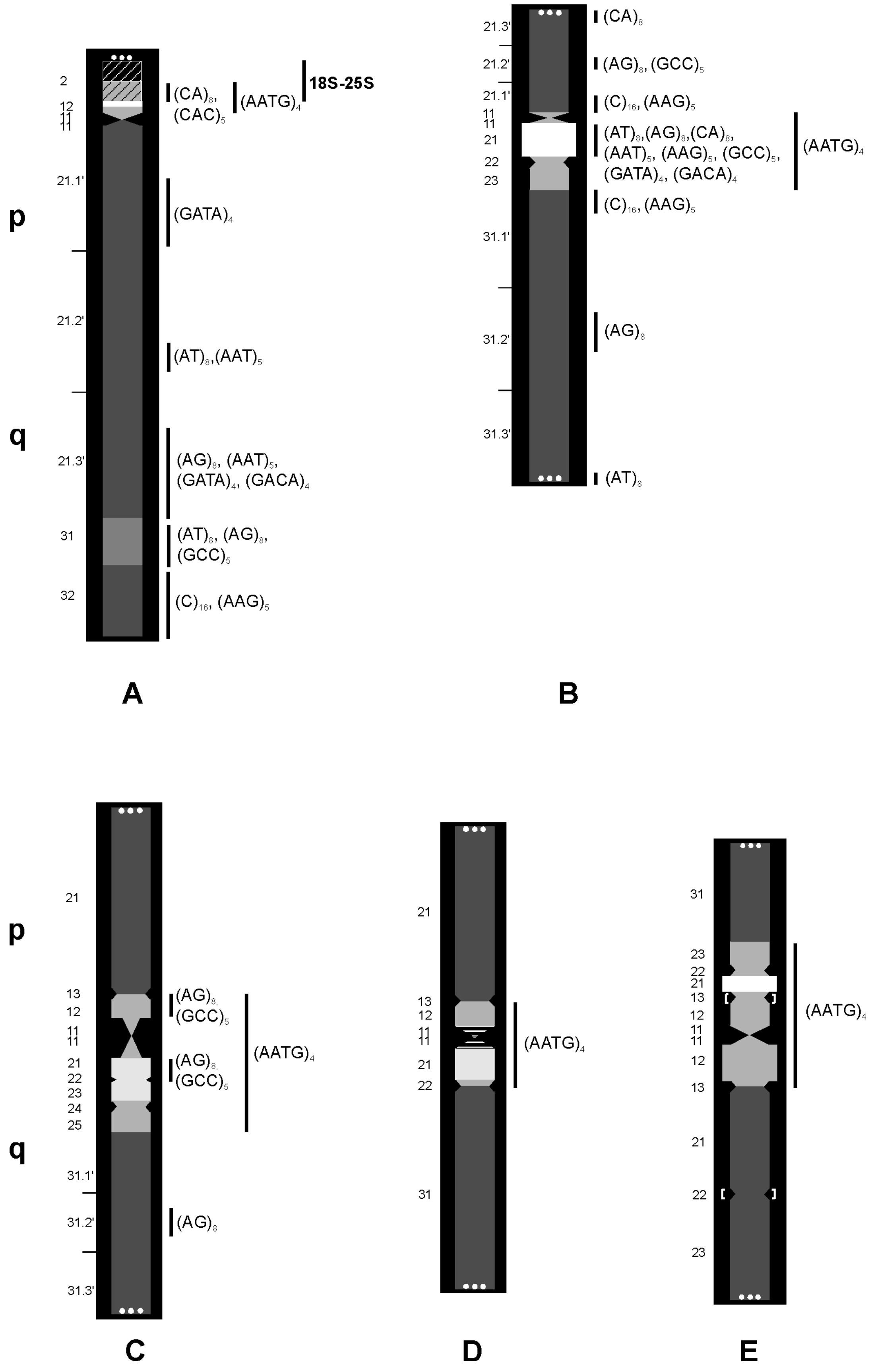


Abbildung 19: Cytogenetische Karte der Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner (Fortsetzung nächste Seite).

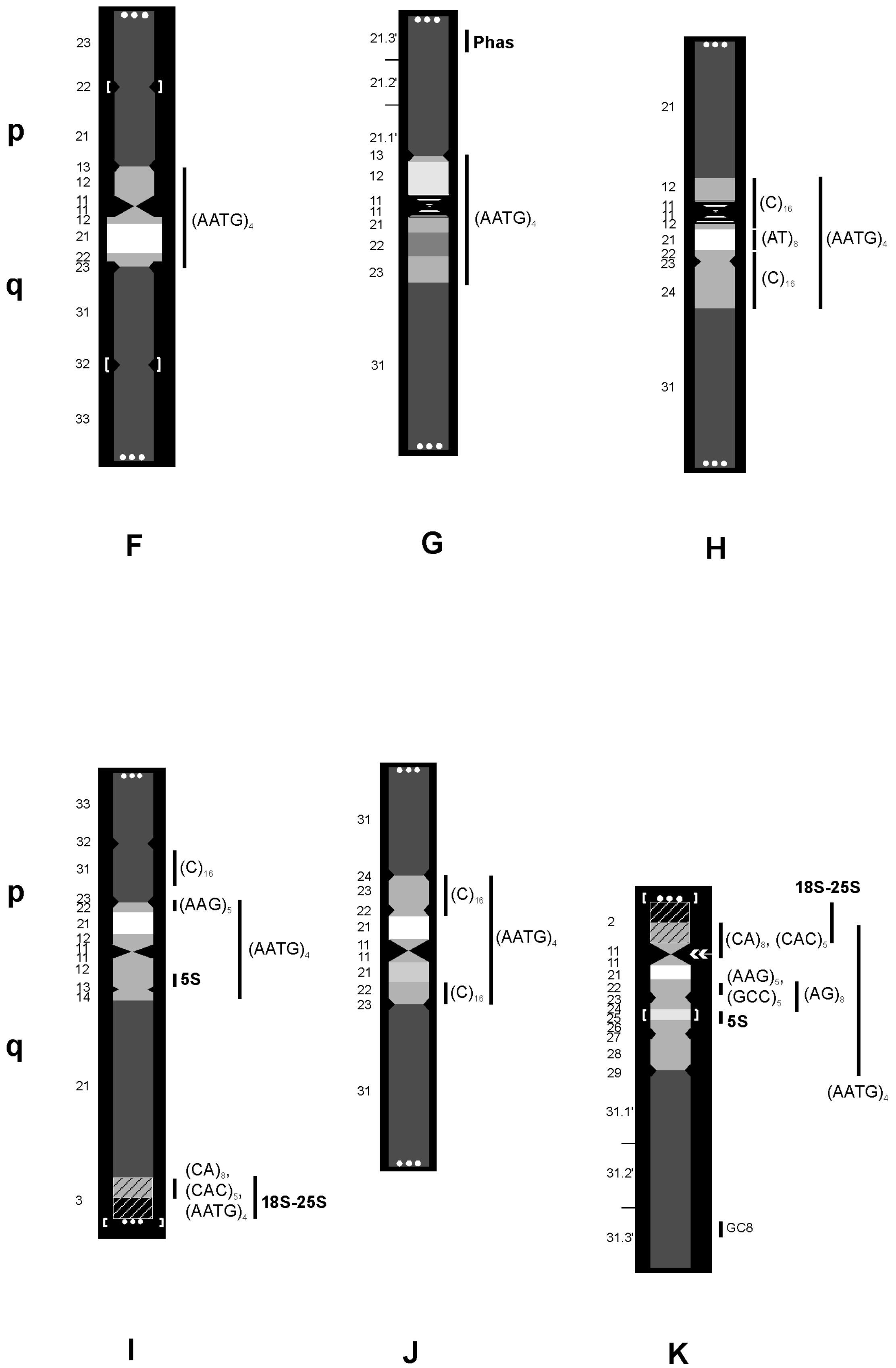


Abbildung 19: - Fortsetzung -

3.5.5 Basenzusammensetzung der cHC-Bereiche

Anhand der Hybridisierungssignale verschiedener Mikrosatelliten-Motive im cHC-Bereich wurde auf mögliche Unterschiede in der Basenzusammensetzung zwischen den starken DAPI-Banden und dem restlichen cHC geschlossen. Dazu wurden die verwendeten Oligonukleotide nach ihrem prozentualen Gehalt an Adenin und Tymidin (AT) bzw. Guanin und Cytosin (GC) in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Liste der Oligonukleotid-Sonden eingeteilt nach ihrem Gehalt an AT bzw. GC.

AT-reich (75-100%)	AT - GC (50 -60%)	GC-reich (67-100%)
$(AT)_8$ (100%)	$(AG)_8$ (50%)	$(CAC)_5$ (67% C)
$(AAT)_5$ (100%)	$(CA)_8$ (50%)	$(C)_{16}$ (100%)
$(AATG)_4$ (75%)	$(GACA)_4$ (50%)	$(GC)_8$ (100%)
$(GATA)_4$ (75%)	$(AAG)_5$ (60% A)	$(GCC)_5$ (100%)

Anschließend wurde das Vorkommen der Oligonukleotid-Sonden im Bereichen der starken DAPI-Bande bzw. dem restlichen cHC-Bereich getrennt nach den zuvor benannten Gruppen bestimmt (Tabelle 11). Dabei wird ersichtlich, daß in den starken DAPI-Banden eine größere Zahl von AT-reichen Mikrosatelliten (15 statt 11) hybridisierten und eine erheblich geringere an GC-reichen Motiven (2 statt 6) als in den restlichen Abschnitten des cHC.

Tabelle 11: Verteilung der Signale von Mikrosatelliten-Motiven im centromerischen Heterochromatin, getrennt nach ihrem Auftreten in den starken DAPI-Banden bzw. in den übrigen Abschnitten des cHC.

	Signale in starken DAPI-Banden			Signale im restlichen cHC		
Chr.	AT-reich	AT - GC	GC-reich	AT-reich	AT - GC	GC-reich
A	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	-
B	$(AATG)_4$, $(AT)_8$, $(AAT)_5$, $(GATA)_4$	$(AG)_8$, $(CA)_8$, $(GACA)_4$	$(GCC)_5$	$(AATG)_4$	$(AG)_8$	-
C	$(AATG)_4$	$(AG)_8$	$(GCC)_5$	$(AATG)_4$	-	$(GCC)_5$
D	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	-
E	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	-
F	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	-
G	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	-
H	$(AATG)_4$, $(AT)_8$	-	-	$(AATG)_4$	-	$(C)_{16}$, $(C)_{16}$
I	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	$(AAG)_5$	-
J	$(AATG)_4$	-	-	$(AATG)_4$	-	$(C)_{16}$, $(C)_{16}$
K	$(AATG)_4$	$(AG)_8$	-	$(AATG)_4$	$(AG)_8$, $(AAG)_5$	$(GCC)_5$
$\sum$	**15**	5	**2**	**11**	4	**6**

4 DISKUSSION

Erst mit der Entdeckung der gebänderten Polytänchromosomen im Embroysuspensor von *Phaseolus coccineus* durch Nagl (1962a), fanden pflanzliche Polytänchromosomen Anerkennung als „echte Riesenchromosomen“. Seither kann die Forschung an *Phaseolus*-Polytänchromosomen auf eine 36jährige Geschichte zurückblicken in der sowohl ihre strukturellen als auch funktionellen Aspekte untersucht wurden (Nagl 1974; Nagl 1981). In zahlreichen Untersuchungen stand dabei die Struktur der elf Chromosomenpaare im Vordergrund. Die Identifikationsmerkmale für das erste vollständige Idiogramm zeigten eine erhebliche Variabilität in ihrer Ausprägung, so daß die Klassifizierung einzelner Polytänchromosomen nicht immer möglich war. Es wurde daher nach einem neuen Weg zur individuellen Identifizierung der Polytänchromosomen gesucht.

4.1 Präparation

Der erste Schritt bestand darin, die Präparationstechnik zu verbessern, denn häufig waren die Polytänchromosomen in den Präparaten ineinander verschlungen oder brachen bei starkem Quetschen auseinander. Es stellte sich im Laufe dieser Arbeit heraus, daß sich die Chromosomen besser spreiten ließen, wenn die Zellkerne noch vor dem Quetschen aus der Zelle vorsichtig „herausgedrückt“ und anschließend einer zusätzlichen Mazeration in Essigsäure unterzogen wurden. Offensichtlich wurde dadurch der Kerninhalt (das „Nukleoplasma“), eine gallertartige und viskose Masse, in welche die Chromosomen eingebettet sind, stärker aufgelöst, als bei der bisherigen Präparation. Besonders deutlich war die bessere Spreitung daran zu erkennen, daß die Nukleolus-organisierenden Chromosomen in der Regel am Nukleolus vollständig erhalten blieben.

4.2 Morphologische Merkmale der Polytänchromosomen

4.2.1 Variable Merkmale

Der bisherige Weg zur Identifizierung der Polytänchromosomen führte über das Muster der Verteilung von Eu- und Heterochromatin, und insbesondere der Verteilung der interkalaren (heterochromatischen) Querbanden (Nagl 1962b; Nagl 1967). Doch dieses Querbandenmuster erwies sich nicht immer als zuverlässig auftretendes Merkmal (vgl. Nagl 1965; Nagl 1967) und eignete sich nur unzureichend zur eindeutigen Identifizierung (Schweizer und Ambros 1979). Vor diesem Hintergrund erscheint es nicht abwegig, daß zwischen Polytänchromosomen, die als homolog angesehen wurden, erhebliche Unterschiede festgestellt wurden (Cionini et al. 1982). Es kann somit angenommen werden, daß in der zurückliegenden Literatur durchaus Verwechslungen bei der Identifizierung stattfanden.

Die Längenvariation der Polytänchromosomen ist auf die präparativ bedingte Streckung zurückzuführen und muß daher als Artefakt angesehen werden. Nach eigenen Beobachtungen sind davon insbesondere die euchromatischen Bereiche betroffen, die aufgrund der Dehnung eine

Verjüngung zeigen. Darüber hinaus sind prinzipiell Variationen durch verschiedene Polyploidiegrade oder unterschiedliche Kondensationsgrade des Euchromatins möglich (Nagl 1974). Diese beiden letztgenannten Einflüße lassen sich aber durch Aussortieren der geeigneten Suspensorzellen vor der Präparation erheblich reduzieren. Die Größe der Chromosomen und entsprechend auch ihr Polyploidiegrad ist direkt erkenn- bzw. abschätzbar und besonders stark kondensierte Chromosomen fallen durch ihre dunkle Färbung auf.

4.2.2 Centromerisches Heterochromatin (cHC)

Im Vergleich zu den oben genannten variablen Merkmalen der Polytänchromosomen zeigte sich der Bereich des centromernahen Heterochromatin (cHC) in der vorliegenden Arbeit als nahezu konstant. Er wurde hier erstmals eingehend untersucht. Heterochromatin spielt bei Karyotypisierung oft eine wichtige Rolle, wobei allerdings nur die konstant auftretenden Bereiche berücksichtigt werden sollten (Joachimiak et al. 1997).

4.2.2.1 Merkmale des cHC

Der Bereich des cHC ist bei *Phaseolus*-Polytänchromosomen nicht homogen, sondern läßt verschiedene morphologische Merkmale erkennen. Diese sind teilweise bereits im Phasenkontrast erkennbar, in ihrer Gesamtheit jedoch erst in der DAPI-Fluoreszenz zu beobachten. Neben seiner Ausdehnung umfassen die Merkmale des cHC (1) die centromerische Einschnürung, (2) Segmente, die nach Protease-Vorbehandlung durch starke DAPI-Fluoreszenz auffallen (starke DAPI-Bande), (3) sekundäre Einschnürungen die *nicht* der NOR zuzuordnen sind sowie (4) Segmente, die geringfügig breiter sind als die sonstige Breite des Chromosoms (vgl. Abbildung 6).

Auf jedem der elf Polytänchromosomen stellen sich diese vier Merkmale unterschiedlich dar und erlauben eine Identifizierung der Chromosomen. Dabei weist nicht jedes cHC alle Merkmale auf. Das Centromer ist sicherlich bei allen Chromosomen vorhanden, aber nicht immer deutlich erkennbar. Starke DAPI-Banden treten bei allen Chromosomen auf, allerdings mit unterschiedlicher Intensität, und zwei Chromosomen besitzen eine zusätzliche, schwächere DAPI-Bande. Sekundäre Einschnürungen und verbreiterte Segmente treten jedoch nur bei einigen Chromosomen und unabhängig voneinander auf. Das chromosomenspezifische Muster der Ausprägung der Merkmale des cHC bleibt auch im gestreckten Zustand erkennbar. Die centromerische Einschnürung mancher Chromosomen ist *ohne* Streckung fast nicht erkennbar. Chromosomen mit besonders markanten cHC-Bereichen lassen sich selbst in Kernen identifizieren, die nicht alle 22 Chromosomen enthalten. Dies kann eine große Hilfe darstellen, da selbst die hier vorgestellte, verbesserte Präparation nur selten vollständige Kerne liefert.

4.2.2.2 Fluorochrom-Bänderung

Während drei der vier charakteristischen Merkmale des cHC bereits im Phasenkontrast erkennbar sind, treten die starken DAPI-Banden erst nach der Vorbehandlung mit Pepsin/HCl und RNase hervor. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß ein Teil der DNA durch die Einwirkung von Pepsin/HCl zwar im gesamten Chromatin herausgelöst wird, die Bereiche der starken DAPI-Banden aber von dieser Extraktion weniger stark betroffen sind und sich deshalb anschließend mit DAPI stärker anfärben lassen. Damit würde der Mechanismus dieser DAPI-Färbung nach Vorbehandlung mit Pepsin/HCl und RNase sowohl Aspekte der C-Bänderung (Extraktion von DNA) als auch der G-Bänderung (Protease-Behandlung) (Sumner 1990) beinhalten. Aber auch der Einfluß der größeren Bindungspräferenz von DAPI für AT-reiche Sequenzen (Lin et al. 1977) könnte eine Rolle spielen.

Die Präparate wurden zum Teil mit DAPI und Propidiumiodid (DAPI/PI) gefärbt und im Filter für DAPI-Fluoreszenz unter UV-Anregung (etwa 350-370 nm) betrachtet. Dabei fiel ein Muster aus blauen, rosafarbenen und weißlichen Segmenten auf, welches die Erkennung verschiedener Chromosomenabschnitte wesentlich erleichterte (vgl. Abbildung 7). Die blaue bis weißliche Fluoreszenz stammt von DAPI. Die rosafarbene Fluoreszenz hingegen wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit von PI alleine bzw. durch Überlagerung mit der blauen/weißlichen Fluoreszenz von DAPI hervorgerufen.

Eine mögliche Erklärung dafür, daß Chromosomenabschnitte nach PI-Färbung nicht nur bei der üblicherweise verwendeten Grün-Anregung (530 nm) sondern auch bei UV-Anregung (350-370 nm) eine rote Fluoreszenz ziegen, findet sich bei Klett (1992). Nach Klett läßt sich PI über das gesamte Spektrum zwischen 220 bis 266 nm zur Fluoreszenz anregen und zeigt bei 282 und 515 nm zwei Maxima. Doch gerade im UV-Bereich bei 360 nm, der normalerweise für die DAPI-Anregung verwendet wird, weist PI ein Anregungs-Minimum auf. Gibt man jedoch zu PI-gefärbten Zellen DAPI in gleicher Menge hinzu, verzehnfacht sich die rote Fluoreszenz durch Energietransfer von DAPI zu PI. Für den umgekehrten Fall, der Zugabe von PI zu DAPI-gefärbten Zellen, beschreibt Klett einen Verlust der DAPI-Fluoreszenz, den er auf die Konformationsänderung der DNA durch interkalierendes PI zurückführt. Mit diesen Ergebnissen ließe sich erklären, daß (1) die PI-Färbung im DAPI-Filter erst durch Zugabe von DAPI in verstärktem Maße sichtbar wird und (2) die DAPI-Fluoreszenz durch PI abgeschwächt wird. Letzteres scheint aber nur für die euchromatischen Chromatinbereiche zu gelten die erheblich dunkler erscheinen als die starken und hellen DAPI-Banden im cHC. Für die Betrachtung der DAPI/PI-Färbung ist es aber ebenso wichtig, einen DAPI-Langpaßfilter zu verwenden, da nur damit alle Wellenlängen des Spektrums vom blauen bis zum roten Licht durchgelassen werden.

Eine Differenzierung des cHC der Polytänchromosomen war Schweizer (1976b) bereits bei der differentiellen Fluorochrom-Bänderung mit DAPI und Chromomycin A_3 (CMA) aufgefallen. Hieraus wurde geschlossen, daß sich das cHC in eine Fraktion mit höherem Anteil an AT-reichen und in eine zweite Fraktion mit überwiegendem Anteil von GC-reichen Sequenzen unterteilen läßt. In der entsprechenden Arbeit wird diese Verteilung nur für eines der NO-Chromosomen beispielhaft gezeigt. Der Vergleich zwischen dem von Schweizer (1976b, Fig. 5) dargestellten Chromosom mit dem neuen Idiogramm (s. Abbildung 12) läßt vermuten, daß es sich dabei um Chromosom I handelt. Unter dieser Voraussetzung würde eine markante Ähnlichkeit zwischen beiden Färbungen vorliegen. Die von Schweizer mit CMA- AMD/DAPI+ gekennzeichneten Bereiche (AT-reich) stimmen in ihrer Lage den weißen Segmenten der DAPI/PI-Färbung überein. Ebenso entsprechen die mit CMA+ AMD/DAPI- (GC-reich) gekennzeichneten Bereiche den rosafarbenen Segmenten der DAPI/PI-Färbung.

Bei Anwendung konventioneller Bänderungstechniken wie z. B. Giemsa-C-Bänderung zeigen Polytänchromosomen von *Phaseolus* C-Banden in verschiedenen Chromosomenabschnitten. Große und starke Banden fanden sich im cHC sowie in der NOR, und kleinere im Bereich des telomerischen Heterochromatins sowie auf manchen interstitiellen Abschnitten (Schweizer 1976b; Schweizer und Ambros 1979). Eine Detailaufnahme eines C-gebänderten Polytänchromosoms, das sich zum Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen eignet, findet sich bei Schweizer und Ambros (1979) in Fig. 6c. Diese Abbildung zeigt zwei NO-Chromosomen, von denen das als „Na“ bezeichnete Chromosom mehrere, unterschiedlich starke C-Banden aufweist. Der Vergleich des C-gebänderten Chromosoms Na mit dem DAPI- bzw. DAPI/PI-gefärbten Chromosom K läßt eine markante Übereinstimmung erkennen. Die Banden 1 und 3 des „Na-Chromosoms“ stimmen in ihrer Lage mit der starken DAPI-Bande und der zweiten, schwächeren DAPI-Bande überein. Dieses Beispiel scheint anzudeuten, daß eine prinzipielle Korrelation zwischen der hier vorgestellten Fluorochrombänderung und der C-Bänderung besteht.

Die Bänderung mit Fluorochromen ist allgemein für die Karyotypisierung besonders geeignet wie zahlreiche Untersuchungen zeigen (z. B. Sheikh und Kondo 1995; Moscone et al. 1996; Xirau und Siljak-Yakovlev 1997). Fluoreszenzfarbstoffe weisen eine hohe Sensitivität auf und bieten die Möglichkeit, bei geeigneter Auswahl unterschiedliche Basenzusammensetzungen kenntlich zu machen (Joachimiak et al. 1997).

4.2.3 Chromosomen mit Nukleolus-organisierender Region

Die Beobachtung, daß sich die Nukleolus-organisierende Chromosomen (NO-Chromosomen) bei *Phaseolus coccineus* an der Ausbildung eines oder mehrerer sog. Sammelnukleolus bzw. -nukleoli beteiligen (Nagl 1967), wurde auch in dieser Arbeit regelmäßig bestätigt.

Die Anzahl der Polytänchromosomen mit einer NOR war ursprünglich mit zwei Paaren angenommen worden (Nagl 1965). Doch wies Nagl bereits bei der Erstbeschreibung der NO-Chromosomen darauf hin, daß in den höher endopolyploiden Endospermkernen drei Paare von SAT-Chromosomenbündeln vorliegen. Die Ergebnisse aus der ISH mit einer ^{3}H-markierter ribosomaler RNA (Avanzi et al. 1972) und frühe Versuche mit Giemsa-C-Bänderung (Schweizer 1976b) lieferten weitere Hinweise, daß die tatsächliche Zahl von NO-Chromosomen drei betragen müßte. Bestätigt wurde die Zahl von drei NO-Chromosomen durch die statistische Absicherung von Giemsa-C-Bänderungen (Schweizer und Ambros 1979) und FISH (Nenno et al. 1994).

Die anfängliche Beobachtung von nur zwei NO-Chromosomen ist nach Schweizer und Ambros (1979) eine Fehlinterpretation. Bei der Anfertigung der Quetschpräparate reißen oftmals NO-Chromosomen von dem einen (oder mehreren) Sammelnukleolus ab (Avanzi et al. 1972; Brady und Clutter 1972; Schweizer und Ambros 1979), und nur ihre heterochromatisch erscheinenden Bereiche bleiben am Nukleolus hängen. Diese Blöcke wurden bei der Erstbeschreibung irrtümlich als „Endosatelliten" interpretiert. Die zwischen „Endosatellit/-trabant" und dem vermeintlich zugehörigen Chromosom liegende NOR wurde als „SAT-Zone" angenommen, und die gesamte Konstellation als „SAT-Chromosom" angesehen. Ein weiterer Hinweis für die Annahme von „SAT-Chromosomen", war die gelegentliche Beobachtung von fädigen Strukturen der NOR, die das Chromosom mit dem „Satellit" als „Brücke" durchgängig verbinden würden (1965; Nagl 1974, Schema in Fig. 29). Diese Durchgängkeit konnte aber von den Ergebnissen der Giemsa-C-Bänderung nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigte sich daß jede NOR einen eigenen Bereich abgrenzte (Schweizer und Ambros 1979). Diese Ergebnisse wurden kurze Zeit später in einem „modifizierten vorläufigen Idiogramm" berücksichtigt, welches nicht mehr zwei, sondern drei NO-Chromosomen zeigt und keine Satelliten mehr ausweist (Schumann et al. 1990).

Aus heutiger Sicht handelt es sich bei den Chromatinblöcken, die als „Endosatelliten" interpretiert wurden, mit hoher Wahrscheinlichkeit um den kondensierten Chromatinbereich der NOR, der nahezu vollständig den kurzen Arm von Chromosom K ausmacht. Inbesondere Chromosom K reißt sehr häufig im Centromerbereich auseinander, und nur der kurze Arm bleibt am Nukleolus hängen. Sofern in früheren Arbeiten mehr als zwei „Endosatelliten" beoachtet wurden, handelte es möglicherweise um den kondensierten Chromatinanteil des NOR von Chromosom I, nicht aber um den von Chromosom A. Letzteres Chromosom blieb während der vorliegenden Untersuchungen in der Regel immer vollständig am Sammelnukleolus bzw. -nukleoli erhalten.

Das Schema in Abbildung 20 faßt die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zur Struktur des Sammelnukleolus und den NO-Chromosomen zusammen. Es ist eine Kombination der Beobachtungen im Phasenkontrast, nach DAPI-Bänderung sowie der FISH mit rDNA- und Telomer-Sonde. Nach diesem Modell ragt bei Polytänchromosomen, die sich an einem Sammelnukleolus beteiligen, nur der dekondensierte Anteil des Chromatins der NOR in den Nukleolus hinein. Auf jener Seite der aufgelockerten NOR, die dem Zentrum des Sammelnukleolus zugewandt ist, befindet sich das telomerische Heterochromatin (tHC) in Form von punktförmigen Verdichtungen. Am häufigsten trifft man das tHC bei Chromosom A an, wohingegen man es bei den anderen beiden NO-Chromosomenpaaren nur dann erkennt, wenn die NOR bei der Präparation gedehnt wurde. Der kondensierte Chromatinanteil der NOR befindet sich hingegen an der Peripherie bzw. außerhalb des Nukleolus (vgl. Abbildung 8). Eine ähnliche Verteilung der 18S-25S rDNA in kondensierten wie auch dekondensierten Bereichen der NOR wurde in Interphasekernen von *Zea mays* und *Secale cereale* beobachtet (Givens und Phillips 1976; Leitch et al. 1992).

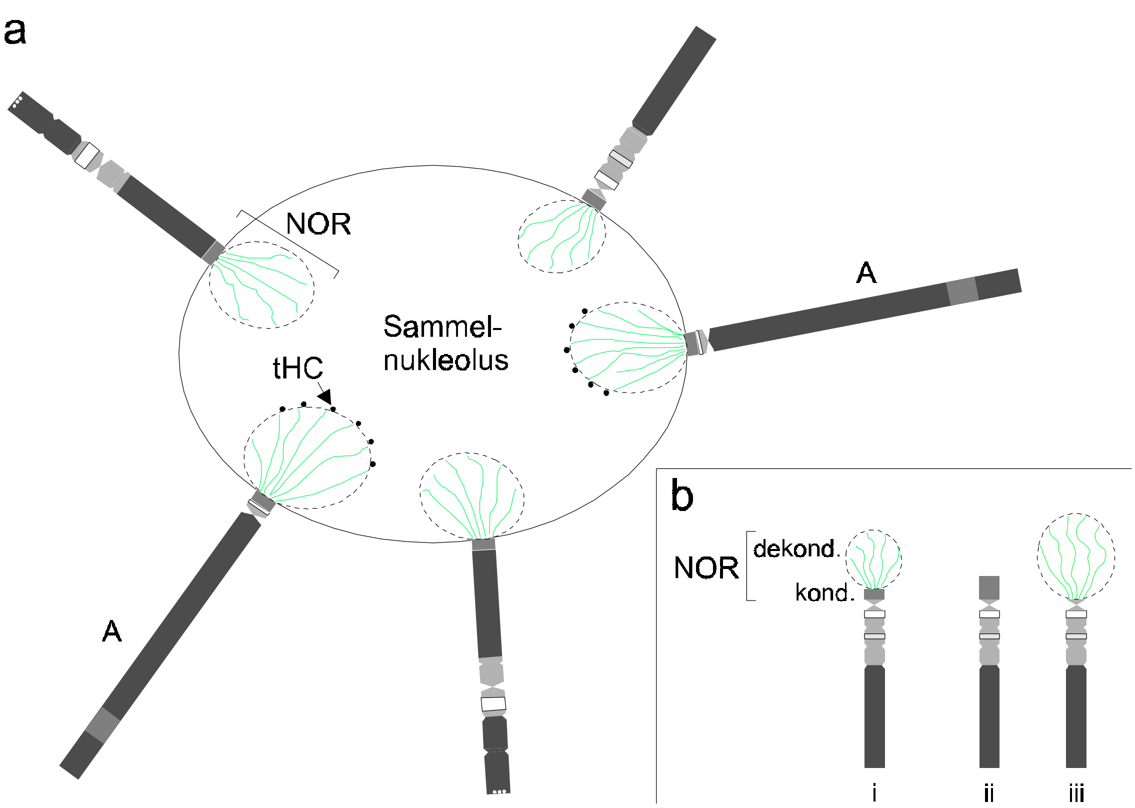


Abbildung 20: Schematisches Modell einiger Zusammenhänge zwischen Nukleolus und den polytänen NO-Chromosomen von *Phaseolus coccineus*. (**a**) Beispiel von Polytänchromosomen die gemeinsam einen Sammelnukleolus bilden, in den jeweils das dekondensierte Chromatin der NOR hineinragt. Der kondensierte Chromatin-Anteil der NOR liegt am Rande bzw. außerhalb des Sammelnukleolus. Die terminal am NOR liegenden, punktförmigen Verdichtungen des tHC befinden sich vermutlich nicht - wie

es den Anschein hat - in, sondern *auf* dem Sammelnukleolus. Am häufigsten ist das tHC an der NOR bei Chromosom A zu erkennen. (**b**) Verschiedene Kondensationszustände der NOR (i - iii) und die entsprechende Signalverteilung der 18S-25S rDNA-Sonde. (i) Auf dem dekondensierten Chromatinanteil der NOR (**dekond.**), besteht das Signal nur aus Signalpunkten, die wie „Perlen an einer Kette" aufgereiht erscheinen (hier als Linie). Auf dem kondensierten Chromatinanteil der NOR (**kond.**) zeigt die Sonde ein starkes Signal aus vermutlich vielen dicht liegenden Signalpunkten. Teilabbildungen (ii) und (iii) stellen extreme und selten auftretende Kondensationzustände der NOR dar: (ii) NOR ist vollständig kondensiert bzw. (iii) NOR ist völlig dekondensiert. Beispiele für (ii) und (iii) finden sich bei (Nenno et al. 1994).

Die Verwendung des Begriffes „Nukleolus-assoziiertes *Heterochromatin*" für die beiden unterschiedlich stark kondensierten Bereiche der NOR (Nagl 1965; Nagl 1981) scheint aus heutiger Sicht nicht angebracht. Heterochromatin ist nach Heitz (1928) der Anteil des Chromatins, der der Kondensations- und Dekondensations-Phase der typischen mitotischen Zellteilung nicht folgt, sondern immer kondensiert bleibt. Wie aber vor kurzem gezeigt werden konnte, bleibt das kondensierte Chromatin der NOR bei den Polytänchromosomen von *P. coccineus* nicht immer kondensiert, sondern kann auch dekondensiert vorliegen (vgl. Schema in Abbildung 20b und Nenno et al. 1994, Fig. 3a/b und 4a/b). Meist ist jedoch ein Teil der NOR kondensiert und der andere Teil aufgelockert. Um diese beiden Zustände zu symbolisieren, wurde die NOR im Idiogramm zur Hälfte hell und zur Hälfte dunkel gezeichnet (vgl. Abbildung 12). Es bietet sich an, für die beiden Kondensationszustände des Chromatins der NOR treffendere Begriffe einzuführen. Ein Vorschlag wäre „dichtes nukleoläres Chromatin" (DNC, *dense nucleolar chromatin*) und „lockeres nukleoläres Chromatin" (LNC, *loose nucleolar chromatin*).

Durch Vergleich von NO-Chromosomen aus ausgewählten Abbildungen in der Literatur mit dem neuen Idiogramm soll im folgenden versucht werden, eine Korrelation zwischen der alten und neuen Benennung der NO-Chromosomen herzustellen. Die Fotos der Chromosomen I (=S_1) und V (=S_2) in der ersten detaillierten Beschreibung (Nagl 1965) erlauben keine eindeutige Zuordnung. Von Chromosom S_1 wird nur ein Foto des sog. Endosatelliten photographisch dokumentiert. Ansonsten wird auf eine schematische Darstellung verwiesen. Vergleicht man das dortige Idiogramm (Fig. 1d) mit dem heutigen Idiogramm (vgl. Abbildung 12), so ähneln die ursprünglich jeweils als I und V bezeichneten Chromosomen am meisten den hier als A bzw. K und I bezeichneten Chromosomen.

Von den von Schweizer und Ambros (1979) mit Na, Nb und Nc bezeichneten NO-Chromosomen wird nur das Na-Chromosom photographisch hinreichend dokumentiert. Wie oben erwähnt, handelt es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit um das hier mit K bezeichnete Chromosom. Weitere Vergleiche von Chromosomen in Abbildungen aus früheren Arbeiten, auf denen sich die Polytänchromosomen aufgrund ausreichend guter Erhaltung neu identifizieren lassen, sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Daraus wird ersichtlich, daß es sich bei den früher als I klassifizierte Chromosomen in drei Fällen vermutlich um Chromosom K handelte. Für die beiden anderen NO-Chromosomen (II und V) ist kein entsprechend eindeutiger Vergleich möglich, da sich nur die Bilder aus einer Arbeit (Tagliasacchi et al. 1993) auswerten ließen.

Tabelle 12: Zuordnung zwischen der Benennung der NO-Chromosomen nach Nagl (1967) und der in dieser Arbeit neu erstellten.

	NO-Chromosomen	
Referenz	Nagl 1967	neu
Nagl 1970, Fig. 6	I	K
Durante et al. 1977, Fig. 5 und 6	I	K
Tagliasacchi et al. 1993, Fig. 3 und 4	I	K
	II	A
	V	I

4.2.4 Telomerisches Heterochromatin

Die hier beschriebenen punktförmigen Verdichtungen am Ende aller Chromosomen entsprechen in ihrer Größe und ihrem Vorkommen den von Nagl (1967) erstmals erwähnten „terminale Knöpfen“. Schweizer (1976b) bezeichnete diese Strukturen nach C-Bänderung als „terminales Heterochromatin“. Das terminale/telomerische Heterochromatin soll im folgenden daher mit „tHC“ abgekürzt werden. Bereits Schweizer (1976b) hatte verschiedene Formen von Anhäufungen des tHC beschrieben, die von einer Scheibenform aus vielen dicht beieinanderliegenden Punkten bis hin zu zahlreichen einzelnen Punkten reichte, wie sie auch hier beobachtet wurden (vgl. Abbildung 9).

Nach DAPI-Färbung zeigte das tHC in der vorliegenden Arbeit keine besonders starke Fluoreszenz, war dennoch immer erkennbar. Nach Färbung mit DAPI/PI, zeigte sich allerdings in der Regel eine starke, rosa Fluoreszenz. Dies ähnelt den Ergebnissen der Fluorochrom-Bänderung von Schweizer (1976b), der im tHC eine stärkere Fluoreszenzintensität von CMA als von AMD/DAPI beschreibt.

Auch die NO-Chromosomen zeigen, wenn die terminal liegenden NORs stark aufgelockert oder gedehnt sind, Strukturen, die in Größe und Ausprägung dem tHC sehr ähnlich sind. Es soll hier aber nicht der Interpretation von Schweizer und Ambros (1979) gefolgt werden, die diese Strukturen als mögliche Satelliten angesehen haben. Vielmehr scheint es sich hier aufgrund der offensichtlichen Ähnlichkeit ebenfalls um tHC zu handeln (vgl. Abbildung 9).

4.2.5 Querbänderungen und Chromatidenbündel

Polytänchromosomen mit Querbänderungen (vgl. Abbildung 10) waren im Laufe dieser Arbeit gelegentlich in den Präparate zu beobachten. Die Bänderung trat nicht bei allen, sondern nur bei ein bis zwei Chromosomen eines Kerns auf. Es gibt Hinweise, daß das Auftreten der Bänderung mit der 4-7 tägigen Lagerung (+4°C) der Hülsen vor der Fixierung in Zusammenhang steht. Daß sich durch kühle Temperaturen während der Anzucht der Pflanzen eine Querbänderung bei Polytänchromosomen von *P. vulgaris* induzieren läßt, wurde bereits von Nagl (1969a) beschrieben.

Hinweise auf die vielsträngige Längstruktur der Polytänchromosomen, die den Chromatiden oder Bündeln von Chromatiden entsprechen, fanden sich auch an Feulgen-gefärbten Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* (Brady und Clutter 1974). Sichtbar sind die Längsstruktur in den Präparationen aber immer nur in Chromosomenbereichen, deren Chromatin ungewöhnlich stark aufgelockert ist (vgl. Abbildung 10).

4.3 Karyotypisierung

Anhand der chromosomenspezifischen Ausprägung der Merkmale des cHC konnte erstmals ein vollständiges Karyogramm für die Polytänchromosomen für *Phaseolus coccineus* vorgestellt werden. Abbildung 11 zeigt je ein Karyogramm für DAPI-gebänderte Chromosomen als auch für solche nach DAPI/PI Färbung, bei der sich die Chromosomenbereiche auch farblich differenzieren lassen. Bei beiden Karyogrammen sind jeweils die 22 nicht somatisch gepaarten Chromosomen anhand der gemittelten Gesamtlänge aufgereiht. Diese Reihenfolge ist für die Darstellung als Karyogramm üblich, spielt aber für die Identifikation der Polytänchromosomen anhand des cHC keine Rolle.

Die Benennung der neu klassifizierten Polytänchromosomen erfolgte mit den Buchstaben A bis K. Damit soll deutlich gemachen werden, daß die neue Karyotypisierung nicht unbedingt mit der bisherigen Identifizierung nach Nagl (1967) übereinstimmen muß. Es besteht insbesondere kein Zusammenhang zu jenen vier erstbeschriebenen Chromosomen, die von Nagl (1962b) mit den Buchstaben A bis D bezeichnet wurden.

Eine erste Fassung des Idiogramms der DAPI-gebänderten Chromosomen wurde vor kurzem vorgestellt (Nenno und Nagl 1998). Darin fanden allerdings die Längenmessungen noch keine Berücksichtigung, so daß die Numerierung einzelner Chromosomen (C-J) abweicht. Die ausführliche Beschreibung des neuen Idiogramms wird mit dieser Arbeit erstmalig vorgestellt (Abbildung 12). Die Kennzeichnung und Numerierung der Zonen mit besonderen Merkmalen des cHC aber auch andere Zonen (z. B. NORs und tHC) erfolgte analog zur Benennung der Bandenmuster von Human-Metaphasechromosomen gemäß der Nomenklatur des International

System for Human Cytogenetics (ISCN 1995). Bereits Forino (1979) hatte den Vorgänger der ISCN, die Nomenklatur der Paris Konferenz (1972), für das bisherige Idiogramm angewendet.

4.4 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

4.4.1 Vorbehandlung mit Signalamplifikation

Neben der Verbesserung der Zugänglichkeit für die FISH führt die Inkubation mit Pepsin/HCl auch zur Verringerung von Resten des Nukleoplasmas im Präparat (Nenno et al. 1994). Dies spielt für die Detektion von Sequenzen, die nur in geringer Kopienzahl vorliegen oder die nur schwache Signale zeigen, eine größere Rolle, als für die hoch- und mittelrepetitive Sequenzen mit starken Signalen. Starke Signale sind meist bereits nach einer Lage Fluorochrom-gekoppelter Antikörper erkennbar. Schwache Signale müssen hingegen in der Regel erst durch Signalamplifikation verstärkt werden.

Eine Signalamplifikation war neben dem Nachweis der *low-copy* Gene von Phaseolin vor allem für die Detektion der 5'-endmarkierten Oligonukleotid-Sonden für Mini- und Mikrosatelliten notwendig. Letztere kommen zwar in vielen Tausenden von Kopien im Genom vor, aber die Signalstärke der aus 15 bzw. 16 Nukleotiden bestehenden Oligonukleotid-Sonden ist gering und kommt ohne Signalamplifikation nicht aus. Um die Hintergrundsignale möglichst gering zu halten, die bei der Signalamplifikation unweigerlich auftreten, wurde die HCl-Konzentration von bisher 0,02 M auf 0,05 M erhöht.

4.4.2 Lokalisation der 18-25S und 5S ribosomalen RNA Gene

Die Loci der Gene für die ribosomale 18S-25S RNAs sowie die 5S RNA wurden auf den Polytänchromosomen von *Phaseolus* bereits mittels radioaktiver ISH und FISH lokalisiert (Avanzi et al. 1972; Durante et al. 1977; Schumann et al. 1990; Tagliasacchi et al. 1993; Nenno et al. 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Loci der beiden rDNAs neu bestimmt, um sie anhand des hier beschriebenen Idiogramms auf der cytogenetischen Karte zu kartieren (vgl. Abbildung 19). Die Signale der 18S-25S rDNA wurden auf den drei NO-Chromosomen A, I und K jeweils an terminaler Position lokalisiert. Entsprechend dem Kondensationsgrad des Chromatins der NOR (vgl. Schema in Abbildung 20) waren die Signale in dichtem Chromatin stark bzw. in aufgelockertem Chromatin schwächer und ließen die Signalpunkte fast einzeln wie „Perlen an einer Kette aufgereiht" erkennen (vgl. Abbildung 13a).

Die 5S rDNA liegt nach den hier vorgelegten Ergebnissen mit je einem Locus im Bereich des cHC auf den NO-Chromosomen I und K. Durante et al. (1977) beschrieben die 5S rDNA-Loci auf Chromosom I und VI. Auf Chromosomen I (vermutlich K) fanden sie die Signale im proximalen Heterochromatin (=cHC). Auf Chromosom VI jedoch, beobachteten sie zwei Loci. In 43% der Fälle lagen die Signale im proximalen Heterochromatin (=cHC), in 53% der Fälle auf einer großen interkalaren Heterochromatinbande des langen Arms und in 3% der Fälle zeigten sich Signale an beiden zuvor genannten Loci gleichzeitig. Die Autoren wiesen allerdings auch darauf hin, daß sie das Chromosom VI nicht in allen Kernen identifizieren konnten. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß Verwechslungen mit anderen Chromosomen für das Auftreten der Signale an unterschiedlichen Orten verantwortlich sind. Sie hybridisierten auch mit 18S, 5,8S und 25S ribosomaler RNA. Es konnte aber nur ein Chromosomenpaar beobachtet werden, das sowohl einen 18S-25S als auch einen 5S rDNA-Locus aufwies. Wie die hier vorgestellten Ergebnisse der Doppelhybridisierung mit beiden rDNA-Sonden zeigen konnte, tragen zwei Chromosomen jeweils einen 18S-25S und 5S rDNA-Locus (vgl. Abbildung 13).

4.4.3 Verteilung von Mikrosatelliten

Die Verteilung von Mikrosatelliten-Motiven auf Chromosomen von *Phaseolus* wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht (vgl. Abschnitt 3.5.2) und ihre Loci in die cytogenetische Karte (vgl. Abbildung 19) eingetragen.

Die Loci der 12 untersuchten Mikrosatelliten wiesen z. T. große Unterschiede in ihrer Signalstärke auf. Einige Signale bestanden aus Ansammlungen von nur wenigen Signalpunkten, während andere größere Bereiche im cHC ausfüllten. Je schwächer die Signale waren, um so unregelmäßiger war im allgemeinen auch ihr Auftreten. Es wurden daher nur regelmäßig auftretende Loci berücksichtigt. Dies bedeutet, daß es außer den hier beschriebenen Loci noch weitere, schwächere gibt, die aber aufgrund ihres variablen Erscheinens hier Außeracht gelassen wurden.

Für die Frage nach der Verteilung der Mikrosatelliten im Eu- und Heterochromatin wurden insgesamt 57 Loci der 12 Motive ausgewertet (vgl. Tabelle 9). Signale in den NOR wurden hierbei nicht berücksichtigt. Die Mehrzahl der Mikrosatelliten-Loci (32) fanden sich im cHC, aber auch im Euchromatin wurden 25 Loci beobachtet. Ferner sind die Motive nicht gleichmäßig über die Chromosomen verteilt. Die meisten Motive kommen auf mehreren Chromosomen vor, während einige auf nur zwei oder drei Chromosomen zu finden sind (z. B. auf zwei: $(GATA)_4$, $(GACA)_4$; auf drei: $(AAT)_5$, $(CAC)_5$). Das Motiv $(AATG)_4$ ist gar im cHC aller elf Polytänchromosomen verbreitet. Ebenso variiert die Anzahl der Loci eines Motivs auf verschiedenen Chromosomen. Beispielsweise kommt $(CAC)_5$ auf drei Chromosomen nur jeweils an einer Stelle vor, wohingegen $(AG)_8$ auf den insgesamt vier Chromosomen A, B, C und K jeweils 2, 3, 3 und 1 mal auftritt. Letztere Beobachtung scheint nicht ungewöhnlich, da (Wang et al. 1994) durch Datenbanksuche in bekannten DNA-Sequenzen von Pflanzen das $(AG)_n$-Element als das dritthäufigste Mikrosatelliten-Motiv nach $(AT)_n$ und $(A)_n$ beschrieben hat.
Die Auswertung der drei Motive $(C)_{16}$, $(GC)_8$ und $(GCC)_5$ nehmen eine Sonderstellung ein. Bei der Detektion der beiden ersten, $(C)_{16}$ und $(GC)_8$ ergab die Hybridisierung unter den errechneten Hybridisierungs- und Waschtemperaturen (T_h=59°C) keine Signale. Erst unter weniger

stringenten Bedingungen (T_h=40°C und 50°C) wurden Hybridisierungssignale sichtbar. Die Loci der Motive unter den beiden niedrig stringenten Temperaturen unterschieden sich nicht, außer daß die Signalintensität bei der höheren Temperatur von 50°C etwas schwächer war. Das 3'-getailte $(C)_{16}$-Oligonukleotid wurde ebenfalls unter niedrig stringenten Bedinungen hybridisiert und gewaschen. Die Ergebnisse der Signale von GC-reichen Sequenzen sind daher nur eingeschränkt mit den Ergebnissen der anderen neun Mikrosatelliten-Motive, die alle unter hoher Stringenz (T_h=T_m-5°C), hybridisiert und gewaschen worden waren, vergleichbar. Dennoch erlauben sie einen ersten Hinweis, daß auch die GC-reichen Sequenzen in allen Abschnitten der Chromosomen vorkommen: direkt im cHC (z. B. $(GCC)_5$: Chromosom B, C und K), im Randbereich des cHC (z. B. $(C)_{16}$: Chromosom H und J), am Übergang zwischen cHC und Euchromatin (z. B. $(C)_{16}$: Chromosom B und I) sowie im Euchromatin (z. B. $(C)_{16}$: Chromosom K; GCC5: Chromosom B).

Die Verteilung der Motive innerhalb des cHC wurde genauer analysiert (vgl. Abschnitt 3.5.5). Dabei wurde nach ihrem Vorkommen in den starken DAPI-Banden oder in den übrigen cHC-Bereichen unterschieden. Es ließ sich beobachten, daß im Bereich der starken DAPI-Banden mehr Signale von AT-reichen Mikrosatelliten-Motive und gleichzeitig weniger GC-reiche zu finden waren, als in den übrigen cHC-Bereichen (vgl. Tabelle 11). Dieser Befund stimmt gut mit der erhöhten DAPI-Fluoreszenz überein. Es erklärt auch, daß die Bereiche der starken DAPI-Banden nach DAPI/PI-Färbung aufgrund ihres höheren Anteils an AT-reichen Sequenzen weiß erscheinen, während die benachbarten cHC-Abschnitte wegen ihres erhöhten Anteils an GC-reichen Sequenzen mehr Rot von PI aufweisen, so daß diese Regionen rosafarben erscheinen.

Auffällig ist die Anhäufung der Loci von neun verschiedenen Motiven im cHC von Chromosom B, im Bereich der starken DAPI-Bande an Position Bq21 (vgl. Abbildung 19). Obwohl es bisher nicht gelang, durch die gleichzeitige Hybridisierung mit mehreren Oligonukleotid-Sonden eine Kolokalisation mit eindeutigen Signalen durchzuführen, zeigen die Signale der verschiedenen Motive an der Chromosomenposition Bq21, daß die Motive an dieser Stelle gehäuft vorliegen. Ähnliche Häufungen von mehr als drei Mikrosatelliten-Motiven treten auch an den Position Aq21.3, Aq31 und Kq21-23 auf.

Die beiden Motive $(GATA)_4$ und $(GACA)_4$ kommen auf zwei Chromosomen an den selben Stellen vor. Allerdings weist $(GATA)_4$ auf Chromosom A zwei Loci auf, während $(GACA)_4$ auf diesem Chromosom nur einen Locus zeigt. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen des DNA-Fingerprinting bei *Phaseolus*, wonach die beiden Motive in überwiegend gemeinsamen Filterhybridisierungs-Banden detektiert wurden (Hamann et al. 1995). Von 305 Restriktionsfragmenten die bei Hybridisierung mit $(GACA)_4$ Banden aufwiesen, zeigten 296 auch Banden mit $(GATA)_4$. Umgekehrt ließen von 1635 Fragmenten mit $(GATA)_4$-Banden, 296 auch Banden mit $(GACA)_4$ erkennen. Damit zeigt $(GATA)_4$ sowohl bei der FISH als auch beim DNA-Fingerprinting mehr Loci bzw. Banden als $(GACA)_4$, und an (fast) allen Loci bzw. Banden an denen $(GACA)_4$ vorkommt, läßt sich auch das Motiv $(GATA)_4$ nachweisen. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen von Sequenzanalysen von klonierten Restriktionsfragementen (3,8-11 kb) von *Lycopersicon* überein, in denen $(GATA)_4$ und $(GACA)_4$ gemeinsam vorkommen. Außer diesen beiden Elementen enthielten die Fragmente weitere, ähnliche Mikrosatelliten-Motive (sog. „degenerierte GATA"), von denen angenommen wird, daß sie durch Punktmutationen aus dem GATA-Element entstanden sind (Vosman und Arens 1997).

Bemerkenswert ist bei *Phaseolus* ferner die Lokalisation der beiden Motive $(CA)_8$ und $(CAC)_5$ an den drei NO-Chromosomen A, I und K jeweils im kondensierten Chromatin der NOR (vgl. Abbildung 15c). Da an den selben Stellen auch die Gene der ribosomalen 18S-25S RNAs zu finden sind, müßten die beiden Mikrosatelliten-Motive zwischen den ribosomalen RNA-Genen eingestreut liegen. Ein vergleichbares gemeinsames Vorkommen des Motiv $(GACA)_4$ in den NOR auf Chromosomen von Mensch, Gibbon, Orang-Utan und Schimpanse wurde bereits von Nanda et al. (1991) beschrieben. Bei *Arabidopsis thaliana* zeigte der Mikrosatellit $(GA)_{38}$ bzw. das Oligonukleotid $(GA)_{12}$ an zwei der fünf Chromosomenpaare starke Signale, die vermutlich im Bereich der NORs liegen. Auf den anderen Chromosomen finden sich die Loci von $(GA)_n$ nur mit schwächere Signalintensität im paracentromerischen Heterochromatin (Brandes et al. 1997).

Obwohl fast alle der 12 verwendeten Mikrosatelliten-Motive auf den Polytänchromosomen von *Phaseolus* mehrere Loci aufwiesen, zeigte kein Element auf allen Chromosomen ein Hybridisierungsmuster, das zur Identifizierung geeignet wäre. Damit ist der sog. GAA-Satellit bisher der einzige Fall, wo Mikrosatelliten-Motive erfolgreich zur Karyotypisierung eingesetzt werden konnten (Pedersen et al. 1996).

Weitere Untersuchungen zur Verteilung verschiedener Mikrosatelliten-Motive wurden an pflanzlichen Metaphasechromosomen von *Beta vulgaris* (Schmidt und Heslop-Harrison 1996) und *Cicer arietinum* (Gortner et al. 1998) durchgeführt. Motive, die sowohl in einer der beiden genannten als auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind $(AT)_8$, $(AG)_8$, $(CA)_8$, $(GATA)_4$ und $(GACA)_4$. Vergleicht man ihre chromosomale Verteilung, zeigen sich mehr Gemeinsamkeiten zwischen *Beta* und *Cicer* ($(TA)_{9/10}$, $(CA)_8$, $(GATA)_4$) als zwischen diesen und *Phaseolus* (nur $(GATA)_4$). Das Motiv $(GATA)_4$ zeigt als einziges Motiv bei allen drei untersuchten Species eine gewisse Übereinstimmung. Es liegt an einigen Chromosomen von *Beta* (6), *Cicer* (4) und *Phaseolus* (2) mit starken Signalen im centromerischen Heterochromatin und zeigt zusätzlich schwache Signale in euchromatischen Regionen (bei *Phaseolus* aber nur auf einem Paar). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich bei $(GATA)_4$ um ein, evolutiv gesehen, „altes" Mikrosatelliten-Motiv handelt (Vosman und Arens 1997).
Aussagekräftige Verallgemeinerungen über die chromosomale Verteilung von Mikrosatelliten-Motive auf pflanzlichen Chromosomen lassen sich aufgrund der geringen Zahl von bisher verfügbaren Vergleichsdaten (drei Motive $(TA)_{9/10}$, $(CA)_8$, $(GATA)_4$ bei drei Arten) noch nicht

treffen. Dazu müßten noch weitere der 49 Mikrosatelliten-Motive bestehend aus Mono-, Di-, Tri- und Tetranukleotiden (Depeiges et al. 1995) untersucht werden.

4.4.4 Lokalisation der Minisatelliten

Die beiden klassischen Minisatelliten, die sog. „Jeffrey-Sonde", eine 33bp-Wiederholungseinheit (*repeat*) aus einem Intron des humanen Myoglobin-Gens (Jeffreys et al. 1985) und das interne *repeat* des Protein III-Gens des Bakteriophagen M13 (Vassart et al. 1987) enthalten jeweils eine 16 bzw. 15 Nukleotid-lange *Core*-Consensus-Sequenz. Synthetische Oligonukleotide der Consensus-Sequenzen (hier mit „33con" und „M13con" abgekürzt) wurden als Sonden verwendet, um ihre Verteilung auf den Polytänchromosomen zu untersuchen. Die Signale der 33con-Sonde lagen terminal auf dem tHC auf allen Chromosomen, wohingegen die Loci der M13con-Sonde im cHC aller Humanchromosomen, insbesondere im Bereich der starken DAPI-Banden, beobachtet wurden (vgl. Beispiele in Abbildung 18b und c).

Mit Hilfe von Kopplungsgruppen-Analysen wurde bei *Phaseolus vulgaris* die Position des M13-Minisatelliten an den Enden der zwei genetischen Kopplungsgruppen (D3 und D10) ermittelt, und man vermutete daher eine terminale chromosomale Lokalisation (Stockton und Gepts 1994; Sonnante et al. 1994). Die hier festgestellten Loci der M13con-Sonde im cHC der Polytänchromosomen von *P. coccineus* scheinen dem zu widersprechen. Allerdings bestand die zugrundliegende RFLP-Karte aus 15 Kopplungsgruppen (Nodari et al. 1993). Da es aber nur 11 Chromosomenpaare gibt, bleibt unklar, welche der 15 einer kompletten Kopplungsgruppe entsprechen und welche Fragmente darstellen, die einer anderen Gruppe zugerechnet werden müssen. Sollte sich herausstellen, daß die Gruppen D3 und D10 Fragmente sind, bleibt noch offen, ob die M13-Loci in vollständigen Kopplungsgruppen noch immer an den Enden liegen.

Die Verteilung des 33bp-*repeats* sowie des M13-Minisatelliten auf Humanchromosomen sind bekannt. Die Signale der 33.15-Sonde sind präferentiell in der Telomerregion angehäuft (Royle et al. 1988), was ebenso auf die Verteilung bei den Polytänchromosomen von *P. coccineus* zutrifft. Die Signale von M13 sind jedoch über alle Humanchromosomen, ähnlich einem R-Bänderungsmuster, verteilt (Christmann et al. 1991), was mit der Lokalisation im cHC der *Phaseolus* Polytänchromosomen nicht übereinstimmt.

4.4.5 *Arabidopsis* Telomer-Sequenz

Die Hybridisierung mit der Telomer-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* $(TTTAGGG)_n$ (Richards und Ausubel 1988), die auch bei zahlreichen anderen Pflanzen vorkommt (Fuchs et al. 1995), zeigte ebenso an allen Enden der Polytänchromosomen von *Phaseolus* Signale. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit einer früheren Beobachtung an *Phaseolus*-Polytänchromosomen, bei der als Sonde die unter Vertebraten verbreitete Telomer-Sequenz $(TTAGGG)_n$ (Meyne J. et al. 1989) verwendet wurde (Nagl 1991).

4.5 Vergleich mit Metaphasechromosomen

Charakterisierungen von Metaphasechromosomen von *P. coccineus* (s. Größenvergleich in Abbildung 5c und d) wurden in erster Linie mit Hilfe von Giemsa-C-Bänderung durchgeführt (Bhattacharya 1978; Mok und Mok 1976; Schweizer und Ambros 1979; Zheng et al. 1991). Berichte von Fluorochrom-Bänderungen sind selten und ihre Ergebnisse erlaubten keine Klassifizierung der einzelnen Chromosomen (Schweizer 1976b; Zheng et al. 1993). Ein erstes Idiogramm für DAPI-gebänderte Metaphasechromosomen von *P. coccineus*, das eine Identifizierung ermöglicht und darüber hinaus Angaben über die Loci der 18S-25S sowie der 5S rDNA (s. u.) macht, ist zur Veröffentlichung eingereicht (Moscone et al., Schweizer, persönl. Mitteilung). Es wurde mir von den Autoren freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vergleich der DAPI-gebänderten Meta- und Polytänchromosomen zeigt eine gewisse Übereinstimmung, vor allem hinsichtlich der Bänderungsmuster der drei NO-Chromosomen.

ISH mit 18S-25S rDNA und 5S rDNA

Der Nachweis von 18S-25S rDNA an Metaphasechromosomen von *P. coccineus* mittels FISH beschränkte sich bisher auf Berichte über die Anzahl von Loci. Zheng et al. (1994) beobachteten 4 Chromosomen mit einem Locus, während Guerra et al. (1996) auf 6 Metaphasechromosomen ein Signal der 18S-25S rDNA nachweisen konnte. Eine Unterscheidung war aufgrund ihrer Ähnlichkeit nicht möglich (Guerra et al. 1996). Neue Ergebnisse von Moscone et al. (Schweizer, persönliche Mitteilung) zeigen ebenfalls auf drei Chromosomenpaaren 18S-25S rDNA-Signale und auf zweien davon konnten auch 5S rDNA-Loci nachwiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit an Polytänchromosomen, bei denen die 18S-25S rDNA auf den drei Polytänchromosom A, I und K liegen und auf zwei von ihnen (I und K) auch die Loci der 5S rDNA zu finden sind (bezüglich der Zuordnung Meta-/Polytänchromosomen s. o.)

4.6 Ausblick

Für die Polytänchromosomen von *Phaseolus coccineus* wird mit dieser Arbeit erstmals ein vollständiges Karyogramm sowie ein neues Idiogramm vorgelegt. Letzteres könnte insbesondere im Hinblick auf die zunehmende physikalische Kartierung und dem Vergleich der Position von Genen bzw. molekularen Markern auf physikalischer, genetischer und cytogenetischer Ebene eine wichtige Rolle spielen. Denn die rund 30mal längeren Polytänchromosomen bieten eine höhere Auflösung bei der chromosomalen Lokalisation als mitotische Chromosomen.

Die Übertragbarkeit der Identifikation anhand des cHC-Bereich von Polytän- auf Metaphasechromosomen ist jedoch vermutlich nur eingeschränkt möglich. Erfolgversprechender erscheint der Versuch, sie an den weniger stark kondensierten mitotischen Pro-, bzw. Prometaphase anzuwenden. Damit ließen sich nicht nur die Arten mit besonders ausgeprägten Polytänchromosomen identifzieren sondern, möglicherweise auch alle anderen 55 *Phaseolus*-Arten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die 22 Polytänchromosomen aus dem Embryosuspensor der unreifen Samen von *Phaseolus coccineus* wurden seit ihrer Entdeckung durch (Nagl 1962a) in zahlreichen Untersuchungen näher beschrieben. Ihre strukturelle Variabilität, insbesondere die variierende Länge der euchromatischen Bereiche und das nur gelegentliche Auftreten von interkalaren Heterochromatin-Banden erschwerte jedoch die Identifizierung.
Es wurde daher nach einem zuverlässigeren Merkmal zur Klassifizierung der Polytänchromosomen gesucht. Zunächst wurde die Präparationstechnik für die *Phaseolus*-Polytänchromosomen weiterentwickelt, was zu einer verbesserten Spreitung beitrug und in einer besseren Erhaltung der Chromosomen resultierte. Desweiteren wurde die Bedeutung des centromerischen Heterochromatins (cHC) als Identifikationsmerkmal entdeckt. Das cHC bleibt einerseits von präparationsbedingten Streckungsartefakten weitgehend unbehelligt, aber weist dennoch eine chromosomenspezifische Ausprägung unterschiedlicher Merkmale auf. Ein markantes Merkmal im cHC eines jeden Chromosoms ist eine starke DAPI-Bande, die allerdings erst nach der Vorbehandlung mit Pepsin/HCl deutlich hervortritt. Die Klassifizierung anhand des cHC erlaubte erstmalig die Erstellung eines Karyogramms und führte zu einem Idiogramm der DAPI-gebänderten Polytänchromosomen. Verwendet man zur Färbung ein Gemisch aus DAPI und Propidiumiodid (DAPI/PI), lassen sich die Chromosomenabschnitte auch farblich differenzieren.

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wurden die Gene der ribosomalen 18S-25S und 5S RNAs sowie die Phaseolin-Gene auf den DAPI-gebänderten Polytänchromosomen neu kartiert. Ferner wurde durch FISH die Verteilung von 12 Mikrosatelliten-Motiven, zwei Minisatelliten-Sequenzen und der *Arabidopsis*-Telomer-Sequenz mit synthetischen Oligonukleotiden als Sonden untersucht. Die Loci der Mikrosatelliten lagen überwiegend im Heterochromatin, kamen aber auch im Euchromatin vor. Keines der untersuchten Mikrosatelliten-Motive zeigte ein spezifisches Hybridisierungsmuster, anhand dessen eine eindeutige Identifizierung aller Polytänchromosomen möglich gewesen wäre. Auffällig hingegen war das Auftreten von neun Motiven im Bereich der starken DAPI-Bande auf Chromosom B. Außerdem gibt es Hinweise, daß die starken DAPI-Banden allgemein einen höheren Anteil an AT-reichen Sequenzen aufweisen als die sonstigen Abschnitte des cHC. Die Minisatelliten-Sequenzen waren jeweils entweder in cHC oder an den Telomeren lokalisiert. Die *Arabidopsis*-Telomer-Sequenz zeigte ebenfalls Signale nur an den Chromosomenenden. Die Loci der verschiedenen Mikorsatelliten-Motive wie auch die von rDNA und der Phaseolin-Gene, wurden zu einer ersten cytogenetischen Karte von *Phaseolus coccineus* zusammengestellt.

6 LITERATUR

Ali S., Epplen J. T. (1991) DNA fingerprinting of eukaryote genomes by synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. Indian J. Biochem. Biophys. 28: 1-9.

Ali S., Müller C. R., Epplen J. T. (1986) DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. Hum. Genet. 74: 239-243.

Ammermann D. (1971) Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma 33: 209-238.

Andreucci A. C., Castiglione M. R., Tagliasacchi A. M. (1994) RNA synthesis and immunogold localization of 5-methylcytosine rich regions in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* embryo suspensor, at two stages of embryogenesis. Cytobios 78: 99-113.

Arrighi F. E., Hsu T. C. (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenetics 10: 81-86.

Avanzi S., Cionini P. G., D'Amato F. (1970) Cytochemical and autoradiographic analyses on the embryo suspensor cells of *Phaseolus coccineus*. Caryologia 23: 605-638.

Avanzi S., Durante M., Cionini P. G., D'Amato F. (1972) Cytological localization of ribosomal cistrons in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. Chromosoma 39: 191-203.

Balbiani E. G. (1881) Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. Zool. Anz. 4: 637-641, 662-666.

Balbiani E. G. (1890) Sur la structure intime du noyau du *Loxophyllum melegaris*. Zool. Anz. 13: 110-115, 132-136.

Ballard S. G., Ward D. C. (1993) Fluorescence *in situ* hybridization using digital imaging microscopy. J. Histochem. Cytochem. 41: 1755-1759.

Baumann A. (1991) Charakterisierung von Riesenchromosomen aus dem Suspensor von *Phaseolus coccineus* L. durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung: Lokalisation Phaseolin-kodierender Sequenzen und ribosomaler Gene. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.

Baumann J. G. J., Wiegant J., Van Dujin P., Lubsen N. H., Sondermeijer P. J. A., Henning W., Kubli E. (1981) Rapid and high resolution detection of *in situ* hybridisation to polytene chromosomes using fluorochrome-labeled RNA. Chromosoma 84: 1-18.

Bhattacharya S. (1978) Giemsa-Banding of Chromosomes in *Phaseolus vulgaris* L. Cytologia 43: 581-588.

Birnboim H. C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100: 243-355.

Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523.

Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Crosa J. H., Falkow S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95-113.

Brady T. (1973) Feulgen cytophotometric determination of the DNA content of the embryo proper and suspensor cells of *Phaseolus coccineus*. Cell Differ. 2: 65-75.

Brady T., Clutter M. E. (1972) Cytolocalization of ribosomal cistrons in plant polytene chromosomes. J. Cell Biol. 53: 827-832.

Brady T., Clutter M. E. (1974) Structure and replication of *Phaseolus* polytene chromosomes. Chromosoma 45: 63-79.

Brandes A., Thompson H., Dean C., Heslop-Harrison J. S. (1997) Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric region of *Arabidopsis thaliana* L. Chromosome Res. 5: 238-246.

Bridges C. B. (1935) Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 26: 60-64.

Britten R. J., Kohne D. E. (1968) Repeated sequences in DNA. Science 161: 529-540.

Buongiorno-Nardelli M., Amaldi F. (1970) Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. Nature 225: 946-947.

Busch W., Martin R., Herrmann R. G., Hohmann U. (1995) Repeated DNA sequences isolated by microdissection .1. Karyotyping of barley (*Hordeum vulgare* L.). Genome 38: 1082-1090.

Caspersson T., Zech L., Modest E., Foley G. E., Wagh U., Simmonsson E. (1969) Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. 58: 128-140.

Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 371: 215-220.

Christmann A., Lagoda P. J. L., Zang K. D. (1991) Non-radioactive *in situ* hybridization pattern of the M13 minisatellite sequences on human chromosomes. Hum. Genet. 86: 487-490.

Cionini P. G., Avanzi S. (1972) Pattern of binding of tritiated actinomycin D to *Phaseolus coccineus* polytene chromosomes. I. Nucleolus organizing chromosomes. Exp. Cell. Res. 75: 154-158.

Cionini P. G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M. (1982) Comparison of homologous polytene chromosomes in *Phaseolus coccineus* embryo suspensor cells: morphological, autoradiographic and cytophotometric analyses. Chromosoma 86: 383-396.

Conger A. D., Fairchild L. M. (1953) A quick freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28: 281-283.

Dann O., Bergen G., Demant E., Voltz G. (1971) Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. Liebigs Ann. Chemi. 749: 68-89.

Darlington C. D. (1937) Recent Advances in Cytology. London, Chruchill.

Depeiges A., Goubely C., Lenoir A., Cocherel S., Picard G., Raynal M., Grellet F., Delseny M. (1995) Identification of the most represented repeated motifs in *Arabidopsis thaliana* microsatellite loci. Theor. Appl. Genet. 91: 160-168.

Durante M., Cionini P. G., Avanzi S., Cremonini R., D'Amato F. (1977) Cytological localization of the genes for the four classes of ribosomal RNA (25S, 18S, 5.8S and 5S) in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. Chromosoma 60: 269-282.

Durante M., Cremonini R., Tagliasacchi A. M., Forino L. M. C., Cionini P. G. (1987) Characterization and chromosomal localization of fast renaturing and satellite DNA sequences in *Phaseolus coccineus*. Protoplasma 137: 100-108.

Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 137: 266-267.

Ferguson M. L., Brown S. E., Knudson D. L. (1996) FISH digital imaging microscopy in mosquito genomics. Parasitol. Today 12: 91-96.

Flavell R. B., O'Dell M., Hutchinson J. (1981) Nucleotide sequence organization in plant chromosomes and evidence for sequence translocation during evolution. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45: 501-508.

Forino L. M. C., Tagliasacchi A. M., Avanzi S. (1979) Different structure of polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* suspensors during early embryogenesis 1. Nucleolus organizing chromosome pairs S_1 and S_2. Protoplasma 101: 231-246.

Frediani M., Cremonini R., Salvi G., Caprari C., Desiderio A., D'Ovidio R., Cervone F., De Lorenzo G. (1993) Cytological localization of the PGIP genes in the embryo suspensor cells of *Phaseolus vulgaris* L. Theor. Appl. Genet. 87: 369-373.

Frediani M., Tagliasacchi A. M., Durante M., Avanzi S. (1986) Distribution of 5-Methylcytosine-rich regions in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* embryo suspensor as shown by the immunoperoxidase technique. Exp. Cell Res. 167: 337-342.

Freed H. J., Grant W. F. (1976) Polytene chromosomes in the suspensor of *Lotus* (Fabaceae). Caryologia 29: 387-390.

Fuchs J., Brandes A., Schubert I. (1995) Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. Pl. Syst. Evol. 196: 227-241.

Gall J. G., Pardue M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63: 378-383.

Gerlach W. L., Bedbrook J. R. (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucl. Acids Res. 7: 1869-1885.

Gerlach W. L., Dyer T. A. (1980) Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat that contain 5S rRNA genes. Nucl. Acids Res. 8: 4851-4865.

Givens J. F., Phillips R. L. (1976) The nucleolus organizer region of maize (*Zea mays* L.) - Ribosomal RNA gene distribution and nucleolar interactions. Chromosoma 57: 103-117.

Gortner G., Nenno M., Weising K., Zink D., Nagl W., Kahl G. (1998) Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the *Arabidopsis*-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. Chromosome Res. 6: 97-104.

Guerra M., Carvalheira G. M. G. (1994) Occurrence of polytene chromosomes in the anther tapetum of *Vigna unguiculata* (L) Walp. J. Hered. 85: 43-46.

Guerra M., Kenton A., Bennett M. D. (1996) rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of *Vigna unguiculata* (L.) Walp and *Phaseolus coccineus* L. revealed by *in situ* hybridization. Ann. Bot. 78: 157-161.

Hall T. C., Slightom J. L., Ersland D. R., Murray M. G., Hoffman L. M., Adang M. J., Brown J. W. S., Ma Y., Matthews J. A., Cramer H. H. and others. (1983) Phaseolin: Nucleotide sequence explains molecular weight and charge heterogeneity and also assists vector construction for gene expression in alien tissue. In: Ciferri O., Dure L. (Eds.) Structure and Functions of Plant Genomes. New York, Plenum Press. 123-141.

Hamann A., Zink D., Nagl W. (1995) Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. Genome 38: 507-515.

Hasitschka G. (1956) Bildung von Chromosomenbündeln nach Art der Speicheldrüsenchromosomen, spiralisierte Ruhekernchromosomen und andere Struktureigentümlichkeiten in den endopolyploiden Riesenkernen der Antipoden von *Papaver rhoeas*. Chromosoma 8: 87-113.

Hasitschka-Jenschke G. (1961) Das Längenverhältnis der eu- und heterochromatischen Abschnitte riesenchromosomenartiger Bildungen verglichen mit dem der Prophase-Chromosomen bei *Bryonia dioica*. Chromosoma 12: 466-483.

Heitz E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. Jahrb. Wiss. Bot. 69: 762-818.

Heitz E. (1929) Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 47: 274-284.

Heitz E. (1931) Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nucleolen. Planta 12: 775-844.

Heitz E., Bauer H. (1933) Beweise für die Chromosomennatur der Kernschleifen in den Knäuelkernen von *Bibio hortulanus* L. Z. Zellforsch. 17: 67-82.

Heng H. H. Q., Spyropoulos B., Moens P. B. (1997) FISH technology in chromosome and genome research. Bioessays 19: 75-84.

Hertwig O. (1906) Allgemeine Biologie. 2. Auflage Auflg. Jena.

Hilwig I., Gropp A. (1972) Staining of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes with a new fluorochrome. Exp. Cell Res. 75: 122-126.

Hinnisdaels S., Farbos I., Del-Favero J., Veuskens J., Jacobs M., Mouras A. (1994) *In situ* hybridization to plant metaphase chromosomes using digoxigenin labeled nucleic acid sequences. In: Gelvin S. B., Schilperoort R. A. (Eds.) Plant Molecular Biology Manual. 2nd . Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. G2: 1-13.

Hochstrasser M., Sedat J. W. (1987) Three-Dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei .I. Tissue-specific aspects of polytene nuclear architecture. J. Cell Biol. 104: 1455-1470.

Huang W. M., Gibson J. J., Facer P., Gu J., Polak J. M. (1983) Improved section adhesion for immunohistochemistry using high molecular weight polymers of L-Lysine as a slide coating. Histochemistry 77: 275-279.

ISCN. (1995) Mitelman F. (Ed.) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature - Recommendations of the International Standing Commitee on Human cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennesee, USA, October 9-13, 1994. Basel, S. Karger. 1-114.

Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314: 67-73.

Jiang J. M., Gill B. S. (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: The first 10 years. Genome 37: 717-725.

Jiang J. M., Gill B. S. (1996) Current status and potential of fluorescence *in situ* hybridization in plant genome mapping. In: Paterson A. H. Genome Mapping in Plants. Georgetown, Landes Company. 127-135.

Joachimiak A., Kula A., Grabowska-Joachimiak A. (1997) On heterochromatin in karyosystematic studies. Acta Biol. Cracov. Botanica 39: 69-77.

John H. A., Birnstiel M. L., Jones K. W. (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223: 582-587.

Kagiyama N., Fujita S., Momiyama M., Kondoh Y., Nishiyauchi M., Hori S. H. (1995) A novel fluorogenic substrate for alkaline phosphatase for the use of nucleic acid hybridization histochemistry and cytochemistry. Acta Histochem. Cytochem. 28: 581-589.

Kahl G. (1995) Dictionary of Gene Technology. Weinheim, VCH.

Kipling D., Wilson H. E., Mitchell A. R., Taylor B. A., Cooke H. J. (1994) Mouse centromere mapping using oligonucleotide probes that detect variants of the minor satellite. Chromosoma 103: 46-55.

Klett T. (1992) Quantitative Chromatincharakterisierung: DNA-Thermodenaturierungskinetiken fluorochromierter Zellen im Druchflußzytofotometer. Dissertation, Fakultät für Theoretische Medizin der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg.

Köhler M. (1992) Etablierung eines auf Digoxigenin aufbauenden Detektionssystems für die In-situ-Hybridisierung an Riesenchromosomen aus dem Suspensor von *Phaseolus coccineus* L. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.

Kostoff D. (1930) Discoid structure of the spireme and irregular cell division in *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 21: 323-324.

Krishan R., De D. N. (1965) Studies on pachytene and somatic chromosomes of *Phaseolus aureus*. Nucleus 8: 7-16.

Langer-Safer P., Levine M., Ward D. C. (1982) Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4381-4385.

Lavania U. C. (1998) Fluorescence *in situ* hybridization in genome, chromosome and gene identification in plants. Curr. Sci. 74: 126-133.

Le Beau M. M. (1996) One FISH, two FISH, red FSIH, blue FISH. Nature Genetics 12: 341-344.

Lefevre G. Jr. (1976) A photographic representation and interpretation of the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands. In: Ashburner M., Novitski E. (Eds.) The Genetics and Biology of Drosophila.Volume 1a. London, Academic Press. 32-66.

Leitch A. R., Mosgöller W., Shi M., Heslop-Harrison J. S. (1992) Different patterns of rDNA organization at interphase in nuclei of wheat and rye. J. Cell Sci. 101: 751.

Leitch A. R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I. J. (1994) *In Situ* Hybridization - A Practical Guide. Oxford, BIOS Scientific Publishers Limited.

Levan A., Fredga K., Sandberg A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Levan A., Hauschka T. S. (1953) Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. J. Nat. Cancer Inst. 14: 1-43.

Lichter P., Boyle A. A., Cremer T., Ward D. C. (1991) Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic *in situ* hybridization. Genet. Anal. Tech. Appl. 8: 24-35.

Lin M. S., Comings D. E., Alfi O. S. (1977) Optical studies of the interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. Chromosoma 60: 15-25.

Lohe A. R., Hilliker A. J., Roberts P. A. (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. Genetics 134: 1149-1174.

Lowenhaupt K., Rich A., Pardue M. L. (1989) Nonrandom distribution of long mono- and dinucleotide repeats in *Drosophila* chromosomes: correlations with dosage compensation, heterochromatin, and recombination. Mol. Cell. Biol. 9: 1173-1182.

Manuelidis L., Langer-Safer P. R., Ward D. C. (1982) High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. J. Cell Biol. 95: 619-625.

McNeil J. A., Villnave Johnson C., Carter K. C., Singer R. H., Bentley Lawrence J. (1991) Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. Genet. Anal. Tech. Appl. 8: 41-58.

Meinkoth J., Wahl G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138: 267-284.

Meyne J., Ratliff R. L., Moyzis R. K. (1989) Conservation of the human telomere sequence $(TTAGGG)_n$ among vertebrates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7049-7053.

Mok D. W. S., Mok M. C. (1976) A modified technique for identifying bean chromosomes. J. Hered. 67: 187-188.

Moscone E. A., Klein F., Lambrou M., Schweizer D. (eingereicht zur Veröffentlichung) Karyotype analysis of some cultivated *Phaseolus* species (*Leguminosae*) by DAPI fluorescent staining and double FISH using rDNA and 5S DNA probes. Genome : xxx.

Moscone E. A., Lambrou M., Ehrendorfer F. (1996) Fluorescent chromosome banding in the cultivated species of *Capsicum* (Solanaceae). Pl. Syst. Evol. 202: 37-63.

Mullis K. B., Faloona F. A., Scharf S. J., Saiki R.K., Horn G. T., Ehrlich H. A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.

Musiani M., Pasini P., Zerbini M., Roda A., Gentilomi G., Gallinella G., Venturoli S. (1998) Chemiluminescence: a sensitive detection system in *in situ* hybridization. Histol. Histopathol. 13: 243-248.

Nagl W. (1962a) 4096-Ploidie und 'Riesenchromosomen' im Suspensor von *Phaseolus coccineus*. Naturwissenschaften 49: 261-262.

Nagl W. (1962b) Über Endopolyploidie, Restituionskernbildung und Kernstrukturen im Suspensor von Angiospermen und einer Gymnosperme. Österr. Bot. Z. 109: 432-494.

Nagl W. (1965) Die SAT-Riesenchromosomen der Kerne des Suspensors von *Phaseolus coccineus* und ihr Verhalten während der Endomitose. Chromosoma 16: 511-520.

Nagl W. (1967) Die Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* L.: Baueigentümlichkeiten, Strukturmodifikationen, zusätzliche Nukleolen und Vergleich mit den mitotischen Chromosomen. Österr. Bot. Z. 114: 171-182.

Nagl W. (1969a) Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. Nature 221: 70-71.

Nagl W. (1969b) Puffing of polytene chromosomes in a plant (*Phaseolus vulgaris*). Naturwissenschaften 56: 221-222.

Nagl W. (1974) The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosomes. Z. Pflanzenphysiol. 73: 1-44.

Nagl W. (1978) Endopolyploidy and Polyteny in Differention and Evolution. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Nagl W. (1981) Polytene Chromosomes of Plants. Int. Rev. Cytol. 73: 21-53.

Nagl W. (1991) Two human DNA sequences (aromatase, telomere) detected in *Phaseolus* (Fabaceae) by respectively blot and *in situ* hybridization. Polish Bot. Stud. 2: 159-164.

Nagl W. (1996) Polytene Chromosomes. In: Fukui K., Nakayama S. (Eds.) Plant Chromosomes: Laboratory Methods. Boca Raton, CRC Press. 51-83.

Nagl W., Jeanjour M., Kling H., Kühner S., Michels I., Müller T., Stein B. (1983) Genome and chromatin organization in higher plants. Bio. Zbl. 102: 129-148.

Nanda I., Zischler H., Epplen C., Guttenbach M., Schmid M. (1991) Chromosomal organization of simple repeated DNA sequences used for DNA fingerprinting. Electrophoresis 12: 193-203.

Nenno M., Nagl W. (1998) Identification of polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* on the basis of centromeric heterochromatin morphology. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 41: 105-106.

Nenno M., Schumann K., Nagl W. (1994) Detection of rRNA and phaseolin genes on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence *in situ* hybridization after pepsin pretreatment. Genome 37: 1018-1021.

Nenno M. (1992) Verbesserte Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) durch Pepsin-Vorbehandlung und Lokalisation von Phaseolin-Genen an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* L. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.

Nodari R. O., Tsai S. M., Gilbertson R. L., Gepts P. (1993) Towards an integrated linkage map of common bean .2. Development of an RFLP-based linkage map. Theor. Appl. Genet. 85: 513-520.

Osterwalder A. (1898) Beiträge zur Embryologie von *Aconitum napellus* L. Flora 85: 254.

Painter T. S. (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. Science 78: 585-586.

Paragas V. B., Zhang Y. Z., Haugland R. P., Singer V. L. (1997) The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. J. Histochem. Cytochem. 45: 345-357.

Pardue M. L., Lowenhaupt K., Rich A., Nordheim A. (1987) $(dC\text{-}dA)_n.(dG\text{-}dT)_n$ sequences have evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. EMBO J 6: 1781-1790.

Paris Conference. (1972) Paris Conference (1971): standardization in human cytogenetics. Birth Defects 8: 1-46.

Pearson M. J. (1974) Polyteny and the functional significance of the polytene cell cycle. J. Cell Sci. 15: 457-479.

Pedersen C., Langridge P. (1997) Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. Genome 40: 589-593.

Pedersen C., Linde-Laursen I. (1994) Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. Chromosome Res. 2: 65-71.

Pedersen C., Rasmussen S. K., Linde-Laursen I. (1996) Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the Triticeae (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. Genome 39: 93-104.

Pinkel D., Straume T., Gray W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2934-2948.

Raap A. K., Vandecorput M. P. C., Vervenne R. A. W., Vangijlswijk R. P. M., Tanke H. J., Wiegant J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. Hum. Mol. Genet. 4: 529-534.

Rayburn A. L., Gill B. S. (1985) Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. J. Hered. 76: 78-81.

Richards E. J., Ausubel F. M. (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thalina*. Cell 53: 127-136.

Rieger R., Michaelis A., Green M. M. (1991) Glossary of Genetics. 5. Auflg. Berlin, Springer-Verlag.

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

Royle N. J., Clarkson R. E., Wong Z., Jeffreys A. J. (1988) Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. Genomics 3: 352-360.

Saiki R. K., Scharf S., Fallona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Second Edition), Vol. 1-3. New York, Cold Spring Harbor Labortatory Press.

Schmidt T., Heslop-Harrison J. S. (1996) The physical and genomic organization of microsatellites in sugar beet. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8761-8765.

Schnedl W. (1971) Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. Chromosoma 34: 448-454.

Schnepf E., Nagl W. (1970) Über einige Strukturbesonderheiten der Suspensorzellen von *Phaseolus vulgaris*. Protoplasma 69: 133-143.

Schumann K., Baumann A., Nagl W. (1990) Localization of phaseolin genes in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* (Leguminosae). Genetica 83: 73-76.

Schwarzacher T., Heslop-Harrison J. S. (1991) *In situ* hybridization to plant telomers using synthetic oligomers. Genome 34: 317-323.

Schweizer D. (1976a) DAPI fluorescence of plant chromosomes prestained with actinomycin D. Exp. Cell Res. 102: 408-413.

Schweizer D. (1976b) Giemsa and fluorochrome banding of polytene chromosomes in *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. In: Jones K., Brandham P. E. (Eds.) Current Chromosome Research. Amsterdam, Elsevier/North-Holland. 51-56.

Schweizer D. (1976c) Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. Chromosoma 58: 307-324.

Schweizer D., Ambros P. (1979) Analysis of nucleolus organizer regions (NORs) in mitotic and polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by silver staining and Giemsa C-banding. Pl. Syst. Evol. 132: 27-51.

Schweizer D., Strehl S., Hagemann S. (1990) Plant Repetitive DNA Elements and Chromosome Structure. In: Fredga K., Kihlmann B. A., Bennet M. D. (Eds.) Chromosomes Today.Volume 10. London, Unwin Hyman. 33-43.

Sen S. (1980) Evidence of coiling cycle in polytenic chromosome of suspensor cell. Nucleus 23: 88-89.

Shang X. M., Wang W. C. (1991) DNA amplification, chromatin variations, and polytene chromosomes in differentiating cells of common bread wheat *in vitro* and roots of regenerated plants *in vivo*. Genome 34: 799-809.

Sheikh S. A., Kondo K. (1995) Differential staining with orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). Am. J. Bot. 82: 1278-1286.

Sonnante G., Stockton T., Nodari R. O., Velasquez V. L. B., Gepts P. (1994) Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris* L). Theor. Appl. Genet. 89: 629-635.

Sorsa V. (1988) Polytene Chromosomes in Genetic Research. Chichester, England, Ellis Horwood Limited.

Speel E. J. M., Ramaekers F. C. S., Hopman A. H. N. (1995) Cytochemical detection systems for *in situ* hybridization, and the combination with immunocytochemistry. 'Who is still afraid of Red, Green and Blue?'. Histochem. J. 27: 833-858.

Stockton T., Gepts P. (1994) Identification of DNA probes that reveal polymorphisms among closely related Phaseolus vulgaris lines. Euphytica 76: 177-183.

Strasburger E. (1887) Das Botanische Practicum - Anleitung zum Selbststudium der mikroskopischen Botanik . 2. Umgearbeitete Auflage . Jena, Gustav Fischer.

Suggs S. V., Hirose T., Miyake T., Kawashima E. H., Johnson M. J., Itakura K., Wallace R. B. (1981) Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In: Brown D. D. (Ed.) Developmental Biology Using Purified Genes. New York, Academic Press. 683-693.

Sumner A. T. (1990) Chromosome Banding. London, Unwin Hyman.

Sumner A. T., Evans H. J., Buckland R. A. (1971) New technique for distinguishing human chromosomes. Nature New Biol. 232: 31-32.

Tagliasacchi A. M., Forino L. M. C., Frediani M., Avanzi S. (1983) Different structure of polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* suspensors during early embryogenesis. Protoplasma 115: 95-103.

Tagliasacchi A. M., Forino L. M. C., Frediani M., Cremonini R., Tucci G., Maggini F., Avanzi S. (1993) Ribosomal RNA genes in *Phaseolus coccineus* .2. Differential distribution of ribosomal cistrons and cytological localization of various replication units in polytene chromosomes of embryo suspensor. Cytobios 75: 137-147.

Tautz D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T., Jeffreys A. J. (Eds.) DNA Fingerprinting State of the Science. Basel, Birkhäuser Verlag. 21-28.

Thein S. L., Wallace R. B. (1986) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Davies K. E. (Ed.) Human Genetic Diseases - A Practical Approach. Oxford, UK, IRL Press. 33-50.

Therman E. (1995) Chromosome behavior in cell differentiation: A field ripe for exploration? Genetics 141: 799-804.

Therman E., Murashige T. (1984) Polytene chromosomes in cultrued pea roots (*Pisum*, Fabaceae). Pl. Syst. Evol. 148: 25-33.

Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: Applications in cytogenetics and gene mapping. Trend. Genet. 7: 149-154.

Tschermak-Woess E., Hasitschka G. (1954) Über die endomitotische Polyploidisierung im Zuge der Differenzierung von Trichomen und Trichozyten bei Angiospermen. Österr. Bot. Z. 101: 79-117.

Tschermak-Woess E. (1956) Notizen über die Riesenkerne und 'Riesenchromosomen' in den Antipoden von *Aconitum*. Chromosoma 8: 114-134.

Vassart G., Georges M., Monsieur R., Brocas H., Lequarre A.S., Christophe D. (1987) A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. Science 235: 683-684.

Viegas-Pequignot E., Dutrillaux B., Magdelenat H., Coppey-Moisan M. (1989) Mapping of single-copy DNA sequences on human chromosomes by *in situ* hybridization with biotinylated probes: Enhancement of detection by intensified-fluorescence digital-imaging microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 582-586.

Vosman B., Arens P. (1997) Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. Genome 40: 25-33.

Voß R. (1992) Expression der Phytohämagglutinin-Gene auf Ebene der mRNA während der Samenentwicklung von *Phaseolus coccineus*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern.

Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D. (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88: 1-6.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Meyer W. (1995) DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. Boca Raton, CRC Press.

Xirau J. V., Siljak-Yakovlev S. (1997) Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L (Asteraceae): Fluorochrome-banded karyotypes of five taxa, including the Iberian endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. Can. J. Bot. 75: 595-606.

Yeung E. C., Clutter M. E. (1978) Embryogeny of *Phaseolus coccineus* growth and microanatomy. Protoplasma 94: 19-40.

Yeung E. C., Clutter M. E. (1979) Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the ultrastructure and development of the suspensor. Can. J. Bot. 57: 120-136.

Yeung E. C., Meinke D. W. (1993) Embryogenesis in Angiosperms - Development of the Suspensor. Pl. Cell 5: 1371-1381.

Zheng J. Y., Irifune K., Hirai K., Nakata M., Tanaka R., Morikawa H. (1994) *In situ* hybridization to metaphase chromosomes in six species of *Phaseolus* and *Vigna* using ribosomal DNA as the probe. J. Pl. Res. 107: 365-369.

Zheng J. Y., Nakata M., Irifune K., Tanaka R., Morikawa H. (1993) Fluorescent banding pattern analysis of 8 taxa of *Phaseolus* and *Vigna* in relation to their phylogenetic relationships. Theor. Appl. Genet. 87: 38-43.

Zheng J., Nakata M., Uchiyama H., Morikawa H., Tanaka R. (1991) Giemsa C-banding patterns in serveral species in *Phaseolus* L. and *Vigna* Savi, Fabaceae. Cytologia 56: 459-466.

Zhimulev I. F. (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes. In: Hall J. C., Dunlap J. C. Advances in Genetics, Vol 34. San Diego, Academic Press Inc. 1-490.

Zischler H., Nanda I., Schäfer R., Schmid M., Epplen J.T. (1989) Digoxigenin oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybridization *in situ*. Hum. Genet. 82: 227-233.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	*base pair*
BSA	*bovine serum albumin*
Cen	Centromer
cHC	centromerisches Heterochromatin
cv.	cultivar
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DG	Deckglas
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde(n)
kb	*kilo base*
min	Minuten
mw	*molecular weight*
nt	Nukleotide
NO	Nukleolus-organisierend
NOR	Nukleolus-organisierende Region
OT	Objektträger
p	Kurzbezeichnung für den kürzeren Chromosomenarm
P.	*Phaseolus*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*; Polymerase-Ketten-Reaktion
PI	Propidiumiodid
q	Kurzbezeichnung für den längeren Chromosomenarm
rDNA	Gene für die ribosomalen 5S oder 18S, 5,8S und 25S RNAs
RNase	Ribonuklease
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SAT	***s**ine **a**cido **t**hymonucleinico*; enthält keine Nukleinsäure (Heitz 1931)
sDB	starke DAPI-Bande
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
sES	sekundäre Einschnürung
SSC	*standard saline citrate*
SSR	*simple sequence repeat*, oder Mikrosatellit
tHC	telomerisches Heterochromatin
T_m	*temperature of melting*
T_h	*temperature of hybridization*
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
wDB	schwächere DAPI-Bande

7.2 Publikationsliste

Veröffentlichungen die während dieser Unteruchung entstanden

Nenno M., Nagl W. (1998) Identification of polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* on the basis of centromeric heterochromatin morphology. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 41: 105-106.

Nenno M., Zink D., Nagl W. (1998) Distribution of simple sequence repeats on *Phaseolus* polytene chromosomes. In: Lelley T. (Ed.) Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement; Tulln, WUV-Universitätsverlag. 109-110.

Nenno M., Zink D., Nagl W. (1998) The *Arabidopsis* telomere sequence is highly abundant in the genome of *Phaseolus acutifolius* and preferentially located in the centromeres. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 41: 103-104.

Gortner G., Nenno M., Weising K., Zink D., Nagl W., Kahl G. (1998) Chromosomal localization and distribution of simple sequence repeats and the *Arabidopsis*-type telomere sequence in the genome of *Cicer arietinum* L. Chromosome Res. 6: 97-104.

Nenno M., Zink D., Nagl W. (1996) Localization of different microsatellites and a minisatellite-like sequence on polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. Annu. Rep. Bean Imp. Coop. 39: 245-246.

Nenno M., Nagl W. (1996) BeanRef -- An electronic collection of refences about research on *Phaseolus* and *Vigna* in the World Wide Web. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 39: 200.

Nagl W., Nenno M. (1995) PHARIS, an integrated electronic database for *Phaseolus*. Grain Legumes 8: 7.

Konferenzbeiträge (Poster und „Abstracts“)

Nenno M., Gortner G., Zink D., Weising K., Kahl G., Nagl W. (1997) Fluorescence *in situ* hybridization with simple sequence repeat probes in *Phaseolus* and *Cicer*. Plant & Animal Genome V; 12.-16. Januar 1997; San Diego, USA. 79.

Nenno M., Zink D., Nagl W. (1997) Mapping of minisatellite core sequences to polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. Physical Mapping of Plant Chromosomes: Aberystwyth Cell Genetics Group 7th Annual Conference. 8.-10. Januar 1997; University of Wales, Aberystwyth, UK. 32.

Nenno M., Nagl W. (1997) Mapping and more: BeanRef , a reference collection for *Phaseolus* and *Vigna* on the Web. Physical Mapping of Plant Chromosomes: Aberystwyth Cell Genetics Group 7th Annual Conference. 8.-10. Januar 1997; University of Wales, Aberystwyth, UK.

Nenno M., Nagl W. (1995) Characterization of polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus* by fluorescence *in situ* hybridization. 2nd European Conference on Grain Legumes Proccedings, 9.-13. Juli 1995: 451.

7.3 Lebenslauf

Name:	Mario Nenno
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

1986 - 1992	Studium der Biologie mit Hauptfach Zellbiologie und Nebenfach Biochemie an der Universität Kaiserslautern Thema der Diplomarbeit: „Verbesserte Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) durch Pepsin-Vorbehandlung und Lokalisation von Phaseolin-Genen an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* L.“
1993 - Juni 1998	Erstellung der Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie der Universität Kaiserslautern