Verbesserte Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) durch Pepsin-Vorbehandlung und Lokalisation von Phaseolin-Genen an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* L.

Diplomarbeit

Abteilung Zellbiologie Fachbereich Biologie Universität Kaiserslautern

Vorgelegt von : Referent : Datum der Abgabe :

Mario Nenno Prof. Dr. Walter Nagl September 1992

Ich erkläre hiermit, daß ich diese Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Kaiserslautern, September 1992

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Nagl für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung der Mittel und seine Unterstützung.

Herrn Klaus Schumann danke ich für seine Betreuung und Diskussionsbereitschaft sowie für die zur Verfügung gestellten Sonden.

Herrn Thomas Becker möchte ich meinen Dank für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft in zahllosen Diskussionen und der Unterstützung bei der Korrektur dieser Arbeit ausdrücken.

Ebenso gilt mein Dank Michael Köhler und allen Mitgliedern der Abteilung für das freundliche Arbeitsklima.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Ziel der Arbeit	5
2.	Material und Methoden	6
2.1	Pflanzenmaterial	6
2.2 2.2.1. 2.2.2.	Präparation von Riesenchromosomen Fixierung der Samen Erstellung von Riesenchromosomen-Präparaten	6 6 7
2.3 2.3.1. 2.3.2.	Präparation von mitotischen Chromosomen Auskeimen von Samen Herstellung von Metaphase-Präparaten	9 9 10
2.4 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3.	Gen-Sonden Sonde für ribosomale RNA-Gene Phaseolin-Gen-Sonden Phaseolin-Gen-Sonde aus Phaseolus vulgaris Phaseolin-Gen-Sonde aus Phaseolus coccineus Isolation der Gen-Sonden	11 11 12 12 12 12
2.5 2.5.1. 2.5.1.1. 2.5.1.2. 2.5.1.3. 2.5.2.	Vorbehandlung der Präparate Vorbehandlung mit Proteasen Trypsin Proteinase K Pepsin Abbau der RNA	16 16 16 17 18 20
 2.6 2.6.1. 2.6.2. 2.6.3. 2.6.4. 2.6.5. 2.6.6. 2.6.7. 	<i>in situ</i> Hybridisierung Hybridisierungsbedingungen Hybridisierungsmix Denaturierung und Hybridisierung Stringenzwaschung Detektionen Mikroskopie FISHs in der Übersicht	21 21 22 23 24 26 27
3.	Ergebnisse	28
3.1 3.1.1. 3.1.2. 3.1.2.1. 3.1.2.2. 3.1.2.3. 3.1.2.4.	Vorbehandlungen RNA-Abbau Protein-Abbau Trypsin Proteinase K Pepsin Übersicht Protein-Abbau	28 28 29 29 29 30 30 32

3.2	FISH mit rDNA-Sonde und Verbesserung durch Pepsin/HCI- Vorbehandlung	32
3.3 3.3.1. 3.3.2.	Lokalisation von Phaseolin-Genen durch FISH Signale der Phaseolin-Sonden Charakterisierung der Phaseolin-Gen-tragenden Chromosomen	34 34 38
3.4	FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen	38
3.5 3.5.1. 3.5.2.	Detektionsysteme Avidin/Biotin-Detektions-Systeme Fluorescein(FITC)-dUTP	39 39 39
4.	Diskussion	42
4.1	Zugänglichkeit der Ziel-DNA	42
4.2	Abbau von Proteinen	43
4.3	Lokalisation der ribosomalen Gene	46
4.4	Lokalisation der Phaseolin-Gene	47
4.5	FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen	54
4.6	Signale der Detektionssysteme	54
4.7	Hinweise zur Präparation	56
5.	Ausblick	58
6.	Zusammenfassung	59
7.	Literatur	60

ABKÜRZUNGEN

A. dest	Destilliertes Wasser
bp	base pair, Basenpaar
BSA	bovine serum albumin, Albumin aus Rinderserum
cv.	cultivar
d	Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DG	Deckglas
FISH	Fluoreszenz-in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunden
ISH	in situ Hybridisierung
kb	Kilo Basen, 1000 Basenpaare
lyophil.	lyophilisiert
MES	2[N-morpholino] ethansulfonsäure
min	Minuten
mw	molecular weight, Molekulargewicht
NISH	Nichtradioaktive in situ Hybridisierung
NO	Nucleolus-organisierend
NOR	Nucleolus-organisierende Region
ОТ	Objektträger
Р.	Phaseolus
p.a.	per analysis, zur Analyse
PBS	phosphate buffer saline, Phosphat-Puffer
rDNA	ribosomale DNA, DNA-Sequenz für 18S, 5.8S und 25S RNase
	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SSC	standard saline citrate
SDS	sodium dodecyl sulfate
T _m	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propandiol
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
w/v	weight/volume
v/v	volume/volume
U	Unit
UV	ultraviolett

1. EINLEITUNG

Die Samen von Bohnen (Arten der Gattung *Phaseolus*) sind sehr reich an Proteinen und spielen in Amerika und in Teilen Asiens und Afrikas deshalb eine bedeutende Rolle für die menschliche Ernährung (OSBORN, 1988). Das Ziel von Untersuchungen an Bohnen ist daher, den Ertrag und ihre Qualität zu verbessern. Für eine ganze Reihe von cytogenetischen Untersuchungen, die für die Forschung an Bohnen wichtig sind, wäre die Erstellung eines Karyotyps von großer Bedeutung.

Bisher ist es aber noch nicht gelungen, für *Phaseolus vulgaris* oder *Phaseolus coccineus* einen Karyotyp aus Metaphase-Chromosomen zu erstellen. Vor allem ihre geringe Größe und die wenigen morphologischen Merkmale bei der Bänderung haben dies bisher verhindert (SCHWEIZER und AMBROS, 1979). Ein vorläufiger Karyotyp (NAGL, 1967) konnte jedoch für die Riesenchromosomen bei *Phaseolus coccineus* (NAGL, 1962) erstellt werden. Die große Variabilität in der Struktur der Riesenchromosomen erlaubt jedoch nicht immer die eindeutige Identifizierung einzelner Chromosomen. Es fehlen zuverlässige Merkmale, die sich mit den bisher bekannten kombinieren lassen und das Ansprechen einzelner Chromosomen er-leichtern.

Für diese Aufgabe ist die Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung gut geeignet, da man mit ihrer Hilfe auf Chromosomen relativ schnell definierte DNA-Sequenzen lokalisieren kann. Wenn man für jedes Chromosom eine spezifisch DNA-Sequenz hat, kann man damit die verschiedenen Chromosomen eines Kerns durch Fluoreszenz-Signale markieren und so einen Karyotyp erstellen. An die Stelle der üblichen Bandenmuster treten in diesem Fall *molekulare Marker* (DNA-Sequenzen), um ein Chromosom genauer zu charakterisieren.

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde von GALL und PARDUE (1969) und JOHN et al. (1969) unabhängig voneinander entwickelt.

Sie beruht darauf, daß sich ein Doppelstrang aus zwei DNA-Molekülen mit komplementären Sequenzen in seine Einzelstränge trennen läßt (*Denaturierung*), und diese unter entsprechenden Bedingungen wieder einen Doppelstrang ausbilden können (*Renaturierung*), ohne daß die Moleküle dabei zerstört werden. Wenn man daher zusätzlich markierte DNA-Moleküle (*Sonde bzw. Sonden-DNA*) hinzugibt, die komplementär zu bestimmten Sequenzen des Doppelstranges sind (*Ziel-Sequenz* oder *Ziel-DNA*), entstehen bei der Renaturierung Hybrid-Moleküle (*Hybridisierung*), von denen jeweils ein Strang markiert ist. Bei der ISH erfolgt die Hybridisierung nicht an isolierten DNA-Molekülen, sondern *in situ*, d.h. direkt im cytologischen Präparat an den Stellen, wo die Ziel-DNA vorliegt. Durch den Nachweis der Markierung auf der Sonden-DNA (*Detektion*) lassen sich die Orte der Hybridisierung sichtbar machen. Als die ISH 1969 entwickelt wurde, konnte als Sonden-DNA nur die gesamte DNA eines Zellkerns oder repetitive Sequenzen wie Satelliten-DNA bzw. rDNA eingesetzt werden. Erst als es Mitte der 70er Jahre durch die Rekombinante DNA-Technologie möglich wurde, DNA-Fragmente zu klonieren, eröffnete sich für die ISH ein breites Spektrum an verschiedenen DNA-Sequenzen, die als Sonde eingesetzt werden konnten. Die Markierung der Sonden-DNA erfolgte anfangs mit radioaktiven Isotopen und die Detektion durch Autoradiographie. Nachteile der radioaktiven Markierung und Autoradiographie sind: 1) lange Expositionszeiten für die Detektion der Markierung von Wochen bis Monaten 2) große Streuung der Signale und 3) der Umgang mit Radioaktivität.

In jüngster Zeit wird daher zunehmend versucht, die radioaktive ISH durch ihre nichtradioaktiven Varianten (NISH) zu ersetzen. Bei ihnen werden keine radioaktiven Isotope zur Markierung verwendet, sondern Reporter-Moleküle, die an einzelne Basen der Sonden-DNA gekoppelt und über ein passendes Detektionssystem nachgewiesen werden. Die Detektion mit Enzymen, die eine Farbreaktion katalysieren, bzw. bei der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) mit Fluorochromen sind mittlerweile die am meisten verbreiteten Systeme geworden. Sie bieten gegenüber der radioaktiven ISH erhebliche Vorteile: 1) kurze Detektionszeiten von wenigen Stunden bis wenigen Tagen 2) größere Auflösung und Genauigkeit der Lokalisation und 3) keine Radioaktivität (Übersicht bei LICHTER und WARD, 1990, LICHTER et al., 1991, MCNIEL et al., 1991, TRASK, 1991). Ein besonderer Vorteil der FISH gegenüber der radioaktiven ISH ist, daß sich mehrere, verschieden markierte Sonden in einem Präparat gleichzeitig nachweisen lassen (SCHMIDT, 1992).

Ein Nachteil der nichtradioaktiven ISH war ihre anfangs geringe Sensitivität. Es ließen sich nur DNA-Sequenzen mit einer Länge von einigen 10.000 Basen detektieren, während durch die radioaktive ISH weniger als 2000 Basen nachweisbar waren. Doch die Sensitivität der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung hat sich inzwischen, zumindest an Chromosomen des Menschen, bis auf 500 Basen verbessern lassen (LEMIEUX, 1992).

Bei der nichtradioaktiven ISH an mitotischen Chromosomen von Pflanzen konnte diese Sensitivität jedoch noch nicht erreicht werden. Hier ließen sich bisher durch nichtradioaktive ISH nur DNA-Sequenzen mit einer Länge von ca. 13.000 Basen lokalisieren (SIMPSON et al., 1988). Die FISH wurde daher hauptsächlich bei Untersuchungen an Sequenzen angewendet, die aus vielen tandemartig angeordneten Kopien bestehen.

Da bei Riesenchromosomen die Ziel-DNA lateral in großer Menge vorliegt, bieten sie eine gute Voraussetzung für die FISH. Riesenchromosomen entstehen durch mehrfach aufeinanderfolgende DNA-Replikationen ohne Zellteilung, ein Vorgang, der als *somatische Polyploidisierung* bezeichnet wird. Bei der Bildung der Riesenchromosomen in Angiospermen erfolgt der Abbruch des mitotischen Zell-Zyklus in der frühen Prophase, dem *Zerstäubungsstadium*, in dem die Chromatiden getrennt und das Heterochromatin dekondensiert vorliegt (NAGL, 1980), wodurch die Struktur der Riesenchromosomen meist locker erscheint. Eine kompakte Struktur mit regelmäßiger Ausbildung einer deutlicher Bänderung wie bei Riesenchromosomen der Dipteren ist bei Riesenchromosomen von Pflanzen nur selten zu beobachten .

Für cytologische Untersuchungen sind Riesenchromosomen besonders interessant, weil sie bedeutend größer sind als mitotische Chromosomen, und sich an ihnen die Chromosomenorganisation und morphologisch erkennbare Genaktivitäten leichter untersuchen lassen.

Die Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* wurden erstmals 1962 von NAGL beschrieben. Sie sind in den Zellen des Suspensors zu finden, der als kurzlebiges Organ den Embryo in seiner frühen Entwicklung mit Nährstoffen versorgt. (Übersicht bei CIONINI, 1987). Volumen und DNA-Gehalt der Suspensorzellen steigen vom Embryo bis in den mikropylaren Bereich des Suspensors an. Dort liegen die etwa 20 größten Suspensorzellen mit einem DNA-Gehalt von max. 8192C (BRADY, 1973) (Abbildung 1).

Aufgrund des regelmäßigen Auftretens der Riesenchromosomen, ihrer funktionellen Strukturen sowie der Möglichkeit einzelne Chromosomen voneinander zu unterscheiden, wurden an ihnen eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt (Übersicht bei NAGL, 1974; 1981). Wie bei den meisten Riesenchromosomen von Pflanzen sind die Homologen bei *Phaseolus coccineus* nicht somatisch gepaart und liegen daher in ihrer diploiden Anzahl von 2n = 22 vor. Die Länge des größten Riesenchromosoms (Nr. 1) beträgt 78-112µm, bei einem Durchmesser von 5-8 µm. Das mitotischen Metaphase-Chromosom Nr. 1 hat dagegen nur eine Länge von max ca. 3µm, und ist damit etwa 30 Mal kleiner als das entsprechende Riesenchromosom (NAGL, 1974).



Abb 1: Schematische Darstellung eines Längsschnitts durch einen unreifen Samen von *Phaseolus* im frühen Entwicklungsstadium (ä.Int.: äußeres Integument, Cha.: Chalaza, Cot.: Cotyledone, Embr.: Embryo, Endosp.: Endosperm, i.Int.: inneres Integument, Fun.: Funikulus, Mikr.: Mikropyle, Susp.: Suspensor). Maßstab 7mm.

Die ersten *in situ* Hybridisierungen an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* wurden bereits 1972 von AVANZI et al. sowie BRADY und CLUTTER durchgeführt. Sie lokalisierten mit Tritium-markierter 18S und 25S-rDNA die größeren ribosomalen RNA-Moleküle (18S, 5.8S, 25S RNA). Auch für die *in situ* Hybridisierung mit schnell renaturierenden Sequenzen und Satelliten-DNA (DURANTE et al., 1987) wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet.

Ebenfalls durch radioaktive ISH 1990 gelang SCHUMANN et al. auf Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* erstmals die Lokalisation von Genen, die in mitotischen Chromosomen der verwandten Art *Phaseolus vulgaris* in nur 7 Kopien vorliegen. Ein Jahr später beschrieb BAUMANN in ihrer Diplomarbeit die erste FISH mit einer Sonde für ribosomale Gene an *Phaseolus*-Riesenchromosomen.

In der Abteilung Zellbiologie der Universität Kaiserslautern wurde dann mehrfach versucht, auch die Phaseolin-Gene durch FISH zu lokalisieren, was jedoch nicht gelang. Es wurde vermutet, daß eine eingeschränkte Zugänglichkeit der Ziel-Sequenzen für die Sonden-DNA bzw. das Detektionssystem bisher die Lokalisation verhindert hat. Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen war die Rolle der chromosomalen Proteine, weil sie für die Packungsdichte der DNA verantwortlich sind.

1.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob sich durch den Abbau der Proteine in den Präparaten von Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet die Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) verbessern läßt, sodaß auch die Phaseolin-Gene lokalisiert werden können.

Dazu sollte zunächst in einem Testsystem die Wirkung verschiedener Protease-Vorbehandlungen verglichen werden, um eine Protease auszuwählen, die zwei Bedingungen erfüllen sollte. Einerseits muß sie zu einer Verbesserung der Markierungen führen, andererseits darf sie jedoch die Morphologie der Chromosomen nicht zu stark schädigen, damit die bisher bekannten Merkmale der Heterochromatinverteilung nicht verloren gehen.

Im Hinblick auf spätere Mehrfach-ISH sollte zusätzlich FITC-dUTP als direktes Detektionssystem für die Lokalisation der ribosomalen Gene getestet werden .

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an Riesenchromosomen aus Suspensorzellen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet durchgeführt. Die Pflanzen wurden während der Sommermonate im Botanischen Garten der Universität Kaiserslautern angezogen. Die Samen zur Anzucht der Pflanzen wurden von der Firma Schürmann in Kaiserslautern bezogen.

Für die Präparation der Riesenchromosomen wurden unreife Samen mit einer Länge von 7-11mm verwendet. Die Kotyledonen dieser Samen füllen zu diesem Zeitpunkt 25-50% des Embryosackes aus. Dieses Stadium entspricht nach VOB (1992), dem sehr-frühen bis frühen Entwicklungsstadium der Samenentwicklung. Die Samen wurden 4-7 Tage bei +4°C in Frischhaltefolie gekühlt, um das Chromatin der Riesenchromosomen zu kondensieren.

Für die Präparation der mitotischen Chromosomen wurden Wurzelspitzen von Samen verwendet, die nach einer modifizierten Methode von VANDERBORGHT (1990) ausgekeimt wurden.

2.2 Präparation von Riesenchromosomen

Die Präparation erfolgte modifiziert nach SCHUMANN et al. (1990).

2.2.1. Fixierung der Samen

Durchführung:

- Samen im unteren Drittel mit einem Längsschnitt öffnen, damit das Fixans schneller eindringt
- Samen 4-7 Tage in 3-4fachem Überschuß Ethanol-Eisessig (3:1) bei +4°C fixieren, dabei das Fixans am zweiten Tag wechseln
- Überführen in Fixierglas mit 70% Ethanol (v/v)
- Lagerung bei -20°C

Die fixierten Samen wurden so bis zu acht Monaten gelagert.

Material:

Fixiergläser, 250ml 99% Ethanol, vergällt (Riedel-de H.) 100% Essigsäure, (Riedel-de H.)

2.2.2. Erstellung von Riesenchromosomen-Präparaten

Vor Beginn der Präparation wurden Objektträger (OT) mit Poly-L-Lysin beschichtet, damit die Chromosomen besser auf den OT haften und bei der *in situ* Hybridisierung nicht abschwimmen.

Beschichten der Objektträger:

- OT für 1min in einer Küvette mit Aceton spülen und an der Luft trocknen
- im vorderen Drittel des OT 5µl Poly-L-Lysin Lösung auftropfen
- den Tropfen mit einem zweiten OT ausstreichen und an der Luft trocknen

Material, Chemikalien und Lösungen:

Objektträger 10µl-Pipette (Eppendorf) Glasküvette Aceton, technisch (Riedel-de H.) Poly-L-Lysin(mw 100.000, Sigma, P-1274), 1mg/ml in A. dest

Durchführung:

 unter dem Stereomikroskop die Samenschale mit einem Oberflächenschnitt von der Mitte des Samens in Richtung Mikropyle bis zur äußeren Samenschale hin öffnen (1). Den Suspensor und möglichst wenig umliegendes Gewebe mit drei Schnitten (2)-(4) herauspräparieren ("Gewebestück")



- 10-20 Gewebestücke in 10ml MES-Sucrose-Puffer 5min präinkubieren und in ca. 20ml 5% Pektinase-Gemisch überführen
- enzymatische Mazeration f
 ür 3h bei 37°C in einem Inkubationssch
 üttler bei 120 rpm
- Pektinase-Gemisch abgießen 2 Mal mit MES-Sucrose-Puffer waschen
- Gewebestücke in 5ml Propionsäure-Milchsäure (1:1) bei RT 2.5-3h fixieren
- 3 Mal in A. dest. spülen und dann 1-2h bei +4°C stehen lassen
- ein Gewebestück in einige Tropfen 45% Essigsäure auf einen Hohlschliffobjektträger überführen
- die einzelnen Zellen des Suspensors mit Präpariernadel und Pinzette aus dem Gewebestück herauspräparieren

- die größten Suspensorzellen mit sehr klarem und durchsichtigem Cytoplasma aussortieren (wenn in einem Suspensor nicht ausreichend viele dieser Zellen zu finden sind,
 - mehrere Suspensoren präparieren bis genügend Zellen zur Verfügung stehen)
- 8-10 der ausgewählten Zellen mit einer 20µl-Pipette (mit abgeschnittener Spitze) in 10µl 45% Essigsäure aufnehmen und auf einen mit Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträger übertragen
- Suspensorzellen so auf dem OT verteilen, daß sie sich beim späteren "Aufklatschen" des DG (siehe unten) nicht überlagern
- mit einer Pinzette ein DG aufnehmen, dieses mit einer Kante schräg auf den OT aufsetzen und festhalten (1); durch Andrücken mit einer Präpariernadel an der aufgesetzten Stelle, das DG unter Spannung setzen (2)



- durch pötzliches Wegziehen der Pinzette "klatscht" das DG auf die Zellen auf, die Zellwände platzen und die Riesenchromosomen werden aus den Suspensorzellen herausgequetscht
- DG mit einem Stück Filterpapier abdecken und mit der Rückseite einer Präpariernadel durch leichtes und senkrechtes (!) Klopfen von oben auf das DG, die Chromosomen noch etwas mehr vereinzeln
- Quetschpräparate im Phasenkontrast(100x) kontrollieren; einige gut gequetschte Zellen für spätere Vergleiche fotografieren
- OT auf einer Kälteplatte (-70°C) einfrieren und DG mit einer Rasierklinge "absprengen" (Trockeneis-Methode nach CONGER und FAIRCHILD, 1953)
- Präparate in 99% Ethanol entwässern und über Nacht an der Luft trocknen

Material:

Aufsicht-Stereomikroskop, 0.8-6.4x (STEMI SV8, Zeiss) Mikroskop, Phasenkontrast, 100x (Axioskop, Zeiss) Inkubationsschüttler (UNIEQUIP, Lab-Line Inc.) für 37°C Kälteplatte (FTS Systems) Präparierbesteck (Präpariernadel, Skalpell, Uhrmacherpinzette, Rasierklinge) Objektträger Hohlschliffobjektträger Deckgläser, 18x18mm Filterpapier (Schleicher&Schuell) Plastik-Schnappdeckelbehälter (100ml) 20µl-Pipette (Gilson), abgeschnittene 200µl-Spitzen A. dest

Chemikalien:

MES (2[N-Morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma, M-3023) Sucrose (SERVA, 35580) Pectinase from Aspergillus niger 0.15-0.3U/mg lyophil. (SERVA, 31660) Pectinase 5S from Aspergillus niger ca. 0.5U/mg lyophil. (SERVA, 31662) 99% Ethanol, vergällt Propionsäure, 99.5% (Riedel-de H., 27747) Milchsäure, DL-Lactic acid (SERVA, 29750)

Lösungen:

45% Essigsäure
99% Ethanol
MES-Sucrose-Medium: 25mM MES, pH 5.5 mit 6% (w/v) Sucrose
5% Pektinase-Gemisch: 5% Pectinase und 5% Pectinase 5S gelöst in MES-Sucrose-Medium

2.3 Präparation von mitotischen Chromosomen

Für die Präparation mitotischer Chromosomen wurden Wurzelspitzenmeristeme der Sekundärwurzeln ausgekeimter Samen verwendet.

2.3.1. Auskeimen von Samen

Durchführung:(modifiziert nach VANDERBORGHT (1990))

- Samenschale auf der dem Funiculus entgegengesetzten Seite mit einem Skalpell auf einer Länge von ca. 1cm aufschneiden
- Samen für 24h bei RT in einem mit Luftfeuchtigkeit gesättigtem Exsikkator aufquellen lassen
- jeweils 5 bis 7 Samen zwischen zwei Lagen feuchtem Filterpapier in einer Petrischale auslegen und auskeimen bis sich eine größere Zahl von Sekundärwurzeln ausgebildet hat

Material:

Skalpell Exsikkator Rundfilter, 9cm Petrischale, 9cm

2.3.2. Herstellung von Metaphase-Präparaten

Durchführung (modifiziert nach SCHWEIZER (1989)):

- ausgekeimte Samen für 3h bei +4°C kühlen
- Wurzeln 5.5h bei 12-18°C in 0.002M 8-Hydroxy-chinolin legen
- Wurzeln in gekühltes Fixans (+4°C) überführen, 2 Mal wechseln und bei -20°C lagern
- Fixans nach einem Tag wechseln und weitere fünf Tage bei -20°C lagern
- Wurzeln in 0.1M Citrat-Puffer transferieren
- von den Wurzelspitzen die vordersten 2mm (Meristem) unter dem Stereomikroskop abtrennen
- Meristeme 2 Mal mit Citrat-Puffer in einem Spitzröhrchen durch Dispergieren und Zentrifugieren (1min, 400xg) waschen
- Meristeme 3h 45min mit einem Cellulase-Pektinase-Enzymgemisch bei 37°C inkubieren. Während der Inkubation nach jeweils 60min mehrfach mit silikonisierten Pasteurpipette Luftblasen durch die Enzymlösung blasen, um die Gewebepartikel schonend zu zerkleinern. Die Gewebe lösen sich im Laufe der Inkubation auf, was an der Trübung der Enzymlösung erkennbar ist.
- Suspension 2 Mal mit Citrat-Puffer waschen (siehe oben)
- Pellet in ca. 1.5ml Citrat-Puffer resuspendieren
- doppeltes Volumen an Fixans zugeben
- 2 Mal mit Fixans durch Dispergieren mit einer silikonisierten Pasteurpipette und anschließendem Zentrifugieren (1min, 400xg) waschen, um Citrat-Puffer gegen Fixans auszutauschen
- Pellet abschließend in ca. 1.5ml Fixans aufnehmen und dispergieren
- die OT mit Fixans waschen und auf einer Kälteplatte bei -70°C kühlen
- pro Objektträger aus ca. 60cm Höhe 3-5 Tropfen der Zellsuspension auftropfen
- Präparate zumindest über Nacht lufttrocknen

Um die Qualität der Präparate zu beurteilen, wurden ein bis zwei Präparate mit 4µl DAPI/Sulforhodamin (STÖHR, 1978) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop (400x) überprüft.

Modifikationen gegenüber SCHWEIZER (1989)

Vor der Behandlung mit 0.002M 8-Hydroxy-chinolin wurden die ausgekeimten Samen für 3h bei +4°C in einen Kühlschrank gestellt.

Die OT wurden nicht auf Eis, sondern auf einer Kälteplatte bei -70°C gekühlt.

Material:

Aufsicht-Stereomikroskop, 0.8-6.4x (STEMI SV8, Zeiss) Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Ortholux) Zentrifuge (Hermle, ZK364) Kälteplatte (FTS Systems) Spitzröhrchen Pasteurpipette, silikonisiert Objektträger

Chemikalien:

8-Hydroxy-chinolin, puriss. p.a. (Fluka, 55070)
DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol.2HCl.H₂0 (SERVA, 18860)
Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie (Merck, 4095)
Sulforhodamin 101 lasergrade (EASTMAN Kodak, 14318)
Tris: Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Sigma, T-1378)
Cellulase, Onozuka R10 (201057)
Pektinase, EC 3.2.1.15 from Aspergillus niger Solution in 40% Glycerol 3-9U/mg Protein (Sigma, P-5146)

Lösungen:

0.1M Citrat-Puffer, pH 4.8
0.002M 8-Hydroxy-chinolin in A. dest
Methanol-Eisessig (3+1), frisch ansetzen
DAPI/Sulforhodamin (1ml):

500µl Sulforhodamin-Gebrauchslösung
(3mg Sulforhodamin 101 in 100ml 0.2M Tris-HCl pH 7.5)
499µl Glycerin
1µl DAPI-Stammlösung (1mg DAPI/ml Wasser)

Cellulase-Pektinase-Enzymgemisch: 2% (w/v) Cellulase; 40% (v/v) Pektinase in 0.01M Citrat-Puffer pH 4.8

2.4 Gen-Sonden

Die Herstellung der Gen-Sonden soll hier nur allgemein beschrieben werden, da mir die Sonden bereits mit Biotin markiert zur Verfügung gestellt wurden. Die wichtigsten Angaben über die verwendeten Methoden bzw. Chemikalien sind im jeweiligen Abschnitt ergänzt.

2.4.1. Sonde für ribosomale RNA-Gene

Die rRNA-Gene, die bei Pflanzen die größeren ribosomalen RNA-Moleküle (5.8S, 18S, 25S rRNA) kodieren (rDNA), sind zu sogenannten Repetitionseinheiten (*repeat units*) zusammengefaßt. Sie liegen bei Pflanzen im allgemeinen in der Größenordnung von 10.000 Kopien pro Genom vor (GERLACH und BEDBROOK, 1979). *Phaseolus coccineus* besitzt pro Telophase-Kern 4000 Kopien der rDNA (INGLE et al., 1975).

Eine komplette *repeat unit* der rDNA aus *Triticum aestivum* wurde von GERLACH und BEDBROOK (1979) in die EcoRI-Schnittstelle des Plasmid-Vektor pAYCY184 kloniert. Dieser Klon trägt die Bezeichnung pTA250 und wurde von Prof. N. Blin (Universität des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt.

Als Sonde wurde das 8.8kb Insert dieses Klons verwendet.

2.4.2. Phaseolin-Gen-Sonden

Phaseolin, das Hauptspeicherprotein von *Phaseolus vulgaris*, setzt sich aus den drei Untereinheiten α -, β - und γ -Phaseolin zusammen. Diese werden von einer kleinen Multi-Gen-Familie mit 6-8 Kopien pro haploidem Genom kodiert (TALBOT et al., 1984). Sequenziert wurden bisher zwei Phaseolin-Gene, die für die α - und β -Unterheit (α -Phaseolin: ANTHONY et al. 1990; β -Phaseolin: SLIGHTOM et al., 1983) kodieren.

2.4.2.1. Phaseolin-Gen-Sonde aus Phaseolus vulgaris

Das Gene für die β -Phaseolin-Untereinheit aus *Phaseolus vulgaris* cv. Tendergreen stammt aus dem genomischen Klon AG-pPVPh 177.4 (SUN et al., 1981). Daraus wurde ein 3kb langes Fragment in den Plasmid-Vektor pBR322 subkloniert und als AG-pPVPh3.0 benannt (SLIGHTOM et al., 1983). Dieses Fragment enthält 95% der kodierenden Sequenz für die β -Phaseolin-Untereinheit (1.9kb) und 1.1kb der 3'-flankierenden Region. Dieser Subklon wurde von Prof. Dr. J.L. Slightom (Division of Molecular Biology, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA) zur Verfügung gestellt.

Als Sonde wurde aus AG-pPVPh3.0 das gesamte 3kb-Insert verwendet.

2.4.2.2. Phaseolin-Gen-Sonde aus Phaseolus coccineus

Aus *Phaseolus coccineus* cv. Preisgewinner wurde ein Phaseolin-Gen mit Hilfe der PCR isoliert und in den Vektor pUC18 kloniert (SCHUMANN, unveröffentlicht). Der Klon trägt die Bezeichnung pPcoPh.1.

Als Sonde wurde das ganze Plasmid eingesetzt.

2.4.3. Isolation der Gen-Sonden

Die als Sonde verwendeten DNA-Fragmente liegen meist in klonierter Form vor, d.h. sie wurden in einen *Vektor* (z.B. Plasmid) ligiert, dann in den Wirtsorganismus (z.B. Bakterium E.coli) des Vektors gebracht (*Transformation*) und darin vermehrt. Um das gewünschte DNA-Fragment dann wieder zu isolieren, wird der Vektor aus seinem Wirt isoliert (*Plasmid-Isolation*) und ggf. das DNA-Fragment wieder vom Vektor getrennt (*Insert-Isolation*).

Bakterienkultur

Das Kulturmedium zur Vermehrung der Bakterien enthält ein Antibiotikum, gegen welches das Plasmid ein Resistenzgen besitzt. Durch dieses Resistenzgen können sich nur solche Bakterien vermehren, die auch das Plasmid mit der einklonierten DNA enthalten.

Werden Plasmide wie z.B. pBR322 verwendet, die in geringerer Anzahl repliziert werden als z.B. pUC18/19, kann dem Kulturmedium Chloramphenicol zuzugeben werden. Damit wird selektiv das Wachstum der Bakterien gehemmt ohne die Replikation der Plasmide zu stören. So läßt sich auch bei pBR322 eine höhere Replikationsrate und Ausbeute erzielen (SAMBROOK et al., 1989).

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in 500ml LB-Medium. Als Antibiotika wurden Tetracyclin für den Klon pTA250, Ampicilin für den Klon AG-pPVPH3.0 und Ampicilin für den Klon pPcoPh.1 verwendet. In allen Fällen wurde Chloramphenicol eingesetzt.

Plasmid-Isolation

Um die Plasmide aus den Bakterien zu isolieren, werden die Bakterien in einem alkalischen Medium lysiert (BIRNBOIM und DOLY, 1978). Danach erfolgt die Trennung der Plasmid-DNA (in *supercoiled*-Konformation) von der linearen Bakterien-DNA durch eine Dichte-Gleichgewichtszentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid Gradienten (SAMBROOK et al., 1989).

Insert-Isolation

Ein rekombinantes Plasmid besteht aus dem eigentlichen Vektor, der die Vermehrung in einem Wirtsorganismus ermöglicht, sowie der einklonierten DNA, dem *Insert*. Um das *Insert* zu isolieren, also wieder von dem Vektor zu trennen, wird es mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen "geschnitten". Bei geeigneter Auswahl der Restriktionsenzyme entstehen dabei zwei Fragmente von *Insert* und Vektor. Diese lassen sich auf einem Elektrophorese-Gel auftrennen und das Insert kann aus dem Gel wiedergewonnen werden.

Für die Isolation des 8.8kb-Inserts wurde pTA250 mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Das 3kb-Insert aus AG-pPVPH3.0 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI isoliert (vgl. Tabelle 1).

Die Restriktionsansätze wurden auf einem 1% Agarose-Gel (TAE) aufgetrennt und die *Inserts* durch Elektroelution auf dem Gel isoliert.

Tab. 1: Angaben zu den verwendeten Gen-Sonden

	rDNA-Sonde	Phaseolin-Sonden	
Klon-Bezeichn.	pTA250	AG-pPVPH3.0	pPcoPh.1
Herkunft	T.aestivum	P.vulgaris	P.coccineus
Vektor	pAYCY184	pBR322	pUC18
Restriktion	EcoRI	EcoRI/BamHI	-
Vektoranteil ¹	-	-	2.7kb
Insertanteil	8.8kb	3.0kb	ca. 1.8kb

1) für pPcoPh.1 ist die Länge des Vektors mit angegeben, da das gesamte Plasmid als Sonde eingesetzt wurde

Markierung der Gen-Sonden

Die Markierung der Gen-Sonden erfolgte mit Biotin-16-dUTP bzw. FITC-dUTP durch *nick translation* (RIGBY et al., 1977) mit einem Nick-Translation-Kit (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers.

Prüfen der Markierungseffizienz

Ob die Markierungseffizienz, d.h. der Einbau von Biotin-markierten Nukleotiden in die Sonden-DNA, ausreichend war, wurde für jede Sonde mit einem "Dot blot" überprüft. Als Kontrolle diente eine definiert biotinylierte DNA.

Durchführung (nach BAUMANN, 1991):

- 10ng Sonden- und Kontroll-DNA auf einem Stück Parafilm in 6 Schritten von jeweils 1:10 in TE bis auf 0.1pg DNA/µl verdünnen
- 1µl jeder Verdünnungsstufe auf eine Nylonmembran übertragen
- Membran an der Luft trocknen lassen
- DNA durch 3minütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Membran fixieren (*cross-linking*)
- Membran in eine kleine Plastikschachtel in PufferI mit 5% BSA überführen und bei RT 20min inkubieren
- spülen der Membran mit PufferI
- 30min Inkubation mit 3ml verdünnter SAAP-Lösung (3 µl Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (SAAP) + 3ml PufferI mit 5% BSA) auf einem Schüttler (75 rpm)

- Reste von SAAP durch 4 Mal 5min spülen mit PufferI abwaschen (auf Schüttler)
- Membran 1 Mal kurz mit PufferII spülen, um sie für die nächste Inkubation zu äquilibrieren
- 4.5µl NBT und 3.5µl X-Phosphat in 1ml PufferII geben und diese Lösung auf der Membran verteilen; Beide Substrate werden von der Alkalischen Phosphatase in zwei Farbstoffe umgesetzt und bilden zusammen ein dunkelviolettes Farbpräzipitat
- Membran abdecken und 45min inkubieren
- Farbreaktion durch Spülen der Membran mit 99% Ethanol stoppen

Je nach Verdünnungsstufe und Markierungseffizienz bilden sich unterschiedlich stark gefärbte Farbpräzipitate. Wenn bei der Verdünnungsstufe, die einer Konzentration von 10-25 pg DNA/µl entsprach, noch Farbpräzipitate erkennbar waren, konnte man nach MCNIEL et al. (1991) davon ausgehen, daß die Markierungseffizienz der Sonden-DNA ausreichend war. Meist waren die Farbpräzipitate bis zu Verdünnungen von 1-0.1pg/µl zu erkennen.

Material:

Parafilm "M" (American National Can) Nylonmembran, positively charged (Boehringer Mannheim) Transilluminator, Fluo-Link, 312nm (Bachhofer) Horizontal-Schüttler (Salvis, SBK 25) Plastikschachtel, passend für Membran

Chemikalien und Lösungen:

DNA-Längenstandards II, Biotin-markiert (Boehringer Mannheim, 1292 609)
SAAP: Streptavidin-Alkalische Phosphatase (BRL, 9542SA)
NBT: 4-Nitrobluetetrazoliumchlorid, 75mg/ml in 70% Dimethylformamid (Boehringer Mannheim)
X-Phosphat: 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat, 50mg/ml in Dimethylformamid (Boehringer Mannheim)
TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA
PufferI: 100mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl
PufferII: 100mM Tris-HCl pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂
99% Ethanol, vergällt

2.5 Vorbehandlung der Präparate

2.5.1. Vorbehandlung mit Proteasen

Für die Packungsdichte von Chromatin sind chromosomale Proteine verantwortlich. Ihr Abbau sollte zu einer Verbesserung der Zugänglichkeit für die Ziel-DNA führen, um bei der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) stärkere Signale zu erhalten. Die Proteine in den Präparaten wurden deshalb enzymatisch mit den Proteasen Proteinase K, Trypsin oder Pepsin hydrolysiert.

Um die Auswirkungen der Proteasen auf die Morphologie der Chromosomen zu kontrollieren, wurden die Präparate stündlich unter dem Mikroskop beobachtet. Nach der Vorbehandlung schloß sich in der Regel der Abbau der RNA in den Präparaten an. Danach wurden sie für die FISH eingesetzt, um die Auswirkung der jeweiligen Protease auf die Signale zu untersuchen.

Nur in wenigen Fällen erfolgte der Abbau der RNA noch vor dem Abbau der Proteine. In diesen Fällen wurden die Präparate nicht in einem letzten Schritt entwässert (siehe Durchführungen), sondern aus dem BT-Puffer direkt zur Denaturierung übernommen.

2.5.1.1. Trypsin

Die Endopeptidase Trypsin spaltet Peptidbindungen nur nach den Aminosäuren Lysin und Arginin (KNIPPERS, 1985).

Es wurden zwei Versuche mit Trypsin durchgeführt. Trypsin-Versuch 1, mit einer 10fachen Trypsin-Konzentration gegenüber einer in der Humancytogentik üblichen Konzentration (0.5ml Bacto Trypsin in 70ml 0.9% NaCl-Lösung, entspricht 0.357mg Trypsin 1:250/ml in 0.9% NaCl) und Trypsin-Versuch 2, mit einer zusätzlich verlängerten Inkubationsdauer.

Durchführung: Trypsin-Versuch 1 (60min)

- in einer Glasküvette 70ml Trypsin-Lösung und für die Kontrolle 70ml 0.9% NaCl-Lösung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmen
- Inkubation der Präparate in der Trypsin-Lösung bzw. Kontrolle in der NaCl-Lösung für 1h
- Chromosomenmorphologie im Phasenkontrast (100x) kontrollieren

Durchführung: Trypsin-Versuch 2 (9h 25min)

- pro Präparat eine feuchte Kammer bei 37°C vorwärmen
- pro OT 100µl Trypsin-Lösung bzw. bei der Kontrolle 100µl 0.9% NaCl-Lösung auftropfen und DG auflegen
- Inkubation der Präparate 1h in der feuchten Kammer

- Morphologie der Chromosomen im Phasenkontrast (100x) kontrollieren
- DG in Küvette mit 0.9% NaCl-Lösung abschwimmen lassen und OT kurz in der Lösung spülen
- OT herausnehmen, Reste der NaCl-Lösung gut abschütteln und erneut 100µl Trypsin-Lösung, bzw. bei der Kontrolle 100µl 0.9% NaCl-Lösung auftropfen

Die Schritte 3 (Inkubation) bis 6 (neue Lösung auftropfen) bis zur Gesamtdauer von 9h 25min stündlich wiederholen und dann folgendermaßen verfahren:

- DG in NaCl-Lösung abschwimmen lassen
- OT in BT-Puffer überführen und kurz spülen
- Präparate über aufsteigende Ethanolreihe entwässern und an der Luft trocknen

Material:

Wärmeschrank und Wasserbad für 37°C Petrischale mit Deckel, 9cm Rundfilter, 9cm Glasküvetten feuchte Kammer: 2 Rundfilter wurden mit 0.9% NaCl-Lösung angefeuchtet und in eine Petrischale gelegt; zum Auflegen des OT kleinen Plastikring einlegen

Chemikalien und Lösungen

Bacto Trypsin (DIFCO, 0153-59)

Trypsinlösung: 5ml Bacto Trypsin in 70ml 0.9% NaCl, entspricht 3.5mg Trypsin 1:250/ml in 0.9% NaCl

BT-Puffer: 0.1M Natriumhydrogencarbonat pH 8.3 und 0.05% Tween20; 70ml pro Küvette aufsteigende Ethanolreihe: 75%, 85% und 99% Ethanol, vergällt

2.5.1.2. Proteinase K

Proteinase K besitzt keine nennenswerte Spaltungsspezifität, spaltet daher die Peptidbindungen zwischen allen Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin (KNIPPERS, 1985). Ihr pH-Optimum liegt zwischen 7.5 und 12. Die größte Stabilität weist Proteinase K bei pH 8 auf. Ihr Temperaturoptimum beträgt 65°C (EBELING et al., 1974).

Durchführung:

- pro Präparat eine feuchte Kammer bei 65°C vorwärmen
- pro OT 100µl Proteinase K-Lösung bzw. für die Kontrolle 100µl Proteinase K-Puffer (beide vorgewärmt auf 65°C) auftropfen und DG auflegen
- Präparate in die feuchte Kammer legen und 5 bzw. 60min bei 65°C inkubieren
- Morphologie der Chromosomen im Phasenkontrast (100x) kontrollieren

- DG in einer K
 üvette mit Proteinase K-Puffer abschwimmen lassen und Pr
 äparat durch kurzes Schwenken sp
 ülen
- OT 5min mit BT-Puffer spülen
- Präparate über aufsteigende Ethanolreihe entwässern und an der Luft trocknen

Material:

Wärmeschrank mit 65°C Rundfilter, 9cm Glasküvetten feuchte Kammer: 2 Rundfilter wurden mit 0.9% Proteinase K-Puffer angefeuchtet und in eine Petrischale legen; zum Auflegen des OT kleinen Plastikring einlegen

Chemikalien und Lösungen:

Proteinase K aus *Tritirachium album*, Lyophilisat (Boehringer Mannheim, 745723) SDS: Dodecylsulfate Na-salt, cryst. (SERVA, 20760) Tween 20(R), Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Fluka, 93773) Tris: Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Sigma, T-1378) Proteinase K-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM CaCl₂, 0.5% SDS, 65°C Proteinase K-Lösung: 500µg/ml Proteinase K Puffer, 65 °C BT-Puffer: 0.1M Natriumhydrogencarbonat pH 8.3 und 0.05% Tween20; 70ml pro Küvette aufsteigenden Ethanolreihe: 75%, 85% und 99% Ethanol, vergällt

2.5.1.3. Pepsin

Pepsin ist die wichtigste Protease im Magensaft aller Wirbeltiere und zählt aufgrund des dort herrschenden, und für seine Funktion notwendigen, sauren Milieus zu den sauren Proteasen (STRYER, 1990). Es hat ein pH-Optimum um pH 2 und ein Temperatur-Optimum bei 37°C, was den physiologischen Umgebungsbedingungen seines natürlichen Vorkommens im Magen entspricht. Pepsin ist eine Endopeptidase mit geringer Substratspezifität (WIRNT und FRITSCH, 1974) und einer Spaltungsspezifität für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (KNIPPERS 1985).

Die Inkubation mit Pepsin wurde entweder in einer feuchten Kammer oder in einer Küvette durchgeführt. Für die FISH ergab sich kein Unterschied in den beiden Anwendungen. Um Pepsin zu sparen, ist die Methode mit der feuchten Kammer vorzuziehen, da weniger Pepsin verbraucht wird. Durchführung: Vorbehandlung in Petrischale

- pro Präparat eine feuchte Kammer bei 37°C vorwärmen
- pro OT 100µl Pepsin/HCl-Lösung bzw. bei der Kontrolle 100µl 0.01N HCl auftropfen und DG auflegen
- Präparate in die feuchte Kammer legen und 1h inkubieren
- Chromosomenmorphologie im Phasenkontrast (100x) kontrollieren
- DG in einer Küvette mit 0.01N HCl abschwimmen lassen und OT durch kurzes Schwenken spülen
- OT gut abschütteln und erneut 100µl Pepsin/HCl-Lösung, bzw. bei der Kontrolle 100µl 0.01N HCl-Lösung auftropfen

Bis zur Gesamtdauer von 4,5h die Schritte 3 (Inkubation) bis 6 (neue Lösung auftropfen) stündlich wiederholen und dann wie folgt verfahren:

- Präparate kurz in 0.01N HCl-Lösung und nochmals kurz in BT-Puffer spülen
- Präparate über aufsteigende Ethanolreihe entwässern und an der Luft trocknen

Durchführung: Vorbehandlung in einer Küvette

- Küvette mit 60ml Pepsin/HCl-Lösung auf 37°C vorwärmen
- 4.5h Inkubation der Präparate bei 37°C in Pepsin/HCl-Lösung
- OT kurz in 0.01N HCl-Lösung und nochmals kurz in BT-Puffer spülen
- Präparate über aufsteigende Ethanolreihe entwässern und an der Luft trocknen

Material:

Wärmeschrank bzw. Wasserbad für 37°C Rundfilter, 9cm Glasküvette feuchte Kammer: 2 Rundfilter wurden mit 0.01N HCl angefeuchtet und in eine Petrischale gelegt; zum Auflegen

des OT kleinen Plastikring einlegen

Chemikalien und Lösungen:

0.01N HCl

Pepsin porcine, 17milliAnsonU/mg, 2xcryst. lyophil (SERVA 31820) Pepsin/HCl-Lösung: 1mg Pespin/ml in 0.01N HCl aufsteigenden Ethanolreihe: 75%, 85% und 99% Ethanol, vergällt

2.5.2. Abbau der RNA

Die RNA in den Präparaten wurde mit RNase A (DNase-frei) abgebaut, um nur Hybridisierungen zwischen der Sonden-DNA und der chromosomalen Ziel-DNA zu erhalten.

Durchführung:

- pro OT 50µl RNase A (100µg/ml in A. dest) auftropfen und mit einem DG abdecken
- 30min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C
- OT für 30min in eine Küvette mit 60°C warmen PBS stellen
- OT durch zweimalige Zugabe von jeweils 50% frischem PBS auf RT langsam abkühlen (je 5min)
- Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (5min pro Stufe) entwässern
- Präparate an der Luft oder in einem Exsikkator unter Vakuum (15min) trocknen

Material und Chemikalien:

Wärmeschrank für 37°C Wasserbad für 60°C DG, 22x22mm, silikonisiert feuchte Kammer: Metallschale mit Platz für 8-10 OT, deren Boden mit feuchtem Papier ausgelegt ist RNase A (100µg RNase/ml A. dest, DNase-frei durch 15minütiges Aufkochen) (Boehringer Mannheim)

Lösungen:

PBS: 0.13M NaCl, 0.007M NaH₂PO₄, 0.03M Na₂HPO₄, pH 7.4 aufsteigende Ethanolreihe: 75%, 85% und 99% Ethanol, vergällt

2.6 In situ Hybridisierung

2.6.1. Hybridisierungsbedingungen

Die wichtigsten Faktoren, welche die Hybridisierungsrate zwischen zwei Nukleinsäuremolekülen beeinflussen, sind neben der Homologie zwischen Sonden-DNA und Ziel-DNA die Temperatur und Ionenkonzentration. Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt 25°C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Doppelstranges (BRITTEN und KOHNE (1968)).

Die Schmelztemperatur ist abhängig vom GC-Gehalt und der Länge des Doppelstranges sowie der Konzentration von Formamid, das der Hybridisierungslösung beigesetzt werden kann, um die Hybridisierungstemperatur zu verringern.

Der Zusammenhang zwischen diesen Faktoren läßt sich durch eine empirische Formel beschreiben, mit der man die Schmelztemperatur bestimmten kann (MEINKOTH und WAHL, 1984) :

Für *n* wurde die kleinste Länge der bei der Markierungsreaktion durch *nick translation* entstehenden Fragmente angenommen (200bp nach BOEHRINGER MANNHEIM, Nick-Translation-Kit). Desweiteren wurden 50% Formamid eingesetzt und die Na⁺-Konzentration in 2x SSC beträgt 0.39 mol Na⁺/l.

Da der GC-Gehalt der Ziel-DNA nicht bekannt ist, wurde er aus der Sequenz des Gens für β -Phaseolin mit 39.3% bestimmt.

Hiermit ergibt sich eine Schmelztemperatur von 58°C und eine Hybridisierungstemperatur (T_m -25°C) von 33°C.

2.6.2. Hybridisierungsmix

Neben den bereits erwähnten Komponenten enthält der Hybridisierungsmix gescherte Heringssperma-DNA, um unspezifische Bindungen der Sonden-DNA zu verhindern, und Dextransulfat, welches die Hybridisierungsrate bei Sonden-DNA, die durch *nick translation* markiert wurde, bis zum 100fachen beschleunigt (WAHL et al., 1979). Dieser Effekt von Dextransulfat beruht auf seiner Fähigkeit, Wasser zu binden ohne aber gleichzeitig auch Makromoleküle (z.B: DNA) eindringen zu lassen, was zu einer Erhöhung der effektiven Konzentration der Sonde und damit zur Beschleunigung der Hybridisierungsrate führt (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1992). Dadurch wirkt es gleichzeitig auch der 5-10fachen Verlangsamung der Hybridisierungsreaktion durch Formamid entgegen (PEARSON, 1991). Der Hybridisierungsmix (10µl pro Präparat) setzte sich wie folgt zusammen:

- 5µl deionisiertes Formamid
- 1µl 50% Dextransulfat
- 1µl 20x SSC
- 0.5µl gescherte Heringssperma-DNA
- 1µl Sonden-DNA (50ng/µl)
- 1.5µl A. dest

Für die Kontroll-Hybridisierung ohne Sonde wurde in dem Hybridisierungsmix statt der Sonden-DNA entsprechend mehr A. dest eingesetzt.

Durchführung:

- Komponenten des Hybridisierungsmixes in ein Eppendorf-Gefäß pipettieren, dabei für das zähflüssige Dextransulfat eine selbstverdrängende Pipette verwenden
- Hybridisierungsmix gut mischen und mit einer Tischzentrifuge abzentrifugieren

Chemikalien und Lösungen:

Formamid, >99% (ROTH, 6749.1), deionisiert mit AG 501-X8(D), gemäß den Angaben des Herstellers (Bio-Rad, 142-6425)
Dextransulfat, 50% in A. dest
20x SSC: 3M NaCl und 0.3M Na₃Citrat, pH 7.0, autoklaviert
Heringssperma-DNA, geschert, 10 mg/ml in A. dest (SERVA, 18580)

2.6.3. Denaturierung und Hybridisierung

Die Denaturierung der chromosomalen DNA mit 70% Formamid in 2xSSC erfolgte nach HARPER und SAUNDERS (1981).

Durchführung:

- Präparate in einer vorgekühlten (-20°C) aufsteigenden Ethanolreihe (je 5min) entwässern
- Trocknen der Präparate für 15min in einem Exsikkator unter Vakuum
- parallel zu dem 15minütigem Trocknen Hybridisierungsmix 10min auf 82°C erhitzen um die Sonden-DNA zu denaturieren
- Hybridisierungsmix für 5min auf Eis stellen und abkühlen
- wenn die Präparate trocken sind und der Hybridisierungmix abgekühlt ist, möglichst zügig pro Präparat 10µl Hybridisierungsmix auftropfen

- DG auflegen und mit Fixogum versiegeln
- Fixogum 30min in einen Wärmeschrank bei 37°C trocknen
- Präparate in einem feuchte Kammer bei 37°C in einen Wärmeschrank legen
- 12h-18h bei 37°C hybridisieren

Material und Lösungen

Wasserbad für 70 und 82°C
Glasküvette
Exsikkator
DG, 18x18mm
Fixogum (Marabu, 290117000)
Eis
Formamid, >99% (ROTH, 6749.1), deionisiert mit AG 501-X8(D), gemäß den Angaben des Herstellers (Bio-Rad, 142-6425)
70% Formamid in 2x SSC (für 70ml): 49ml deionisiertes Formamid, 7ml 20x SSC und 14ml A. dest
20x SSC: 3M NaCl und 0.3M Na₃Citrat, pH 7.0
Ethanolreihe: 70, 85, 100% Ethanol, bei -20°C

2.6.4. Stringenzwaschung

Die Bedingungen für die Hybridisierung werden meist so gewählt, daß nicht nur vollkommen komplementäre DNA-Fragmente miteinander hybridisieren können, sondern auch ein gewisses Maß an Fehlpaarungen (*mismatch*) zugelassen wird. Um bei der späteren Detektion nur Sonden-DNA nachzuweisen, die eine bestimmte Homologie zur Ziel-DNA aufweist, müssen Fragmente der Sonden-DNA, die an anderen Sequenzen als der Ziel-Sequenz mit geringerer Homologie hybridisiert haben, entfernt werden. Dies wird durch Spülen in einer Waschlösung erreicht (Stringenzwaschung), in der nur Hybride mit der gewünschten Homologie stabil bleiben, und alle anderen abgewaschen werden.

Durchführung (nach SCHWEIZER et al. (1989) modifiziert nach PINKEL et al.(1986)):

- Fixogum vorsichtig mit einer feinen Pinzette vom OT lösen und DG in einer Küvette mit 2x SSC bei RT abschwimmen lassen
- Präparate 3 Mal 3min in 2x SSC und 3 Mal 2min in BT-Puffer bei 42°C waschen

Material und Lösungen:

- Wasserbad für 42°C
- Küvetten
- 2x SSC: 0.3M NaCl und 0.03M Na₃Citrat, pH 7.0
- BT-Puffer: 0.1M Natriumhydrogencarbonat pH 8.3 und 0.05% Tween20; 70ml pro Küvette

Nach einer Regel von BONNER (1973) gilt für Hybride mit einer Länge von über 150bp, daß die Schmelztemperatur einer doppelsträngigen DNA um 1-1.5°C sinkt wenn die Homologie zwischen den beiden Einzelsträngen aufgrund von Fehlpaarungen um ein 1% abweicht. Damit läßt sich umgekehrt von der Temperatur, bei der sich ein Doppelstrang zwischen Ziel-DNA und Sonden-DNA ausbildet auf den Grad der Homologie zurückschließen (SCHNEIDER und MÜLLER, 1988). Für die Phaseolin-Gen-Sonde aus *Phaseolus vulgaris* läßt sich damit errechnen, daß bei der Hybridisierung und den Stringenzwaschungen 14% bis 34% Fehlpaarungen zugelassen wurden, was einer Homologie von 86% bis 65% entspricht. Berechnung:

%Fehlpaarungen= $(T_m - Hybridisierungstemperatur bzw. Waschtemperatur)/1.5$

2.6.5. Detektionen

Bei der Detektion wird die Sonden-DNA nachgewiesen, die nach der Stringenzwaschung noch an der Ziel-DNA verblieben ist. Für den Nachweis von Biotin an der markierten Sonden-DNA nutzt man die hohe Affinität von Avidin zu Biotin aus. Bei der Detektion in der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) wird dafür Avidin verwendet, das mit Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Fluorescein-isothiocyanat (FITC) oder Tetramethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC) gekoppelt ist. Zu schwache Fluoreszenzmarkierungen lassen sich nach einem Verfahren von PINKEL et al. (1986) verstärken (Amplifikation). Das Präparat wird dazu mit einem Anti-Avidin-Antiköper, der mit Biotin konjugiert ist, inkubiert und danach wird erneut Avidin hinzugegeben, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Damit wird an die erste Lage von Fluoreszenzfarbstoff eine zweite, oder bei mehrfacher Amplifikation weitere Schichten, Fluoreszenzfarbstoff gebunden, wodurch die Signal verstärkt wird.

Anstelle von Avidin, das aus Hühner-Eiweiß gewonnen wird, gibt es noch aus *Streptomyces avidinii* stammendes Streptavidin (WILCHECK und BAYER, 1989) und Avidin-Varianten wie ExtrAvidin, die die Eigenschaften von Avidin und Streptavidin kombinieren.

Detektion mit ExtrAvidin-FITC/TRITC

Die Detektion erfolgte nach SCHWEIZER et al. (1989) modifiziert nach PINKEL et al.(1986). Die Detektion mit ExtrAvidin-TRITC erfolgte wie mit ExtrAvidin-FITC. Die angegebenen Volumina gelten jeweils für einen OT.

Durchführung:

- 5min Inkubation mit 50µl 5% BSA in BT-Puffer in einer feuchten Kammer
- 50µl verdünntes ExtrAvidin-FITC (1:100 in BT-Puffer mit 5% BSA) auftragen und silikonisiertes DG auflegen
- 60min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C
- 3 Mal 5min Waschen in BT-Puffer bei 42°C

Amplifikation

- 50µl 5% ZSR in BT-Puffer auftropfen
- 5min in einer feuchten Kammer bei RT inkubieren
- 50µl verdünntes Anti-Avidin (1:50 in BT-Puffer mit 5% ZSR) auftragen und mit einem silikonisierten DG abdecken
- 35min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C
- 3 Mal 2min Waschen in BT-Puffer bei 42°C
- 50µl 5% BSA in BT-Puffer auftropfen
- 5min Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT
- 50µl verdünntes ExtrAvidin-FITC (1:50 in BT-Puffer mit 5%BSA) auftragen und ein silikonisiertes DG auflegen
- 30min Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C
- 3 Mal 2min Waschen in BT-Puffer bei 42°C

Die Markierungen aller Präparate wurden mindestens 1 Mal amplifiziert.

Detektion mit Streptavidin-FITC

Für die Detektion und Amplifikation mit Streptavidin-FITC wurde das Protokoll angepaßt (Tabelle 2).

Material und Chemikalien:

Wasserbad für 42°C Glasküvetten feuchte Kammer: Metallschale mit Platz für 8-10 OT, deren Boden mit feuchtem Papier ausgelegt ist DG, 22x22mm, silikonisiert Tween 20(R), Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Fluka, 93773) BSA, Rinderserum Albumin (Sigma, A-7030) ExtrAvidin (R), FITC Conjugate (Sigma, E-2761) ZSR: Ziegenserum (VECTOR Labs.,S-1000) Anti-Avidin: biotinyliertes Anti-Avidin D aus Ziege (VECTOR Labs., BA-0300) Streptavidin-FITC (Sigma, S-3762) Mausserum (Sigma, S-3509) Anti-Streptavidin: Biotin-SP-AffiniPure Mouse Anti-Streptavidin (Jackson ImmunoResearch, 216-065-084)

Lösungen:

2x SSC: 0.3M NaCl und 0.03M Na₃Citrat, pH 7.0 BT-Puffer: 0.1M Natriumhydrogencarbonat pH 8.3 und 0.05% Tween20

Tab. 2: Veränderungen in der Detektion und Amplifikation bei Verwendung von Streptavidin-FITC gegenüber ExtrAvidin-FITC

	ExtrAvidin-FITC	Streptavidin-FITC
Detektion	ExtrAvidin-FITC 1:100 5% Ziegenserum	Streptavidin-FITC 1:30 5% Mausserum
Amplifikation	Anti-Avidin 1:50 ExtrAvidin-FITC 1:50	Anti-Streptavidin 1:100 Streptavidin-FITC 1:30

2.6.6. Mikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde entweder ein Ortholux-Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit Ploemopak-Auflichtilluminator und Filterblock I2/3 (FITC) und Filterblock A (DAPI) oder ein Axioskop (Zeiss) mit Filtersatz 02 (DAPI), 09 (FITC) und 15(Rhodamin) benutzt.

Die Präparate wurden in eine *Antifade*-Lösung eingebettet um das Ausbleichen (engl. *fading*) der Fluoreszenz zu reduzieren. Die Lösung enthält als wesentlichen Bestandteil 1,4-di-azobicyclo-(2,2,2)-oktan (DABCO). Zusätzlich wurden noch die DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Propidiumiodid verwendet. DAPI diente zur spezifischen Färbung der Chromosomen und Propidiumiodid als Gegenfärbung (rot) für die FITC-Signale (gelb-grün).

Die fotografische Dokumentation erfolgte auf die Schwarzweißfilme Agfaortho 25 Professional (Agfa), APX 25 (Agfa), sowie die Diapositivfilme Ektachrome 64 und 160T (Kodak).

Durchführung:

- Flüssigkeit aus dem letzten Waschschritt gut vom Präparat abschütteln
- 5 µl Antifade-Lösung auftropfen und DG auflegen
- Präparate im Fluoreszenzmikroskop untersuchen

Chemikalien und Lösungen:

DABCO: 1,4-di-azobicyclo-(2,2,2)-oktan (Sigma, D-2522)
DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenyl-indol.2HCl.H₂0 (SERVA, 18860)
Propidiumiodid (Sigma, P-4170)
Glycerin für die Fluoreszenzmikroskopie (Merck, 4095)
Antifade-Lösung: 1 Teil Tris-HCl pH 7.4 und 9 Teile Glycerin mit 2.3% (w/v) DABCO und 0.02% Na-Azid

2.6.7. FISHs in der Übersicht

In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die wichtigen Parameter der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierungen mit Biotin-markierten Sonden zusammengefaßt. Sind zwei oder mehr Methoden für einen Arbeitsgang angegeben, so sind sie als Alternativen aufzufassen.

Arbeitsgang	Methoden
Vorbehandlung der Präparate	Abbau von Proteinen mit Proteasen: - Trypsin - Proteinase K - Pepsin Abbau der RNA mit RNase A
Sonden	- rDNA aus Triticum aestivum
	b-Phaseolin-Gen aus Phaseolus vulgarisPhaseolin-Gen aus Phaseolus coccineus
Denaturierung Hybridisierung Stringenzwaschungen	70% Formamid in 2x SSC 12-18 h bei 37°C 3 Mal 3min in 2x SSC bei 42°C und 3 Mal 2min in BT-Puffer bei 42°C
Indirekte Detektionen	 ExtrAvidin-FITC (gelbgrün) Amplifikation mit biotinyliertem Anti-Avidin
	- ExtrAvidin-TRITC (rot) Amplifikation mit biotinyliertem Anti-Avidin
	 Streptavidin-FITC (gelbgrün) Amplifikation mit biotinyliertem Anti- Streptavidin
Direkte Detektion	FITC-dUTP

Tab. 3: FISHs mit Vorbehandlungen und DNA-Sonden im Überblick

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorbehandlungen

3.1.1. RNA-Abbau

Die RNA in den Präparaten von Riesenchromosomen wurde abgebaut, indem die OT vor der Hybridisierung mit RNase A behandelt wurden. Damit wurde verhindert, daß die Sonden-DNA außer an die gesuchten Zielsequenzen zusätzlich noch an RNA-Fragmente bindet und so unspezifische bzw. falschpositive Markierung anzeigt.

In einer FISH wurde gezeigt, welche Auswirkung sich ergibt, wenn die RNA nicht abgebaut wird. Bei den Präparaten ohne vorherigen RNA-Abbau zeigten sich dabei sehr starke Hintergrundsignale. Diese waren über das gesamte Präparat verteilt und im Bereich des Cytoplasmas besonders stark. Spezifische Markierungen auf Chromosomen waren nicht zu erkennen (Abbildung 2).



Abb. 2: Suspensorzelle von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet nach FISH mit der rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250) ohne RNase-Vorbehandlung. Das Cytoplasma ist mit Hintergrundsignalen (gelbgrün) bedeckt (Pfeil). Es sind keine gelbgrünen Markierungen auf Chromosomen zu erkennen. Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Maßstab 50µm.

3.1.2. Protein-Abbau

Der Abbau von Proteinen in den Präparaten von Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* sollte dazu dienen, die Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die Sonden-DNA zu verbessern. Für den Abbau der Proteine wurden die proteolytischen Enzyme (Proteasen) Pepsin, Proteinase K und Trypsin eingesetzt. Zuerst wurde ihre Auswirkung auf die Morphologie der Riesenchromosomen im Mikroskop (100x, Phasenkontrast) beobachtet. Danach erfolgten FISHs mit der rDNA-Sonde (8.8kb Insert, pTA250), die zeigen sollten, ob die Wirkung der Proteasen auch zu einer Verstärkung der Signale führten.

3.1.2.1. Trypsin

Die proteolytische Wirkung von Trypsin (5ml Bacto Trypsin in 70 ml 0.9% NaCl, entspricht 3.5mg Trypsin 1:250/ml in 0.9% NaCl) wurde bei zwei Inkubationszeiten getestet.

In einem ersten Versuch erfolgte die Inkubation 1h lang bei 37°C in einer Küvette. Es zeigte sich keine morphologische Veränderung der Riesenchromosomen. Im zweiten Versuch wurde die Inkubationszeit auf 9.5h ausgedehnt. Wie bei der einstündigen Inkubation waren auch hier keine Veränderungen der Morphologie der Riesenchromosomen zu beobachten.

Die Auswirkung der Trypsin-Vorbehandlung auf die Markierung wurde in einer FISH getestet. Nur sehr gut freiliegende Riesenchromosomen zeigten manchmal geringfügig stärkere Markierungen als die unbehandelten Kontrollen.

3.1.2.2. Proteinase K

Die Wirkung von Proteinase K (500µg Proteinase K/ml in Proteinase K-Puffer) wurde bei verschiedenen Inkubationszeiten untersucht.

Zuerst wurde die Auswirkung von Proteinase K auf die Chromosomenmorphologie im mikroskopischen Bild untersucht. Nach 60min Inkubation waren die Riesenchromosomen aufgelöst oder es waren nur noch Umrisse erkennbar. Der Versuch, Reste von DNA mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachzuweisen, war nicht erfolgreich.

Wegen der Zerstörung der Morphologie nach 1h wurde die Inkubationszeit auf 5min reduziert. Die FISH mit Präparaten aus der 5min-Inkubation zeigte zwar Signale, doch diese lagen über weite Flächen im Präparat verteilt, und eine Zuordnung zu einem Chromosom war nicht immer möglich. Die Signale waren etwas stärker als die der Kontrolle.

3.1.2.3. Pepsin

Pepsin wurde in verschiedenen Konzentrationen von 50µg, 1mg und 2mg in 0.01N HCl (pH2) eingesetzt. Zunächst wurde die Wirkung von 1mg Pepsin/ml bei 37°C auf die Chromosomenmorphologie beobachtet. Dabei zeigten sich nach 4.5h keine Veränderungen an der Chromosomenstruktur. Auch an den Kontrollpräparaten, die nur mit 0.01N HCl behandelt wurden, konnten keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden.

Bei der FISH zeigten die Präparate nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung erheblich stärkere Markierungen als die Kontrollpräparate ohne Pepsin/HCl-Vorbehandlung. Stärkere Signale oder stärkere Markierung bedeutet, daß sie aus mehr und dichter liegenden Signalpunkten bestehen als die in den Kontrollpräparaten (vgl. Abbildung 3 und 4). Diese stärkeren Signale waren bereits nach einer Amplifikation gut zu erkennen.

Um zu testen, ob allein durch 0.01N HCl eine Verbesserung der Markierung erreicht werden kann, wurden zwei Gruppen von Präparaten nach der FISH verglichen. Eine Gruppe war nur mit 0.01N HCl, die andere mit Pepsin/HCl (1mg/ml) vorbehandelt. Abbildung 5 zeigt Markierungen eines Präparates, das nur mit HCl vorbehandelt wurde. Die Signale sind stärker als ohne Vorbehandlung, aber etwas schwächer als die Signale bei Präparaten mit Pepsin/HCl-Vorbehandlung (Abbildung 4).

Es wurde ebenfalls untersucht, ob Variationen der Pepsin-Konzentration eine weitere Verstärkung der Signale bewirken können. Dazu wurden Präparate mit verschiedenen Pepsin-Konzentrationen (50µg/ml, 1mg/ml und 2mg/ml in 0.01N HCl) vorbehandelt und nach der FISH miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß Pepsin in einer Konzentratin von 50µg/ml keine stärkere Markierung als 1mg/ml, und 2mg/ml eine schwächere Markierung als 1mg/ml zur Folge hatte. Für alle weiteren Versuche wurde deshalb die Konzentration von 1mg Pepsin/ml gewählt.


Abb. 3 - 5: FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250). Die Vorbehandlungen mit Pepsin bzw. HCl erfolgten jeweils 4.5h bei 37°C. Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumiodid. Abb. 3: Markierungen ohne Pepsin/HCl-Vorbehandlung. Die einzelnen Signalpunkte liegen nicht sehr dicht (Pfeile). Die Markierung ist schwach. Abb. 4: Markierungen nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung (1mg Pepsin/ml in 0.01N HCl). Starke Markierungen an sechs Riesenchromosomen (Pfeile). Die Signalpunkte liegen dicht nebeneinander. Abb. 5: Markierungen nach HCl-Vorbehandlung (0.01N HCl) auf zwei Chromosomen mit aufgelockerten NORs. Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumiodid. Maßstab 25µm.

3.1.2.4. Übersicht Protein-Abbau

In Tabelle 4 sind die verwendeten Proteasen und ihre Auswirkungen auf die Chromosomenmorphologie und die Signale bei der FISH aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Proteasen und deren Auswirkung auf die Morphologie der Riesenchromosomen und die Markierung bei in der FISH mit der rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250).

	Pepsin/HCl	Proteinase K	Trypsin
Konzentration Inkubation: Dauer Temperatur	50µg,1mg,2mg/ml 0.01N HCl	500µg/ml Proteinase K-Puffer	3.5mg/ml 0.9% NaCl
	4.5h 37°C	5min, 1h 65°C	1h, 9.5h 37°C
Änderung der Morphologie	keine	Auflösung der Chromosomen	keine
Auswirkung in der FISH im Vergleich zur Kontrolle ohne Vorbehandlung	viel mehr und dichter liegende Signalpunkte	etwas mehr und weiter auseinander liegende Signalpunkte;	manchmal etwas mehr Signalpunkte

3.2 FISH mit rDNA-Sonde und Verbesserung durch Pepsin/HCI-Vorbehandlung

Bei der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) mit der rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250) waren von den 22 Riesenchromosomen pro Zellkern maximal 5 bzw. 6 Nukleolus-organisierende Chromosomen markiert. Sowohl mit, als auch ohne Pepsin/HCl-Vorbehandlung traten die Signale in zwei verschiedenen Ausprägungen auf. Diese unterschiedlichen Ausprägungen der Signale waren von der jeweiligen Chromosomenstruktur der Nukleolus-organisierenden Region (NOR) abhängig. Die Signale beiderlei Ausprägung konnten durch die Pepsin/HCl-Vorbehandlung verbessert werden. Bei Chromosomen mit kompakter NOR, lagen die Signalpunkte nicht mehr nur an der Oberfläche, sondern markierten den ganzen Chromatinblock (vgl. Abbildungen 6 und 7). Aufgelockerte NORs oder Nucleoli waren nicht nur von wenigen Reihen aus Signalpunkten durchzogen, sondern durch eine große Anzahl von Signalpunkten fast völlig ausgefüllt (vgl. Abbildungen 8 und 9).



Abb. 6 - 9 : FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250) nach Pepsin/HCI-Vorbehandlung. Verschiedene Ausprägungen der Markierung in Abhängigkeit von der Struktur der Nuokleolus-organisierenden Region (NOR). Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Abb. 6: Markierung von zwei kompakten NORs auf zwei homologen Riesenchromosomen (Pfeile). Abb. 7: DAPI Färbung. Abb. 8: Markierung auf einem Chromosom mit stark aufgelockerter NOR (Pfeil). Abb. 9: DAPI Färbung. Maßstab 25µm.

Bei einer FISH ohne rDNA-Sonde im Hybridisierungsmix waren keine Markierungen zu beobachten (Abbildung 10).



Abb. 10: FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet ohne Sonde im Hybridisierungsmix, 2 Mal amplifiziert. Auf den Chromosomen waren keine Markierungen zu erkennen. Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Maßstab 50µm.

3.3 Lokalisation von Phaseolin-Genen durch FISH

3.3.1. Signale der Phaseolin-Sonden

Auf Pepsin-vorbehandelten Präparaten von Riesenchromosomen aus Suspensorzellen von *Phaseolus coccineus* konnten die Phaseolin-Gene durch FISH mit Phaseolin-Sonden aus *Phaseolus vulgaris* und aus *Phaseolus coccineus* nachgewiesen werden. Pro Zellkern fanden sich immer ein bis zwei Riesenchromosomen mit jeweils einer schwachen Markierung. Die Signalpunkte der Markierung lagen hierbei in einigen Fällen direkt auf dem Chromosom (Abbildungen 11 und 12), häufiger aber seitlich am Chromosom auf abstehenden Chromatinsträngen (Abbildungen 13 und 14).



Abb. 11 - 14 : FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit Phaseolin-Sonde aus *P. vulgaris* (3kb-Insert, AG-pPVPH 3.0) nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung. Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Abb. 11: Die Signalpunkte der Markierung liegen direkt auf dem Chromosom, Signale 3 Mal amplifiziert. Abb. 12: DAPI Färbung. Abb. 13: Zwei Markierungen auf zwei homologen Chromosomen, Signale 2 Mal amplifiziert. Die Signalpunkte der beiden Markierungen liegen auf Chromatinsträngen, die vom Chromosom seitlich abstehen. Die Chromosomen sind artifiziell gestreckt. Abb. 14: DAPI Färbung. Maßstab 25µm.

Für den Nachweis der Phaseolin-Gene wurden zwei verschiedene Sonden benutzt. Die 3kb-Insert-Sonde aus *Phaseolus vulgaris* (AG-pPVPH 3.0) und eine "Plasmid-Sonde" aus *Phaseolus coccineus* (als Sonde wurde das gesamte Plasmid pPcoPh.1 eingesetzt). Die Markierungen mit beiden Phaseolin-Sonden waren gleichartig aber unterschiedlich stark. So mußten die Signale der 3kb-Insert-Sonde aus *P. vulgaris* 2 bis 3 Mal amplifiziert werden, um sie fotografisch dokumentieren zu können, während für die Signale der Plasmid-Sonde aus *P. coccineus* 1 Amplifikation ausreichend war. Doch trotz 2 bis 3maliger Amplifikation waren die Markierungen mit der 3kb-Insert-Sonde aus *P. vulgaris* deutlich schwächer als die der Plasmid-Sonde aus *P. coccineus* (vgl. Abbildung 15 und 16. Die Hintergrundsignale waren bei Verwendung der Plasmid-Sonde aus *P. coccineus* deutlich stärker als bei der 3kb-Insert-Sonde aus *P. vulgaris*.

Bei den Amplifikationen der Signale der 3kb-Insert-Sonde war zu beobachten, daß sie erst ab der 2. Amplifikationsstufe erkennbar wurden, und daß die Hintergrundsignale häufig nach der 3. Amplifikation sehr stark zunahmen. Das Präparat war dann mit einem "feinen Grieß" von Hintergrundsignalen bedeckt, was die Differenzierung von Signale gegen Hintergrundsignale erschwerte.



Abb. 15 - 17: FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit zwei verschiedenen Phaseolin-Sonden nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung. Abb. 15: Signale der 3kb-Insert-Sonde (AG-pPVPH 3.0) aus *P. vulgaris* auf zwei Riesenchromosomen (Pfeile). Signale 2 Mal amplifiziert. Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Abb. 16a und b: Signale der "Plasmid-Sonde" aus *P. coccineus* (gesamtes Plasmid pPcoPh.1 als Sonde) auf zwei Chromosomen (Pfeile). Signale 1 Mal amplifiziert. Beide Abbildungen stammen aus einem Kern. Abb. 17a und b: DAPI Färbung. Maßstab 25µm.

3.3.2. Charakterisierung der Phaseolin-Gen-tragenden Chromosomen

Pro Zellkern fanden sich nach der Hybridisierung immer ein bis zwei markierte, einander sehr ähnliche Riesenchromosomen. Diese Chromosomen waren submetazentrisch, gehörten weder zu den größten noch zu den kleinsten und zeigten auf beiden Chromosomenarmen proximales (centromernahes) Heterochromatin. Am Ende ihres kürzeren Armes hatten sie entweder einen kleinen Block oder mehrere kleine Schollen von Heterochromatin. Zwischen diesem Heterochromatinblock bzw. - schollen und dem Centromer befand sich immer ein aufgelockerter Bereich, in dem die Markierung der Phaseolin-Sonde zu finden war. Interkalare Heterochromatinblöcke waren weder am kürzeren noch am längeren Arm dieser Riesenchromosomen zu erkennen. Manchmal waren auch am längeren Arm Heterochromatinblöcke bzw. - schollen zu finden.

3.4 FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen

Durch FISH mit der rDNA-Sonde (8.8kb Insert, pTA250) konnten die Gene für die ribosomalen rRNA (18S, 5.8S und 25S rRNA) auf mitotischen Chromosomen (Abbildung 18) aus dem Wurzelmeristem nachgewiesen werden. Dabei waren pro Kern 5 bis 6 Signale zu erkennen (Abbildung 19). Die Präparate waren nicht mit Pepsin vorbehandelt.



Abb. 18 - 19 : Mitotische Chromosomen aus dem Wurzelspitzenmeristem von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet. Präparate ohne Pepsin/HCl-Vorbehandlung. Abb. 18: 22 Chromosomen in der Metaphase. DAPI/Sulforhodamin Färbung. Die Chromosomen erscheinen weiß auf rotem Hintergrund. Abb. 19: Sechs Signale (Pfeile) nach FISH mit rDNA-Sonde (8.8kb Insert, pTA250). Die Chromosomen sind mit Propidiumiodid gegengefärbt. Maßstab 10µm.

3.5 Detektionsysteme

3.5.1. Avidin/Biotin-Detektions-Systeme

Das Standard-Detektionsystem für alle durchgeführten FISHs mit rDNA- und Phaseolin-Sonden war Biotin/ExtrAvidin-FITC. Die Markierung dieses Detektionssystems bestand meist aus Signalpunkten, die einzeln erkennbar waren. Nur bei Markierungen von kompakten NORs (Abbildung 6) lagen die einzelnen Signalpunkte so dicht nebeneinander, daß sie wie ein Fläche erschienen. Diese Art der Markierung war bei allen drei verwendeten Avidin/Biotin-Detektions-Systemen (ExtrAvidin-FITC/TRITC und Streptavidin/FITC), mit Ausnahme der Farbe, gleich. Nur die Fluoreszenz war bei Streptavidin-FITC schwächer als im Vergleich bei ExtrAvidin-FITC (vgl. Tabelle 5).

3.5.2. Fluorescein(FITC)-dUTP

Die Signale von Fluorescein(FITC)-dUTP unterschieden sich sehr deutlich von denen der Avidin/Biotin-Detektionssysteme. Im Gegensatz zu den sich meist aus einzelnen Signalpunkten zusammengesetzten Markierungen von ExtrAvidin-FITC/TRITC und Streptavidin-FITC, waren die einzelnen Signalpunkte der FITC-dUTP-Markierung nicht aufzulösen (Abbildungen 20 und 21)(vgl. Tabelle 5). Ein weiterer Unterschied zu den Biotin/Avidin-Systemen waren die fehlenden Hintergrundsignale. Statt dessen hatten die Präparate einen sehr schwachen, gelbgrüner Schimmer.

Beim mehrmaligen Durchmustern der Präparate fiel auf, daß die FITC-dUTP-Markierungen durch das Anregungslicht sehr schnell ausblichen. Außerdem wurde beobachtet, daß die Stärke der FITC-dUTP-Markierungen mit zunehmender Lagerungsdauer immer weiter abnahm, d.h. je älter die Sonde war, desto schwächer waren ihre Markierungen in der FISH.



Abb. 20 - 21: FISH an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit rDNA-Sonde (8.8kb-Insert, pTA250) nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung. FITC-dUTP als Detektionsystem. Die Markierungen lassen sich nicht in einzelne Signalpunkte auflösen. Gegenfärbung der Chromosomen mit Propidiumiodid. Abb. 20 : Markierungen auf einem Nucleolus und den NORs von zwei Chromosomen (Pfeile). Abb. 21: Markierungen an vier Chromosomen und einem abgerissenen Chromosomenfragment (Pfeile). Maßstab 25µm.

	ExtrAvidin/ FITC	ExtrAvidin/ TRITC	Streptavidin/ FITC	FITC-dUTP
verwendete Sonden	rDNA Phaseolin	rDNA	rDNA Phaseolin	rDNA
Reporter- Molekül	Biotin-dUTP	Biotin-dUTP	Biotin-dUTP	dUTP
Detektion	ExtrAvidin	ExtrAvidin	Streptavidin	-
Fluoreszenz- farbstoff	FITC (gelbgrün)	TRITC (hellrot)	FITC (gelbgrün)	FITC (gelbgrün)
Ergebnisse:				
einzelne Signalpunkte sichtbar ?	meist ja	meist ja	meist ja	nie
Hintergrund- Signale	je nach Sonde unterschiedlich stark	gering im Vergleich zur Markierung	geringer als bei ExtrAvidin-FITC	keine

Tabelle 5: Verwendete Detektionssysteme. Avidin/Biotin-Systeme und Fluorescein(FITC)dUTP.

4. DISKUSSION

4.1 Zugänglichkeit der Ziel-DNA

Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung (ISH) beruht auf der Ausbildung eines Doppelstranges aus markierter einzelsträngiger Sonden-DNA oder -RNA und bestimmten einzelsträngigen DNA- oder RNA-Sequenzen in cytologischen Präparaten (Zielsequenz) und dem anschließenden Nachweis (Detektion) der dabei gebildeten Hybride. Entsprechend dem jeweiligen Nachweisverfahren unterscheidet man zwischen radioaktiver und nichtradioaktiver *in situ* Hybridisierung. Die Fluoreszenz*in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine spezielle Form der nichtradioaktiven ISH, bei der die markierte Sonden-DNA durch einen Fluoreszenzfarbstoff detektiert wird.

Voraussetzung für alle Formen der ISH ist die Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die **markierte Sonde** und das entsprechende **Detektionssystem**. Im Vergleich zur FISH ist die Zugänglichkeit für die radioaktive ISH weniger bedeutsam, denn die Markierung der Sonden-DNA erfolgt hier über ein radioaktives Isotop, das ohne zusätzliche Moleküle detektiert werden kann. Bei der FISH dagegen wird bereits zur Markierung der Sonden-DNA ein Reporter-Molekül wie z.B. Biotin benötigt und für die Detektion kommen noch weitere, große Moleküle (Avidin, Antikörper) hinzu. Eine ausreichende Zugänglichkeit der Zielsequenz muß es deshalb erlauben, daß eine ungehinderte Hybridisierung mit der Sonden-DNA und deren Detektion stattfinden kann. Da sich aber eine gute Zugänglichkeit meist nicht ohne Veränderung oder gar Zerstörung der Chromosomenmorphologie erreichen läßt, muß oft ein Kompromiß zwischen Verbesserung der Zugänglichkeit und weitgehender Erhaltung der Chromosomenmorphologie eingegangen werden.

Weitere Faktoren für alle Formen der ISH sind die Gesamtanzahl der vorhandenen Zielsequenzen und deren Abstand untereinander. Sequenzen, die in hoher Zahl und tandemartig hintereinander liegend vorkommen, wie z.B. rRNA-Gene, lassen sich relativ leicht nachweisen. Solche Sequenzen jedoch, die nur in wenigen Kopien und vielleicht sogar zusätzlich zerstreut vorliegen oder einmalige Sequenzen lassen sich viel schwerer nachweisen. Dies war sicher ein Grund, warum die ersten ISH an den repetitiven rRNA-Genen durchgeführt wurden (GALL und PARDUE, 1969).

Auf den Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* wurden bereits 1972 von AVANZI et al. sowie BRADY und CLUTTER die ersten radioaktiven ISH an den mittelrepetitiven rRNA-Genen durchgeführt. Die Lokalisation der im haploiden Genom nur in wenigen Kopien (*low-copy*) vorliegenden Phaseolin-Gene auf Riesenchromosomen wurde dagegen erst 1990 von SCHUMANN et al. beschreiben, und von der FISH an den mittelrepetitiven rRNA-Genen von *Phaseolus coccineus* wurde zum ersten Mal 1991 in der Diplomarbeit von BAUMANN berichtet. In der Abt. Zellbiologie der Universität Kaiserslautern wurde dann zwar mehrfach versucht, die Phaseolin-Gene auch durch FISH zu lokalisieren, was aber nicht gelang. Wahrscheinlich lag der Grund in der ungenügenden Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die Sonde und/oder das Detektionssystem.

4.2 Abbau von Proteinen

Da die Zugänglichkeit von der Packungsdichte der DNA im Chromatin abhängig ist, und diese durch chromosomale Proteine (Histone, Nichthiston-Proteine) bestimmt wird, muß den **chromosomalen Proteinen** ein entscheidender Einfluß auf die Zugänglichkeit beigemessen werden (HARRIS, 1992). Bereits 1988 beobachteten SIMPSON et al. an Quetschpräparaten von *Pisum*, daß die Signale bei der nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung durch die Vorbehandlung mit Pronase, einem protein-spaltendem Enzym, verbessert wurden. Allerdings wurde auch die Struktur der Chromosomen deutlich angegriffen. Ähnliche Schwierigkeiten traten auch beim Einsatz von Proteinase K auf. Entweder war die Konzentration zu gering und zeigte keine Verbesserung der Signale gegenüber der Kontrolle, oder sie war zu hoch und zerstörte die Morphologie, sodaß die Chromosomen nicht mehr zu identifizieren waren (MOURAS et al., 1989). Erst in jüngerer Zeit gibt es Hinweise darauf, daß Proteinase K mit Erfolg zur Vorbehandlung eingesetzt werden kann (BAUWENS et al., 1991).

Es wurde deshalb untersucht, ob sich durch den Abbau von Proteinen in Präparaten von Riesenchromosomen aus *Phaseolus coccineus* die FISH verbessern läßt, sodaß sich auch *low-copy* Gene wie **Phaseolin** lokalisieren lassen.

Dazu wurden die Proteine in Riesenchromosomen-Präparaten mit Hilfe von verschiedenen protein-spaltenden Enzymen (Proteasen) enzymatisch abgebaut und die Auswirkungen dieser Vorbehandlungen auf die FISH verglichen. Als Test-System diente die FISH mit einer rDNA-Sonde nach BAUMANN (1991). Wenn der Abbau der Proteine einen Einfluß auf die Zugänglichkeit der Zielsequenz hat, sollte sich dies bei der Test-FISH mit der rDNA-Sonde durch stärkere Signale als bisher zeigen. Die Wirkung der drei Endopeptidasen Trypsin, Proteinase K und Pepsin wurden dabei untersucht.

Trypsin

Die ersten Versuche mit Trypsin-Vorbehandlung bei *Phaseolus* Riesenchromosomen wurden von KöHLER (1992) durchgeführt. Trypsin, das als Vorbehandlung für die G-Bänderungstechnik bereits seit längerer Zeit Verwendung findet (COMINGS et al., 1973), wurde dazu mit der in der G-Bänderung üblichen Konzentration von 0.5ml Bacto Trypsin in 70ml 0.9% NaCl (entspricht 0.357mg Trypsin 1:250/ml 0.9% NaCl) und einer verlängerten Inkubationsdauer von 1h angewendet. Diese Vorbehandlung veränderte die Morphologie der Riesenchromosomen nicht, und brachte bei der FISH **keine stärkere** Markierung als die Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit wurde Trypsin deshalb mit der 10fachen Konzentration eingesetzt und die Inkubationsdauer von 1h und auf 9.5h ausgedehnt. Weder die höhere Konzentration noch die Kombination mit der verlängerten Inkubationszeit bewirkten eine deutliche Verbesserung der Signale bei der FISH. Die Chromosomenmorphologie blieb bei allen Versuchen mit Trypsin-Vorbehandlung unverändert.

Proteinase K

Weitere Versuche wurden mit Proteinase K durchgeführt, einer Protease, die für die ISH an Ultra-Dünnschnitten in der Elektronenmikroskopie (LEITCH et al., 1992), aber auch als Vorbehandlung für die FISH (PINKEL, 1986; KALLIONIEMI et al., 1992) verwendet wird, und daher besonders geeignet erschien. Die Beobachtungen im Mikroskop zeigten, daß sich die Riesenchromosomen bei Behandlung mit Proteinase K (500µg Proteinase K/ml in Proteinase K-Puffer) bereits nach 1h aufgelöst waren. Daher wurde die Inkubationszeit auf 5min reduziert. Die Markierung war bei den Riesenchromosomen mit 5minütiger Proteinase K-Vorbehandlung etwas stärker als bei den unbehandelten Kontrollen, aber bedingt durch erste Auflösungserscheinungen der Chromosomen lagen sie stark zerstreut. Der Grund für das rasche Auflösen der Chromosomen dürfte wohl darin liegen, daß Proteinase K die Peptidbindungen zwischen allen Aminosäuren außer Prolin hydrolysieren kann, was zu einem schnellen Abbau aller Proteine führt. Daß Proteinase K dennoch auch zur Vorbehandlung bei pflanzlichen Objekten geeignet ist, zeigen die Ergebnisse bei Arabidopsis thaliana (BAUWENS et al., 1991). Für die Verwendung bei Phaseolus-Riesenchromosomen müßten jedoch Konzentration und Inkubationszeit erst weiter angepaßt werden.

Pepsin

Pepsin ist eine Protease, die nur selten zur Vorbehandlung für die FISH eingesetzt wird. Bei der hier verwendeten Konzentration von 1mg Pepsin/ml in 0.01N HCl zeigte sich, daß sich die Morphologie der Riesenchromosomen selbst nach einer Inkubationsdauer von 4.5h nicht veränderte. Die **Markierung** bei der FISH war jedoch die **stärkste** von allen getesteten Protease-Vorbehandlungen. Sie bestand aus mehr und dichter liegenden Signalpunkten als bei der Kontrolle ohne Vorbehandlung (vgl. Abbildungen 3 und 4). Versuche, durch Variation der Pepsin-Konzentration (50µg und 2mg/ml) eine zusätzliche Verbesserung zu bewirken, brachten keinen Erfolg.

Zusätzlich zur Kontrolle ohne Vorbehandlung wurden weitere Kontroll-Präparate nur mit 0.01N HCl (pH 2) behandelt (HCl-Kontrolle). Nach 4,5h waren keine Veränderungen der Chromosomenmorphologie zu beobachten. Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen (COMINGS und AVELINO, 1974; ZHANG und YANG, 1990), bei denen nach Inkubation mit 0.2N HCl (etwa pH 0.8) ebenfalls keine morphologischen Veränderungen festzustellen waren. Die HCl-Kontrollpräparate zeigten stärkere Signale als die Kontrollen ohne Vorbehandlung. Allerdings waren sie schwächer als bei der Anwendung von Pepsin/HCl (vgl. Abbildungen 3-5). Die stärkeren Signale bei der Vorbehandlung mit Pepsin/HCl sind folglich nicht einzig auf das Pepsin, sondern vielmehr auf die Kombination von Pepsin und HCl zurückzuführen.

Vermutlich beruht die Verbesserung der Signale auf zwei unterschiedlichen Wirkungen von HCl und Pepsin.

Durch Säure-Extraktion mit 0.2N oder 0.01N HCl lassen sich **Histone** aus Chromatin extrahieren (COMINGS und AVELINO, 1974; SPIKER und KEY, 1975; ZHANG und YANG, 1990). Da das Histon H1 und im Nucleosomen-Core die Histone H2a, H2b, H3 und H4 einen maßgeblichen Anteil an der Packungsdichte des Chromatins haben, bewirkt ihre Extraktion eine Auflockerung des Chromatins (PAULSON und LAEMMLI, 1977). Die Auflockerung könnte die Zugänglichkeit für die Sonde erleichtert haben und der Grund für die stärkeren Signale der HCl-Kontrolle sein.

Da durch die Säure-Extraktion nahezu alle Histone, aber nur wenige Nichthiston-Proteine entfernt werden (JEPPSEN et al., 1978), könnte die weitere Verbesserung durch Pepsin/HCl auf den Abbau der verbleibenden Nichthiston-Proteine durch Pepsin zurückzuführen sein. Daß **chromosomale Nichthiston-Proteine** nach dem Entfernen von Histonen von Proteasen abgebaut werden können, wurde mehrfach beschrieben (JEPPSEN, 1978; NAKANE et al., 1978). Dabei wurde festgestellt, daß durch den Abbau der Nichthiston-Proteine mit Pronase die Struktur des restlichen DNA-ProteinKomlexes stark aufgelockert wurde (NAKANE et al., 1978). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß sich die Struktur von Chromosomen, deren Histone entfernt worden waren, durch Behandlung mit Chymotrypsin oder Trypsin auflöste, während sich die Struktur intakter Chromosomen mit Histonen durch die gleiche Protease-Behandlung nicht sichtbar veränderte (ADOLPH et al., 1977). Dies spricht dafür, daß der Angriff von Proteasen auf die chromosomalen Nichthiston-Proteine durch das Entfernen der Histone deutlich erleichtert wird.

Somit ließen sich die stärkeren Markierungen bei der FISH mit Pepsin/HCl-Vorbehandlung dadurch erklären, daß die Zugänglichkeit einerseits durch Extraktion der Histone mit **HCl** verbessert und andererseits durch den Abbau chromosomaler Nichthiston-Proteine mit **Pepsin** zusätzlich verstärkt wird. Dadurch erscheint es auch verständlich, daß die Behandlung mit Trypsin, bei der nur Nichthiston-Proteine mit hohem Molekulargewicht, aber keine Histone angegriffen werden (BURKHOLDER und DUCZEK, 1980), nicht zu einer Verbesserung der Signale führte.

Pepsin/HCl wird auch im Bereich der Humancytogentik in jüngster Zeit zur Vorbehandlung für die FISH verwendet. Allerdings finden dort geringere Konzentrationen von 0.5µg oder 50µg Pepsin/ml in 0.01N HCl (SCHERTHAN et al. 1992; RIED et al., 1992), sowie deutlich kürzere Inkubationszeiten von 10min Verwendung.

4.3 Lokalisation der ribosomalen Gene

Die Vorbehandlung der Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet mit Pepsin/HCl bewirkte eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenz-Markierungen bei der FISH mit der rDNA-Sonde. Die Signale waren bereits nach einer Amplifikation so gut zu erkennen, daß auf eine zweite Amplifikation (bei BAUMANN, 1991 manchmal notwendig), verzichtet werden konnte.

Von den 22 Riesenchromosomen eines Kerns waren meist 5, manchmal auch alle 6 NORs (Nucleolus-organisierende Regionen) der NO-Chromosomen markiert. Wie bei Präparaten ohne Vorbehandlung traten die NORs vorzugsweise in zwei Erscheinungsformen auf. Entweder war das Chromatin der NORs aufgelockert, oder es war kompakt. An beiden Formen war die Verbesserung der Markierung durch die Pepsin/HCl-Vorbehandlung zu beobachten.

Bei NORs mit **kompaktem** Chromatin lagen die Signalpunkte nicht mehr nur vereinzelt an der Oberfläche, sondern sie füllten den gesamten Chromatinblock nahezu vollständig aus. NORs mit **aufgelockertem** Chromatin waren nicht mehr nur von einzelnen Reihen von Signalpunkten durchzogen, sondern der gesamte Bereich war mit Signalpunkten mehr oder weniger dicht bedeckt (vgl. Abbildungen 6-9). Daß sich Markierungen bei der FISH manchmal als einzelne, eng benachbart liegende Signalpunkte darstellen, wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (KALLIONIEMI et al., 1992; LEITCH et al., 1992).

Der Kondensationsgrad des Chromatins der NORs kann bei Phaseolus-Riesenchromosomen durch Umweltfaktoren oder Genaktivität beeinflußt sein. Es ist bekannt, daß Anzuchttemperaturen unter oder über dem Optimum (NAGL 1969a;1970a) wie auch die in vitro Behandlung mit CaCl₂ (NAGL, 1970b) eine Kondensation der Nucleolus organisierenden-Chromosomen bewirken können. Der Einfluß der Genaktivität konnte durch Hemmung der RNA-Synthese mit Actinomycin D (NAGL, 1969b) nachgewiesen werden, was ebenfalls zur Kondensation der NO-Chromosomen führte. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß nur aufgelockerte NORs ³H-Uridin aufnehmen, was sie im kondensierten Zustand nicht taten (NAGL, 1969b). Der daraus abgeleitete Zusammenhang, daß die Aktivität von Genen in kondensiertem Chromatin in der Regel geringer ist als die in aufgelockertem, ist heute allgemein anerkannt. Entsprechend spricht man bei Markierungen von rRNA-Genen auf aufgelockertem Chromatin von aktiven Genen und solchen auf kondensiertem Chromatin von inaktiven rRNA-Genen (GUSTAFSON et al., 1988; MUKAI et al., 1991; LEITCH et al., 1992). Daß nicht alle NORs gleich kondensiert sind sondern einige aufgelockert, andere dagegen kompakt, steht im Einklang mit den Ergebnissen von FREDIANI et al. (1986), daß bei Phaseolus coccineus zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung nur 2-4 der 6 NO-Chromosomen einer Suspensorzelle an der Organisation des Nucleolus beteiligt sind.

Die Signale der rDNA-Sonde waren auf maximal 3 Chromosomenpaaren pro Kern zu finden, die sich aufgrund ihrer Größe und Heterochromatinverteilung gemäß dem modifizierten, vorläufigen **Karyotyp** nach SCHUMANN et al. (1990) als Chromosomen Nr. 1, 5 und 11 einordnen ließen. Hinweise für Markierungen auf dem terminalen Heterochromatin von Chromosom Nr. 2 (AVANZI et al., 1972) waren nicht zu beobachten.

4.4 Lokalisation der Phaseolin-Gene

Phaseolin-Gene

Phaseolin ist ein Speicherprotein vom Typ der Viciline, das in den reifen Samen von *Phaseolus vulgaris* als Hauptspeicherprotein etwa 50% der Gesamtproteine ausmacht (OSBORN, 1988). Durch eindimensionale SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfatepolyacrylamid gel electrophoresis) läßt es sich in drei Untereinheiten auftrennen, die als α -, β - und γ -Phaseolin bezeichnet werden. Die beiden α - und β -Phaseolin-Untereinheiten werden von **zwei Gen-Familien** kodiert, wobei die Gene für α - Phaseolin zwei *direct repeats* enthalten, die bei Genen für β -Phaseolin nicht vorkommen. Für die γ -Phaseolin-Untereinheit wurde bisher kein eigenes Gen gefunden; es gibt Hinweise darauf, daß sie nur durch eine post-translationale Modifikation aus β -Phaseolin hervorgeht (SLIGHTOM et al., 1985). Der Unterschied in den DNA-Sequenzen zwischen den Genen für die \hat{A} - und β -Phaseolin-Untereinheiten ist gering und weist zwischen genomischen Klonen eine Homologie von 98% auf (ANTHONY et al., 1990). Die Länge der kodierenden Sequenzen in genomischen Klonen beträgt 1263bp für β -Phaseolin (SLIGHTOM et al., 1983) und 1224bp für α -Phaseolin (nach Daten aus EMBL-Sequenzdatenbank, Nr. X52626, ANTHONY et al., 1990).

Versuche zur Bestimmung der Anzahl von Phaseolin-Genen weisen im Embryo von *Phaseolus vulgaris* cv. Tendergreen auf 6-8 Kopien pro haploidem Genom hin (TALBOT et al., 1984). In den Riesenchromosomen ist ihre Anzahl lateral höchstwahrscheinlich erheblich gesteigert, denn die Kerne der größten Suspensorzellen bei *Phaseolus coccineus* haben einen Ploidiegrad von max. 8192C (BRADY, 1973). Es ist deshalb anzunehmen, daß die Phaseolin-Gene in den Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* in einer Häufigkeit von einigen tausend Kopien vorliegen. Dennoch ist ihre Lokalisation bisher nur durch die radioaktive ISH gelungen (SCHUMANN et al., 1990; BAUMANN, 1991), während Versuche mit nichtradioaktiver ISH nicht erfolgreich waren.

Lokalisation

Nachdem, wie hier gezeigt werden konnte, die Pepsin/HCl-Vorbehandlung der Riesenchromosomen für die Signale der rDNA-Sonde bei der FISH eine deutliche Verbesserung brachte, wurde versucht, auch die Phaseolin-Gene durch die FISH zu lokalisieren. Dabei fanden sich auf den Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet pro Kern ein bis zwei markierte Chromosomen, bei denen es sich aufgrund ähnlicher Größe und Heterochromatinverteilung um Homologe handeln dürfte. Die Signale lagen subtelomer auf dem kürzeren Chromosomenarm in stark aufgelockertem Chromatin. Meist waren sie zwar direkt auf dem Chromosom abstanden (vgl. Abbildungen 11-14). Ob es sich bei diesen Auflockerungserscheinungen, wie bei BAUMANN (1991) beschrieben, um einen Puff handelt, also dekondensiertes Chromatin als Ausdruck von Genaktivität, ist in diesem Fall schwer zu beurteilen, denn es könnte sich dabei auch um die Folge einer lokalen Auflösung der Chromatinstruktur durch die Pepsin/HCl-Vorbehandlung handeln.

Die markierten Chromosomen können als mittelgroße submetazentrische Chromosomen mit proximalem (centromernahem) Heterochromatin auf beiden Seiten des Centromers charakterisiert werden. Interkalare Heterochromatinbanden waren nicht zu beobachten. Am kürzeren Arm waren immer, am längeren nur bei der Hälfte der Chromosomen terminale Heterochromatin-Schollen zu finden.

Gemäß dem vorläufigen Karyotyp (NAGL, 1967) und dem modifizierten vorläufigen Karyotyp (SCHUMANN et al., 1990) entspricht diesen Merkmalen am besten Chromosom Nr. 7 (Abbildungen 22 und 23). Diese Identifizierung deckt sich jedoch nicht mit den Interpretationen von SCHUMANN et al. (1990) und BAUMANN (1991), die das Chromosom Nr. 3 als Lokalisationsort für die Phaseolin-Gene beschrieben haben (Abbildung 23). Diese unterschiedliche Einordnung der markierten beide Chromosomen rührt daher. daß Autoren von einer schmalen Heterochromatinbande im längeren Arm ausgehen, deren Vorkommen aber in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Somit stellte sich die Frage, ob diese schmale Heterochromatinbande möglicherweise durch die Pepsin/HCl-Vorbehandlung aufgelöst wurde. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Phasenkontrastaufnahmen von vier Riesenchromosomen direkt nach der Präparation (noch vor der Pepsin/HCl-Behandlung), mit den Aufnahmen nach der FISH verglichen. Bei keinem der vier Chromosomen war im Phasenkontrast-Bild auf dem längeren Arm eine Heterochromatinbande zu erkennen. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß die Phasenkontrastaufnahmen bei geringer Vergrößerung aufgenommen waren, und somit die Möglichkeit nicht auszuschließen ist, daß sehr kleine Banden auf den Fotos nicht zu erkennen sind.

Ein weiteres Kennzeichen der markierten Chromosomen sind die telomerischen **Heterochromatinschollen** am kürzeren und manchmal auch am längeren Arm. Sie könnten den "terminalen Knöpfen" entsprechen, die nach NAGL (1967) auf Chromosom Nr. 7 manchmal auftreten. Die Länge der Chromosomen ist kein geeignetes Kriterium, um Chromosom Nr. 3 von Nr. 7 eindeutig zu unterscheiden, da sie durch Streckung bei der Präparation sehr stark variieren kann.

Es scheint damit Hinweise zu geben, daß die Phaseolin-Gene bei *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet nicht auf Chromosom Nr. 3 sondern auf Chromosom Nr. 7 liegen.



Abb. 23: Modifizierter vorläufiger Karyotyp der Riesenchromosomen aus Phaseolus coccineus nach SCHUMANN et al. (1990) mit dem Lokalisationsort für Phaseolin (P) auf Chromosom Nr. 7 statt Nr. 3. Heterochromatin ist dunkel und Euchromatin ist hell dargestellt. R, Lokalisationsorte der rRNA-Gene für die 18S, 5.8S und 25S rRNA.

Signale der beiden Phaseolin-Sonden

Als Sonden für die Phaseolin-Gene wurden das 3kb-Insert aus P. vulgaris (3kb-Insert-Sonde) bzw. das gesamte Plasmid mit einem Phaseolin-Gen aus P. coccineus eingesetzt ("Plasmid-Sonde"). Ganze Plasmide werden nur selten als Sonde für die FISH eingesetzt (PINKEL et al., 1986). Für die Lage der Phaseolin-Gene auf den Chromosomen ergab sich bei Verwendung der beiden verschiedenen Sonden kein Unterschied. Aber die Stärke der detektierten Signalpunkte war bei beiden Sonden deutlich verschieden (vgl. Abbildungen 15 und 16). Nach der ersten Amplifikation waren die Signale der Plasmid-Sonde bereits stark genug um sie zu dokumentieren, während in den Präparaten, die mit der 3kb-Insert-Sonde hybridisiert worden waren,

sind

gestriche

noch nichts zu erkennen war. Diese mußten zwei bis drei Mal amplifiziert werden, bis die Signale fotografisch festgehalten werden konnten.

Daß die Signalpunkte der Plasmid-Sonde stärker waren, dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, daß (1) bei Einsatz einer "Plasmid-Sonde" prinzipiell mehr Sondenmoleküle detektierbar sind, als bei Verwendung einer Sonde aus Insert-Sequenz. Die (2) größere Homologie zur Zielsequenz scheint als Begründung für die stärkeren Signale eher unwahrscheinlich.

1) Mehr detektierte Sondenmoleküle

Zum besseren Verständnis der folgenden Ausführungen soll der Zusammenhang zwischen den Fragmenten der Sonden-DNA und Stärke der Signale kurz erläutert werden. Beim Markieren der doppelsträngiger Sonden-DNA durch Nick-Translation entstehen in beiden Strängen statistisch verteilte Einzelstrangbrüche. Da diese Bruchstellen in beiden Strängen nicht an der selben Stelle, sondern versetzt liegen, entstehen Fragmente die sich partiell überlappen. Bei der Denaturierung trennen sich die Einzelstränge und zerfallen an den Bruchstellen in die einzelne Fragmente. Während der Hybridisierung können die Fragmente dann in einer Konkurrenzreaktion entweder mit der komplementären Zielsequenz oder untereinander hybridisieren. Hybridisieren sie untereinander, werden sie durch ihre überlappenden Stellen vernetzt und bilden Fragmentketten. Diese können nur noch mit ihrem einzelsträngigen Ende binden, während der vernetzte, doppelsträngige Anteil räumlich absteht (MEINKOTH und WAHL, 1984). Diese vernetzten Fragmente können zu einer Verstärkung des Signals beitragen (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1992).

Da die gesamte 3kb-Sonde nur aus Insert-Sequenzen besteht, haben alle Fragmente die Möglichkeit, entweder mit der Zielsequenz oder gegenseitig zu hybridisieren und Vernetzungen von Fragmenten zu bilden (Abbildung 24a).

Die Plasmid-Sonde enthält aber außer den Insert-Sequenzen auch Vektorsequenzen. Bei der Denaturierung entstehen deshalb außer Fragmenten aus Insert-Sequenzen auch solche aus Vektoranteilen oder aus kombinierten Vektor- und Insert-Anteilen. Da die Vektorsequenzen aber nicht mit der Zielsequenz hybridisieren, stehen sie zusätzlich für das Vernetzen der Fragmente zur Verfügung. Verkettungen aus Vektor- und kombinierten Vektor-Insert-Sequenzen können ebenfalls an die Ziel-Sequenzen binden und den Anteil von gebundenen und vernetzten Fragmenten erhöhen (Abbildung 24b). Damit können insgesamt mehr Reporter-Moleküle detektiert werden, was zu stärkeren Signalpunkten führt.



Abb. 24: Schema der Hybridisierungsmöglichkeiten verschiedener Sonden-DNA-Fragmente. Bei der Markierung der doppelsträngigen Sonden-DNA entstehen durch nick translation Fragmente, die sich gegenseitig überlappen. Während der Hybridisierung können diese Sonden-DNA-Fragemente in einer Konkurenzreaktion entweder mit der Ziel-DNA oder gegenseitig hybridisieren. Durch die Vernetzung der Fragmente an ihren sich gegenseitig Überlappenden Bereichen, entstehen Ketten aus Sonden-DNA-Fragmenten. a) Sonden-DNA die nur aus Insert-Sequenzen besteht, bildet nur wenige Ketten. b) Sonden-DNA, die aus Vektor- und Insert-Sequenzen besteht, enthält zusätzliche Fragmente, die sich aus Vektor- und kombinierten Vektor- und Insert zusammensetzen. Da die Vektor-Anteile aber nicht komplementär zur Ziel-Sequenz sind, können sie nur gegenseitig hybridisieren. Damit tragen sie zu einer weiteren Vernetzung bei. Über die Kombinierten Vektor-Insert-Fragmente hybridisieren auch diese zusätzlichen verketteten Fragmente mit der Ziel-DNA.

2) Größere Homologie zur Ziel-Sequenz

Für die Hybridisierung von Nukleinsäuremolekülen spielt außer den Hybridisierungsbedingungen die Homologie zwischen den beiden Molekülen eine große Rolle. Je mehr Fehlpaarungen (mismatches) es zwischen zwei nicht ganz komplementären Molekülen gibt, um so instabiler ist der hybridisierte Doppelstrang (MEINKOTH UND WAHL, 1984). Je instabiler aber der Doppelstrang, um so leichter können sich die beiden Nukleinsäuremoleküle wieder voneinander lösen und für die Detektion verloren gehen. Da die chromosomale Zielsequenz aus P. coccineus stammt, ist es verständlich, daß die Plasmid-Sonde mit der Phaseolin-Sequenz aus P. coccineus eine höhere Homologie zur Zielsequenz hat als die 3kb-Insert-Sonde mit der Phaseolin-Sequenz aus P. vulgaris. Genaue Aussagen über den Grad der Homologie sind aber derzeit nicht möglich, da nur die DNA-Sequenzen für Phaseolin-Untereinheiten aus P. vulgaris bekannt ist. Es wird aber an der Sequenzierung des Phaseolin-Gens aus P. coccineus gearbeitet; bis jetzt sind ca. 400bp bekannt. Unveröffentlichte Ergebnisse des Vergleiches zwischen dem bisher sequenzierten Teil des Phaseolin-Gens aus P. coccineus und der Sequenz für die B-Phaseolin Untereinheit aus P. vulgaris (ab Position 96 ab Startcodon ATG) zeigen auf einer Länge von 280bp einen Unterschied von 3 Basen, also etwa ein Prozent Abweichung (R. BLUM, persönliche Mitteilung).

Die Stringenz-Bedingungen bei der Hybridisierung, der Stringenzwaschung und der weiteren Waschschritte erlaubten jedoch immer mehr als 14% Fehlpaarung (86% Homologie). Selbst wenn der Unterschied in den Sequenzen zwischen *P. coccineus* und *P. vulgaris* bis zur vollständigen Sequenzierung von 1 auf 2 Prozent steigt (was dem Unterschied zwischen den Genen für die α - und β -Phaseolin-Untereinheiten entsprechen würde) liegt dies noch immer deutlich unter den hier erlaubten 14 Prozent. Damit scheint es unwahrscheinlich, daß die Unterschiede in der Homologie zwischen Zielsequenz und den Phaseolin-Genen der beiden Sonden für die verschieden starken Signale verantwortlich sind.

Kreuzhybridisierungen

Für den Vektor pBR322 der 3kb-Insert-Sonde wurde von BAUMANN (1991) gezeigt, daß bei der Hybridisierung mit ³⁵S-markiertem Vektor keine Markierungen auf den Chromosomen zu beobachten waren. Für den Vektor pUC18 der Plasmid-Sonde wurde ein solcher Test nicht durchgeführt. Im Vergleich zu den Signalen der 3kb-Insert-Sonde waren die Signale der Plasmid-Sonde aber genauso spezifisch (vgl. Abbildungen 15 und 16). Kreuzhybridisierungen zwischen dem Vektor der Plasmid-Sonde und der chromosomalen DNA sind somit nicht wahrscheinlich.

ISHs bei Pflanzen

Während die FISH inzwischen die dominierende Form der in situ Hybridisierung bei Untersuchungen an Chromosomen von Menschen geworden ist und sich bereits single-copy Gene mit einer Länge von nur 500bp nachweisen lassen (LEMIEUX, 1992), hat sie bei Untersuchungen an pflanzlichen Objekten erst in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung zu gewonnen. Bei Pflanzen wurde sie bisher nur zur Analyse der Verteilung von mittelrepetitiven rRNA-Genen (LEITCH et al., 1992; GRIFFOR et al., 1991) und der Lokalisation repetitiver Sequenzen wie Telomer Repeats (RAWLINS et al., 1991; SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON et al., 1991), Tandem Repeats (LEITCH et al., 1991; MALUSZYNSKA und HESLOP-HARRISON, 1991) und Dispersed Sequences (JOUVE et al., 1991) eingesetzt. Der Nachweis von single- und low-copy Genen bei Pflanzen erfolgte meistens jedoch durch radioaktive ISH (HUANG et al., 1988, 6.6kb single-copy; MOURAS et al., 1989, 1.6kb single-copy; HUANG et al., 1989, 1.9kb single-copy; SCHUMANN et al, 1990, 1.4kb low-copy). Nur selten gelang die Lokalisation von single- und low-copy Genen durch nichtradioaktive ISH. In allen beschriebenen Fällen kam dabei auch nicht die FISH, sondern die Enzym-katalysierten Farbreaktionen zur Anwendung (SIMPSON et al., 1988, 13.5kb single-copy; GUSTAFSON, et al., 1990, 900pb low-copy).

In diesem Zusammenhang ist die Lokalisation der Phaseolin-Gene an Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* durch FISH für den Fortschritt in der nichtradioaktive ISH von Interesse. Denn es wurden damit erstmals DNA-Sequenzen mit einer Länge von ca. 1800bp (Insert-Sequenz der Plasmid-Sonde aus *P. coccineus*), die im haploidem Genom als *low-copy* Gene vorliegen, auf polytänen Riesenchromosomen von Pflanzen **durch FISH** lokalisiert.

4.5 FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen

Bei der FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen aus dem Wurzelmeristem von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet fanden sich pro Kern 5 oder 6 Signale (Abbildung 19). Eine Identifizierung der einzelnen Chromosomen war aufgrund ihrer geringen Größe und der wenigen ausreichend guten Präparate nicht möglich. Die Anzahl von 5 bis 6 NORs steht in Einklang mit den Beobachtungen von SCHWEIZER und AMBROS (1979), die bei ihren Untersuchungen mit Silberfärbung im Durchschnitt 5.5 NORs pro Kern nachweisen konnten, was auf 6 Nukleolus-organisierende Chromosomen hinweist.

Dies entspricht der Zahl von markierten Nucleolus-organisierenden Riesenchromosomen bei der FISH mit rDNA-Sonde (BAUMANN, 1991; Ergebnisse dieser Arbeit).

4.6 Signale der Detektionssysteme

Das hier hauptsächlich verwendete Avidin/Biotin-System ist ein indirektes Detektionssystem. Biotin wird dabei als Reportermolekül, z.B. in Form von Biotin-dUTP, in die Sonden-DNA eingebaut und nach der Hybridisierung durch die Detektion mit konjugiertem Avidin nachgewiesen. Für den Nachweis ist Avidin entweder mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. FITC) oder einem Enzym, das eine Farbreaktion katalysiert, gekoppelt.

Beim Nachweis mit Avidin, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (z.B. Avidin-FITC), kann man zu schwache Signale durch eine sog. Amplifikation verstärken (PINKEL et al., 1986). Dazu inkubiert man mit einem Antikörper gegen Avidin, der mit Biotin konjugiert ist, und gibt erneut Avidin-FITC hinzu. Dadurch erhöht sich die Anzahl der FITC-Moleküle und die Markierung wird stärker. Anstelle von Avidin wurden hier die Derivate ExtrAvidin bzw. Streptavidin verwendet. Sie besitzen zwar eine geringere Bindungsaffinität zu Biotin, zeichnen sich aber durch weniger unspezifische Bindungseigenschaften aus, wodurch ein besseres Signal/Hintergrund-Verhältnis erreicht wird. Um für spätere Mehrfach-*in situ* Hybridisierungen ein weiteres Detektionssystem einzusetzen zu können, wurde bei der FISH mit der rDNA-Sonde alternativ zum Avidin/Biotin-System die Detektion mit FITC-dUTP getestet. Dabei handelt sich um ein direktes Detektionssystem, bei dem der Fluoreszenzfarbstoff über ein Nukleotid direkt in die Sonden-DNA eingebaut wird.

Die Verwendung der beiden Detektionssysteme mit der gleichen Sonde (rDNA) führte zu unterschiedlichen Arten von Signalen. Bei dem indirekten Avidin/Biotin-Detektionssystem ließen sich die Signale in der Regel immer in einzelne **Signalpunkte auflösen** (Abbildung 4). Die einzige Ausnahme waren Signale von kompakten NORs, bei denen die einzelnen Signalpunkte sehr dicht lagen und teilweise miteinander "verschmolzen". Signale des direkten Detektionssystems FITC-dUTP ließen sich dagegen **nicht** in einzelne Signalpunkte **aufzulösen**, sondern erschienen fast wie eine homogene Fläche (Abbildungen 20 und 21).

Der Grund für dieses unterschiedliche Erscheinungsbild könnte sein, daß FITC-dUTP bei der Markierung der Sonde mit großer Häufigkeit in die Sonden-DNA eingebaut wurde. Damit wäre der Abstand zwischen den einzelnen FITC-Molekülen so gering, daß die Vergrößerung des Mikroskops nicht ausreicht, um die dicht nebeneinander stehenden FITC-Moleküle in einzelne Signalpunkte aufzulösen. Bei dem indirekten Nachweis über das Avidin/Biotin-System läßt sich vermuten, daß Biotin zwar mit ähnlicher Häufigkeit in die Sonden-DNA eingebaut wird, aber nicht jedes Biotin-Molekül bei der Detektion auch nachgewiesen werden kann. Vermutlich bedingt die räumliche Ausdehnung der Komplexe aus Avidin/Biotin und Antikörper, daß sie sich bei der Detektion nur in größerem Abstand voneinander aufbauen können. Dadurch wäre die Entfernung zwischen zwei solchen fluoreszierenden Komplexen wesentlich größer als zwischen zwei FITC-dUTP Molekülen. Eventuell ist dieser Abstand groß genug, um diese Komplexe im Mikroskop voneinander optisch zu trennen, was die einzeln auflösbaren Signalpunkte erklären würde (Abbildung 25).



Abb. 25: Modell wie sich die Signale des Avidin/Biotin-Detektionssystems von den FITC-dUTP-Signalen unterscheiden könnten. a) Bei der Markierung der Sonden-DNA durch FITC-dUTP wird FITC direkt in Sonde eingebaut. Die einzelnen FITC-Moleküle liegen sehr nahe zusammen und lassen sich im Mikroskopischen Bild nicht in einzelne fluoreszierende Punkte auslösen. b) Bei dem indirekten Avidin/Biotin-Detektionssystem wird Biotin in die Sonden-DNA eingebaut und durch Avidin-FITC detektiert (erste Lage). Die Signale dieses Systems lassen sich durch Anti-Avidin-Antiköper und eine zweite Lage Avidin-FITC verstärken. Durch zwei und mehr Lagen Avidin-FITC und deren Antikörpern entstehende Komplexe, die sich aufgrund ihrer räumliche Ausdehnung nur in größeren Abständen voneinander bilden können. Eventuell ist der Abstand zwischen solchen Molekül-Komplexen (oder aus mehreren solcher Komplexe) groß genug, um damit die in einzelne Signalpunkte auflösbaren Signale des Avidin/Biotin-Systems zu erklären.

4.7 Hinweise zur Präparation

Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich, daß die richtige Auswahl der Suspensorzellen großen Einfluß auf die Qualität der FISH hatte. Deshalb wurden nur die größten Suspensorzellen ausgewählt, da sie die größten Riesenchromosomen enthalten. Von diesen vorsortierten Zellen ergaben dann diejenigen die besten Resultate, deren Cytoplasma bei der Präparation unter dem Stereomikroskop klar und durchsichtig erschien. Nach der Quetschpräparation wies das Cytoplasma/Karyoplasma solcher Suspensorzellen eine feingranuläre Struktur auf, in der die Riesenchromosomen noch deutlich erkennbar waren. Bei der FISH war dann von dem störenden Cytoplasma/Karyoplasma nur noch wenig, nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung meist nichts mehr zu erkennen. Dagegen wurde bei Suspensorzellen mit dunklerem, dichterem und teilweise fibrillärem Cytoplasma beobachtet, daß die Riesenchromosomen teilweise durch stark strukturiertes Cytoplasma verdeckt waren, was sich bei der FISH negativ auf die Markierungen auswirkte.

Damit kann die Forderung nach möglichst cytoplasmafreien Präparaten für die FISH (HESLOP-HARRISON et al., 1991) nur bestätigt werden. Auch für die *in situ* Hybridisierung an mitotischen Chromosomen (AMBROS et al., 1986) hat sich eine Präparationstechnik bewährt, die weniger Cytoplasmareste erzeugt als die übliche Quetschpräparation. Diese Luft-Trocknen-Präparation (GEBER und SCHWEIZER, 1989) wurde auch in der vorliegenden Arbeit für die FISH mit rDNA-Sonde an den mitotischen Chromosomen von *Phaseolus coccineus* angewendet.

5. AUSBLICK

Durch die Lokalisation der Phaseolin-Gene an Pepsin/HCl-vorbehandelten Präparaten konnte gezeigt werden, daß sich auf den Riesenchromosomen auch Gene, die in mitotischen Chromosomen nur in wenigen Kopien vorliegen, durch Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) nachweisen lassen. Da dies vermutlich auch für weitere Gene, wie z.B. die Phytohämagglutinin-Gene gilt, ist zu erwarten, daß immer mehr molekulare Marker für die verschiedenen Chromosomen zur Verfügung stehen. In Kombination mit den morphologischen Merkmalen sollte damit eine genaue Charakterisierung der Riesenchromosomen möglich sein.

FITC-dUTP eignet sich speziell für den Nachweis von mittel- und hochrepetitiven Sequenzen, wie hier am Beispiel der Gene für die größeren ribosomale RNAs gezeigt werden konnte. Es bietet damit die Möglichkeit, bei einer Mehrfach-*in situ* Hybridisierung solche Gene zu lokalisieren, die in hoher Kopienzahl vorliegen. Alternativ zum gelben FITC-dUTP stehen auch Resourfin-dUTP (rot) oder Hydroxycoumarin-dUTP (blau) zur Verfügung.

Um in einer Mehrfach-*in situ* Hybridisierung nicht nur zwei, sondern möglichst viele Chromosomen in einem Kern gleichzeitig durch FISH markieren zu können, müssen zusätzliche Markierungsmöglichkeiten und Detektionssysteme etabliert werden. So kommen für die Markierung Reporter-Moleküle wie z.B. Digoxigenin oder Dinitrophenyl (DNP) in Betracht, die an Nukleotide gekoppelt und in die Sonden-DNA eingebaut werden. Es werden auch immer noch neue Detektionssysteme für die FISH entwickelt (SPEEL et al., 1992), die gegebenenfalls Verwendung finden könnten. Auch eine chemische Modifikation der Sonden-DNA durch N-Acetoxy-2-acetylaminofluoren, Quecksilber oder Sulfonamide ist prinzipiell möglich. Die entsprechenden Antikörper müssen in diesem Fall mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sein, z.B. Texas Red, AMCA (Aminomethylcoumarin Essigsäure, blau) bzw. Cascade Blue und Phycoerythrin.

Ein Fernziel liegt darin, die Markierung einzelner Riesenchromosomen durch FISH auch bei der Charakterisierung von Metaphase-Chromosomen anzuwenden. Wenn dies gelingt, kann die Karyotypisierung durch FISH zu einer Grundlage für cytogenetische Untersuchungen am Genom der Bohne und vielleicht auch anderer Pflanzen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Abbau von Proteinen in Präparaten von Riesenchromosomen aus Suspensorzellen von *Phaseolus coccineus* cv. Hammond's Dwarf Scarlet zu einer Verbesserung der Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) führt.

Die Auswirkungen des Proteinabbaus durch die drei Proteasen Trypsin, Proteinase K und Pepsin auf die FISH wurden in einem Testsystem verglichen. Dazu diente die FISH mit einer biotinylierten rDNA-Sonde. Die Vorbehandlung mit Pepsin (1mg/ml in 0.01N HCl) erwies sich als am besten geeignet, da sie zu stärkeren Fluoreszenz-Signalen (Anzahl und Dichte der Signalpunkte) führte, ohne daß dabei die Morphologie der Riesenchromosomen zu stark beeinträchtigt wurde.

Die Phaseolin-Gene ließen sich erstmals nach Pepsin/HCl-Vorbehandlung durch FISH lokalisieren. Die Lokalisation erfolgte mit zwei verschiedenen biotinylierten Phaseolin-Gen-Sonden. Eine Sonde enthielt das β -Phaseolin-Gen aus *Phaseolus vulgaris* (3kb, Insert), die andere ein noch nicht sequenziertes Phaseolin-Gen aus *Phaseolus coccineus* (4.5kb, gesamtes Plasmid). Letztere zeigte bereits nach der ersten Amplifikation deutliche Signale.

Die Signale waren auf dem kürzeren Arm eines mittelgroßen, submetazentrischen Chromosoms zu beobachten. Da die markierten homologen Chromosomen im längeren Arm keine Heterochromatinbande und am kürzeren Arm regelmäßig terminale Heterochromatinschollen aufwiesen, wurden sie nach dem vorläufigen Karyotyp nach SCHUMANN et al. (1990) als Chromosom Nr. 7 klassifiziert. Hierbei ergab sich ein Widerspruch zu der Interpretation von SCHUMANN et al. (1990) und BAUMANN (1991), nach der die Markierungen auf Chromosom Nr. 3 zu beobachten sind.

Zusätzlich wurde im Hinblick auf spätere Mehrfach-*in situ* Hybridisierungen die direkte Detektion mit FITC-dUTP bei der FISH mit rDNA-Sonde getestet. Im Vergleich zu den Signalen des Avidin/Biotin-Systems waren die Signale von FITC-dUTP etwas schwächer und ließen sich nicht in einzelne Signalpunkte auflösen.

Bei der FISH mit rDNA-Sonde an mitotischen Chromosomen waren pro Kern fünf bis sechs Signale zu beobachten. Damit besteht kein Unterschied in der Signalanzahl zwischen mitotischen Chromosomen und Riesenchromosomen.

7. LITERATUR

- ADOLPH, K.W., CHENG, S.M., LAEMMLI, U.K. (1977). Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. Cell 12: 805-816.
- AMBROS, P.F., MATZKE, M.A., MATZKE, A.J.M. (1986). Detection of a 17kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. Chromosoma 94: 11-18.
- ANTHONY, J.L., VONDER HAAR, R.A., HALL, T.C. (1990). Nucleotide sequence of an α-phaseolin gene from *Phaseolus vulgaris*. Nucleic Acids Res. 18: 3396.
- 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.
- BAUMANN, A., (1991). Charakterisierung von Riesenchromosomen aus dem Suspensor von *Phaseolus coccineus* L. durch *In situ* Hybridisierung: Lokalisation Phaseolin-kodierender Sequenzen und ribosomaler Gene. Diplomarbeit, Abteilung Zellbiologie der Universität Kaiserslautern.
- BAUWENS, S., OOSTVELDT, P.V., ENGLER, G., MONTAGU, M.V. (1991). Distribution of the rDNA and three classes of highly repetitive DNA in the chromatin of interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. Chromosoma 101: 41-48.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.
- BOEHRINGER MANNHEIM GMBH-BIOCHEMICA (1992). Nonradioactive *in situ* hybridization application manual.
- BONNER, T.I., BRENNER, D.J., NEUFELD, B.R., BRITTEN, R.J. (1973). Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. J. Mol. Biol. 81: 123-135.
- BRADY, T. (1973). Feulgen cytophotometric determination of the DNA content of the embryo proper and suspensor cells of *Phaseolus coccineus*. Cell Diff. 2:65-75.
- BRADY, T., CLUTTER, M.E. (1972). Cytolocalization of ribosomal cistrons in plant polytene chromosomes. J. Cell Biol. 53: 827-832.
- BRITTEN, R.J., KOHNE, D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. Science 161: 529-540.
- BURKHOLDER, G.D., DUCZEK, L.L. (1980). Proteins in chromosome banding. Chromosoma 79: 29-41.
- CIONINI, P.G. (1987). The Suspensor and its role in embryo development in *Phaseolus (Papilionaceae)*: A Review. Atti. Soc. Tosc. Nat. Mem. Serie B 94: 151-161.

- COMINGS, D.E., AVELINO, E. (1974). Mechanisms of chromosome banding: II. Evidence that histones are not involved. Exp. Cell Res. 86: 202-206.
- COMINGS, D.E., AVELINO, E., OKADA, T.A., WYANDT, H.E. (1973). The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. Exp. Cell Res. 77: 469-493.
- CONGER, A.D., FAIRCHILD, L.M. (1953). A quick freeze method for making smear slides permanent. Stain Technol. 28: 281-283.
- DURANTE, M., CREMONINI, R., TAGLIOSACCHI, 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.
- EBELING, W., HENNRICH, N., KLOCKOW, M., METZ, H., ORTH, H.D., LANG, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Eur. J. Biochem. 47: 91-97.
- FREDIANI, M., FORINO, L.M.C., TAGLIASACCHI, A.M., CIONINI, P.G., DURANTE, M., AVANZI, S. (1986). Functional heterogeneity, during early embryogenesis, of *Phaseolus coccineus* ribosomal cistrons in polytene chromosomes of embryo suspensor. Protoplasma, 132: 51-57.
- 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.
- GEBER, G., SCHWEIZER, D. (1988). Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapsis alba (Cruciferae)*. using a simgle air-drying technique for producing chromosome spreads. Plant Syst. Evol. 158: 97-106.
- GERLACH, W.L, BEDBROOK, J.R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucl. Acids Res. 7: 1869-1885.
- GRIFFOR, M.C., VODKIN, L.O., SINGH, R.J., HYMOWITZ, T. (1991). Fluorescent *in situ* hybridization to soyabean metaphase chromosomes. Plant Mol. Biol. 17: 101-109.
- GUSTAFSON, J.P., BUTLER, E., MCINTYRE, C.L. (1990). Physical mapping of a lowcopy DNA sequence in rye (Secale cereale L.). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1899-1902.
- GUSTAFSON, J.P., DERA, A.R., PETROVIC, S. (1988). Expression of modified rye ribosomal RNA genes in wheat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3943-3945.
- HARPER, M.E., SAUNDERS, G.F. (1981). Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. Chromosoma. 83: 431-439.

- HARRIS, H. (1992). Molecular histochemistry and plant biology: a review. J. Microscopy. 166: 3-14
- HESLOP-HARRISON, J.S., SCHWARZACHER, T., ANAMTHAWAT-JONNSON, K., LEITCH, A.R., SHI, M., LEITCH, I.J. (1991). *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. Technique 3.
- HUANG, P.L., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. (1988). Detection of a single-copy gene on plant chromosomes by *in situ* hybridization. Mol. Gen. Genet. 211: 143-147.
- HUANG, P.L., HAHLBROCK, K., SOMSSICH, I.E. (1989). Chromosomal localization of parsley 4-courmarate: CoA ligase genes by *in situ* hybridization with a complementary DNA. Plant Cell Rep. 8: 59-62.
- INGLE, J., TIMMIS, J.N., SINCLAIR, J. (1975). The relationship between satellit deoxyribnucleic acid, ribosomal ribonuceic acid gene redundancy, and genome size in plants. Plant. Physiol. 55: 496-501.
- JEPPSEN, P.G.N., BANKIER, A.T., SANDERS, L. (1978). Non-histone proteins and the structure of metaphase chromosomes. Exp. Cell Res. 115: 293-302.
- JOHN, H.A., BIRNSTIEL, M.L., JONES, K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223: 582-857.
- JOUVE, N., MCINTYRE, C.L., GUSTAFSON, J.P. (1991). Chromosome preparations from protoplasts: *in situ* hybridization banding pattern of a dispersed DNA sequence in rye (*Secale cereale* L.). Genome 34: 524-527.
- KALLIONIEMI, A., KALLIONIENMI, O.P., WALDMAN, F.M., CHEN, L.C., YU, L.C., FUNG, Y.K.T., SMITH, H.S., PINKEL, D., GRAY, J.W. (1992). Detection of retinoblastoma gene copy number in metaphase chromosomes and interhpase nuclei by fluorescence *in situ* hybridization. Cytogenet. Cell Genet. 60: 190-193.
- KNIPPERS, R. (1985). Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 4. Auflage, p. 396.
- KÖHLER, M. (1992). Etablierung eines auf Digoxigenin aufbauenden Detektionssystems für die In-situ-Hybridisierung an Riesenchromosomen aus dem Suspensor von *Phaseolus coccineus* L., Universität Kaiserslautern.
- LEITCH, I.J., LEITCH, A.R., HESLOP-HARRISON, J.S. (1991). Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous *in situ* hybridization of two differently labelled fluorescent probes. Genome 34: 329-333.
- 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: 751-757.

- LEMIEUX, N., DUTRILLAUX, B., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. (1992). A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence *in situ* hybridization of small single-copy genes. Cytogent. Cell Genet. 59: 311-312.
- LICHTER, P., WARD, D.C. (1990). Is non-isotopic *in situ* hybridization finally coming of age? Nature 345: 93-95.
- LICHTER, P., BOYLE, A.A., CREMER, T., WARD, D.C. (1991). Analysis of genes and chromosomes by nonisotopic *in situ* hybridization. Genet. Anal. Techn. Appl. 8: 24-35.
- MALUSZYNSKA, J., HELSOP-HARRISON, J.S. (1991). Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 1: 159-166.
- MCNIEL, J.A., VILLNAVE JOHNSON, C., CARTER, K.C., SINGER, R.H. AND BENTLEY LAWRENCE, J. (1991). Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. Genet. Anal. Techn. Appl. 8: 41-58.
- MEINKOTH, J., WAHL, G. (1984). REVIEW Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138: 267-284.
- MOURAS, A., NEGRUTIU, I., HORTH, M., JACOBS, M. (1989). From repetitive DNA sequences to single copy gene mapping in plant chromosomes by *in situ* hybridization. Plant Physiol. Biochem. 27: 161-168.
- MUKAI, Y., ENDO, T.R., GILL, B.S. (1991). Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. Chromosoma 100: 71-78.
- NAGL, W. (1962). 4096-Ploidie und "Riesenchromosomen" im Suspensor von *Phaseolus coccineus*. Die Naturwissenschaften, 49: 261-262.
- NAGL, W. (1967). Die Riesenchromosomen von *Phaseolus coccineus* L.: Baueigentümlichkeiten, Strukturmodifikationen, zusätzliche Nukleolen und Vergleich mit den mitotischen Chromosomen. Öesterr. Bot. Z. 114: 171-182.
- NAGL, W. (1969a). Banded polytene chromosomes in the Legume *Phaseolus* vulgaris. Nature 221: 70-71.
- NAGL, W. (1969b). Correlation of structure and RNA synthesis in the nucleolusorganizing polytene chromosomes of *Phaseolus vulgaris*. Chromosoma, 28: 85-92.
- NAGL, W. (1970a). Temperature-dependent functional structures in the polytene chromosomes of *Phaseolus*, with special reference to nucleolus organizers. J. Cell Sci. 6: 87-107.

- NAGL, W. (1970b). Differentielle RNS-Synthese an pflanzlichen Riesenchromosomen, Ber. Dtsch. Bot. Ges., 83: 301-309.
- NAGL, W. (1974). The *Phaseolus* Suspensor and its polytene chromosomes. Z. Pflanzenphysiol. 73: 1-44.
- NAGL, W. (1980). Chromosomen: Organisation, Funktion und Evolution des Chromatins. Verlag Paul Parey, 2. Aufl. Berlin, Hamburg.
- NAGL, W. (1981). Polytene chromosomes of plants. Int. Rev. Cytol. 73: 21-53.
- NAKANE, M., IDE, T., ANZAI, K., OHARA, S., ANDOH, T. (1978). Supercoiled DNA folded by nonhistone proteins in cultured mouse carcinoma cells. J. Biochem. 84: 145-157.
- OSBORN, T.C. (1988). Genetic control of bean seed protein. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 7: 93-116.
- PAULSON, J.R., LAEMMLI, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. Cell 12: 817-828.
- PEARSON, B. (1991). Re: formamide/ membranes for hybridizations. USENET Newsgroup bionet.molbio.methds-reagnts.
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAG, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83: 2934-2938.
- RAWLINS, D.J., HIGHETT, M.I., SHAW, P.J. (1991). Localization of telomeres in plant interphase nuclei by *in situ* hybridization and 3D confocal microscopy. Chromosoma 100: 424- 431.
- RIED, T., LENGAUER, C., CREMER, T., WIEGANT, J., RAAP, A.K., PLOEG, M. van der, GROITL, P., LIPP, M. (1992). Specific metaphase and interphase detection of the breakpoint region in 8q24 of burkitt lymphoma cells by triple-color flourescence *in situ* hybridiszation. Genes Chrom. Cancer, 4:69-74.
- RIGBY, P.W., DIECKMANN, M., RHODES, C., BERG, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in Vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237-251.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press. USA.
- SCHERTHAN, H., KÖHLER, M., VOGT, P., VON MALSCH, K., SCHWEIZER, D. (1992). Chromosomal *in situ* hybridization with double-labeled DNA - signal amplification at the probe level. Cytogenet. Cell Genet. 60: 4-7.
- SCHMIDT, E.R. (1992). Mehrfarbige In-situ-Hybridisierung ein hilfreiches Verfahren bei der Genlokalisation. Mitt. Wiss. Techn. 10: 80-84.

- SCHNEIDER, J., MÜLLER, L. (1988). DNA-DNA-Hybridisierung mit biotinylierten DNA-Sonden. Forum Mikrobiol. 6: 254-262.
- SCHUMANN, K., BAUMANN, A., NAGL, W. (1990). Localization of phaseolin genes in the polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus (Leguminosae)*. Genetica. 83: 76-76
- SCHWARZACHER, T., HESLOP-HARRISON, J.S. (1991). *In situ* hybridization to plant telomers using synthetic oligomers. Genome 34: 317-323.
- SCHWEIZER, D. (1989). Praktikumsskript: In-Situ Hybridisierung von ribosomalen Genen an Chromosomen von Vicia faba. Kaiserslautern.
- 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., SCHERTHAN H., VARGA F. (1989). Praktikumskript: Nichtradioaktive In-Situ Hybridisierung: *In situ* Hybridisierung repetitiver DNA Sequenzen auf Chromosomen verschiedener Spezies. Kaiserslautern.
- SIMPSON, P.R., NEWMAN, M.A., DAVIES, D.R. (1988). Detection of legumin gene DNA sequences in pea by *in situ* hybridization. Chromosoma (Berl.) 96: 454-458.
- SLIGHTOM, J.L., SUN, S.M., HALL, T.C. (1983). Complete nucelotide sequence of a French bean storage protein gene: Phaseolin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1897-1901.
- SLIGHTOM, J.L., DRONG, R.F., KLASSY, R.C., HOFFMAN, L.M. (1985). Nucleotide sequences from phaseolin cDNA clones: the major storage proteins from *Phaseolus vulgaris* are encoded by two unique gene families. Nucleic Acids Res. 13: 6483-6498.
- SPEEL, E.J.M., SCHUTTE, B., WIEGANT, J., RAMEAKERS, F.C.S., HOPMAN, A.H.N. (1992). A Novel fluorescence detection method for *in situ* hybridization, based on the alkaline phosphatase Fast Red reaction. J. Histochem. Cytochem. 40: 1299-1308.
- SPIKER, S., KEY, J.L. (1976). Identification and fractionation of plant histones. Arch. Biochem. Biophy. 176: 510-518.
- STÖHR, M., VOGT-SCHADEN, M., KNOBLOCH, M., VOGEL, R., FUTTERMANN, G. (1978). Evaluation of eight fluorochrome combinations for simultaneous DNAprotein flow analysis. Stain Technol. 53: 205-215.
- STRYER, L. (1990). Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, p. 239.

- SUN, S.M., SLIGHTOM, J.L., HALL, T.C. (1981). Intervening sequences in a plant gene
 comparison of the partial sequence of cDNA and genomic DNA of French bean phaseolin. Nature 289: 37-41.
- TALBOT, D.R., ADANG, M.J., SLIGHTOM, J.L., HALL, T.C. (1984). Size and organization of a multigene family encoding phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. Mol. Gen. Genet. 198: 42-49.
- TRASK, B.J. (1991). Fluorescence in situ hybridization. Trend. Genet. 7: 149-154.
- VANDERBORGHT, T. (1990). The Base Collection of Wild *Phaseoleae Phaseolinae* at the National Botanical Garden of Belgium. National Botanical Garden of Belgium.
- VOB, R. (1992). Expression der Phytohämagglutinin-Gene auf Ebene der mRNA während der Samenentwicklung von *Phaseolus coccineus*. Diplomarbeit, Abteilung Zellbiologie der Universität Kaiserslautern.
- WAHL, G.M., STERN, M., STARK, G.R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3683-3687.
- WILCHEK, M., BAYER, E.A. (1989). Avidin-biotin technology ten years on: has it lived up to its expectations? Trends Biol. Sci. 14: 408-412.
- WIRNT, R., FRITSCH, W.P. (1974). Pepsin. In: H.U. Bergmeyer (Hrsg.), Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Band I, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr., 1086-1090.
- ZHANG, Z., YANG, X. (1990). Effects of protein extraction on chromosome Gbanding in plants. Cyotbios 62: 87-92.