

# **HOCHAUFLÖSENDE STRUKTURANALYSE PFLANZLICHER CHROMOSOMEN IN MITOSE UND MEIOSE**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Jutta Franziska Zoller**

aus München

2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhold. G. Herrmann
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Wanner
- Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2002

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	4
<b>1. Einleitung</b> .....	7
<b>2. Material und Methoden</b> .....	30
2.1. Material .....	30
2.1.1. Chemikalien .....	30
2.1.2. Enzyme .....	30
2.1.3. Antikörper .....	30
2.1.4. Synthetische Oligonukleotide .....	30
2.1.5. Bakterienstämme .....	31
2.1.6. DNA-Sonden .....	31
2.1.7. Pflanzenmaterial .....	32
2.1.8. Allgemeine Puffer und Lösungen .....	33
2.2. Allgemeine molekulargenetische Methoden .....	33
2.2.1. Anzucht von Stammkulturen .....	33
2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien <i>E.coli</i> (BIRNBOIM und DOLBY, 1979) .....	33
2.2.3. Isolierung pflanzlicher gesamtgenomischer DNA nach FULTON <i>et al.</i> (1995) .....	34
2.2.4. RNase-Verdauung .....	34
2.2.5. Phenolisierung .....	35
2.2.6. Gelelektrophorese .....	35
2.2.7. Photometrie .....	35
2.3. Präparation mitotischer Chromosomen .....	35
2.3.1. Desinfektion der Samenoberfläche .....	35
2.3.2. Vorbehandlung nicht-synchronisierter Chromosomen .....	36
2.3.3. Anreicherung und Synchronisation .....	36
2.3.4. Chromosomenpräparationstechniken .....	37
2.3.5. Reinigung der Objektträger .....	37
2.3.6. Quetschpräparation (zytogenetische Standardtechnik) .....	37
2.3.7. Chromosomentropfpräparation nach enzymatischer Vorbehandlung .....	38
2.4. Präparation meiotischer Chromosomen .....	38
2.4.1. Chromosomentropfpräparation nach enzymatischer Vorbehandlung .....	39
2.4.2. Präparation mit Isolierungspuffer (IDe) (modifiziert nach BURKHOLDER und MUKHERJEE, 1970) .....	39
2.5. Klassische zytogenetische Methoden .....	40
2.5.1. C-Banden Färbung .....	40
2.6. Molekulare zytogenetische Methoden .....	41
2.6.1. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	41
2.6.1.1. Amplifikation von DNA über die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	41
2.6.1.2. Markierung von DNA-Sonden über PCR .....	42
2.6.1.3. Markierung von DNA-Sonden mittels „nick“-Translation .....	42
2.6.1.4. Aufreinigung der DNA-Sonden im „spin column“-Verfahren .....	43

2.6.1.5. Semiquantitativer Einbautest mittels NBT/BCIP . . . . .	43
2.6.1.6. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate . . . . .	44
2.6.1.7. Vorbereitung der DNA-Sonde . . . . .	45
2.6.1.8. Hybridisierung . . . . .	45
2.6.1.9. Stringenzbedingung . . . . .	46
2.6.1.10. Signalnachweis . . . . .	46
2.6.1.11. Kontrastierung . . . . .	47
2.6.2. Chromosomen- <i>in situ</i> -Suppressionshybridisierung (CISS) . . . . .	47
2.6.2.1. C <sub>0</sub> t1-DNA Fraktion . . . . .	48
2.6.3. Signalauswertung und Bilddokumentation . . . . .	49
2.6.4. Karyotypanalyse . . . . .	49
2.7. Ultrastrukturanalysen im Rasterelektronenmikroskop (REM) . . . . .	50
2.7.1. Tropf-Kryo-Technik (SABATINI <i>et al.</i> , 1962) . . . . .	51
2.7.2. Tanaka-Bruchverfahren (TANAKA, 1980) . . . . .	52
2.7.3. Proteinase-Behandlung meiotischer Chromosomen im REM . . . . .	52
2.7.4. DNA-Färbung mit Platinblau (WANNER UND FORMANEK, 1995) . . . . .	52
2.7.4.1. Herstellung von Platinblau (HOFMANN UND BUGGE, 1908) . . . . .	53
2.7.5. Trocknung der Präparate . . . . .	54
2.7.5.1. Kritischpunkt-Trocknungsverfahren . . . . .	54
2.7.5.2. HMDS-Trocknungsverfahren . . . . .	54
2.7.6. Markieren von Präparatstellen . . . . .	54
2.7.7. Montage auf Probenteller . . . . .	54
2.7.8. Platinbespatterung . . . . .	55
2.7.9. Kohlebedampfung . . . . .	55
2.7.10. Bilddarstellung . . . . .	55
2.7.11. Bilddokumentation . . . . .	56
2.8. Elektronenmikroskopischer Nachweis von <i>in situ</i> -Hybrisierungen (EMISH) . . . . .	56
2.8.1. EMISH mit 6-facher Antikörperkaskade (MARTIN <i>et al.</i> , 1985) . . . . .	57
2.8.2. Kurzprotokoll mit Avidin Monolayer . . . . .	58
2.8.3. Abschätzung der Markierungsdichte des Avidin-Gold-Detektionssystem . . . . .	59
2.9. Geräte . . . . .	60
<b>3. Ergebnisse . . . . .</b>	<b>61</b>
3.1. Karyotypanalysen pflanzlicher Chromosomen mit Hilfe der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) . . . . .	61
3.1.1. Verteilungsmuster repetitiver Sequenzen aus BAC's der Gerste . . . . .	61
3.1.2. Translokationsnachweis in hexaploiden Triticalen . . . . .	61
3.2. Vergleichende Genomische- <i>in situ</i> -Hybridisierung (cGISH. <i>Ara</i> ) mit <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> in mono- und dicotylen Pflanzen . . . . .	64
3.2.1. Hybridisierungskinetik und Wettbewerbsexperimente mit C <sub>0</sub> t1-DNA und rDNA-Sequenzen . . . . .	64
3.2.2. cGISH. <i>Ara</i> in Roggen und Gerste . . . . .	67
3.2.3. Vergleichende Analyse von cGISH. <i>Ara</i> mit C-Banden . . . . .	72
3.2.4. FISH-Analyse mit der repetitiven Sequenz pAR 21 aus <i>Arabidopsis</i> . . . . .	72
3.3. <i>In situ</i> -Nachweis der Einzelkopiesequenz cTpA . . . . .	72

3.4. Mitose-Zyklus des Roggens im Licht- (LM) und Rasterelektronenmikroskop (REM)	74
3.4.1. Mitose-Zyklus des Roggens im LM	74
3.4.2. Mitose-Zyklus des Roggens bei geringer Vergrößerung im REM	77
3.4.3. Hochauflösende Ultrastrukturanalyse mitotischer Chromosomen des Roggens (REM)	81
3.5. Hochauflösende Stukturanalyse mitotischer Chromosomen der Gerste im REM	85
3.6. Meiose-Zyklus des Roggens im Licht- (LM) und Rasterelektronenmikroskop (REM)	87
3.6.1. Tanaka-Bruchverfahren	87
3.6.2. Meiose-Zyklus des Roggens im Lichtmikroskop	89
3.6.3. Meiose-Zyklus des Roggens bei geringer Vergrößerung im REM	93
3.6.4. Chromosomenmessungen	97
3.6.5. Hochauflösende Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen des Roggens im REM	98
3.6.6. DNA-Nachweis meiotischer Chromosomen des Roggens mit Platinblau im REM	108
3.6.7. Proteinase K-Behandlung meiotischer Chromosomen des Roggens (REM)	120
3.6.8. FISH-Analyse des Centromerbereiches in Mitose und Meiose (LM)	131
3.7. Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen der Lilie im REM	134
3.7.1. Chromosomentropfpräparation nach „3:1“-Fixierung	134
3.7.2. Chromosomenquetschpräparation nach Glutaraldehydfixierung	136
3.7.3. Ultrastrukturanalyse (REM) meiotischer Chromosomen der Lilie mit neu-etablierter Präparationsmethode in Isolierungspuffer (IDe)	142
3.8. Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen der Zuckerrübe im LM und REM	151
3.8.1. Lichtmikroskopische Darstellung	151
3.8.2. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung	153
3.9. Immunogold- <i>in situ</i> -Hybridisierung (EMISH) biotinylierter DNA-Sonden im REM	156
3.9.1. Markierungseffizienz markierter DNA-Sonden	156
3.9.2. Chromosomenfixierung und Hybridisierungseffizienz	158
3.9.3. EMISH von cGISH. <i>Ara</i> im Antikörperkaskaden-System	158
3.9.4. EMISH mit pAWrc im Roggen im Avidin-(Gold)-„monolayer“-System	162
<b>4. Diskussion</b>	164
<b>5. Zusammenfassung</b>	210
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	212
<b>7. Publikationen</b>	246
<b>8. Danksagung</b>	247
<b>9. Lebenslauf</b>	248

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A.bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>A.demin.</i>	demineralisiertes Wasser
Ak	Antikörper
APM	O-methyl-O-(2-nitro-p-tolyl)-N-isopropyl-phosphoramido-thioat, Amiprophosmethyl
Av	Avidin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-phosphat
Bio	Biotin
Bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
BSE	„back scattered electrons“ (Rückstreuelektronen)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CISS	„competitive- <i>in situ</i> -suppression hybridization“
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
Cu	Cuticula
Cy <sup>TM</sup> <sub>3</sub>	Carboxylmethylindocyanin (Indocarbocyanin)
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
<i>de novo</i>	lateinisch: von Neuem
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreit
dATP	2'- Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'- Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'- Desoxyguanin-5'-triphosphat
dTTP	2'- Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'- Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat als Na-Salz
EMISH	Elektronenmikroskopische- <i>in situ</i> -Hybridisierung
EPZ	Epidermiszelle
EtOH	Ethanol
Fab	„fragment of antibody binding“ (Antikörperfragment)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	„fractional length“ (relativer Abstand zum Zentromer)
GA	Glutaraldehyd
GISH	„genomic- <i>in situ</i> -hybridization“ (genomische <i>in situ</i> -Hybridisierung)
griech.	griechisch
HAc	Essigsäure
HU	Hydroxyharnstoff
IgG	Immunoglobulin G
L.	nach Linne
kb	Kilobase
M	Mol

MG	Molekulargewicht
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
µm	Mikrometer
n	einfacher (haploider) Chromosomensatz
n.A.	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazolium
Nk	Nukleolus
NOR	Nukleolus organisierende Region
OD	optische Dichte gemessen in nm
p	kurzer Chromosomenarm
p.a.	<i>per analysis</i>
PBS	„phosphate-buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PE	Primärelektronen
PMZ	Pollenmutterzelle
q	langer Chromosomenarm
rDNA	ribosomale DNA
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfonat)
SE	Sekundärelektronen
<i>spec.</i>	Spezies
SSC	„sodium salt saline“
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitanmonolaureat
TZ	Tapetumzelle
u.a.	unter anderem
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
z.B.	zum Beispiel

**Maßeinheiten:**

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cM	centiMorgan
E	Enzymeinheiten
fg	Femtogramm (10 <sup>-3</sup> g)
g	Betrag der Gravitationsbeschleunigung
g/l	Gramm pro Liter
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Mol
MeV	Millielektronenvolt (10 <sup>-3</sup> V)
mg	Milligramm (10 <sup>-3</sup> g)
min	Minute

---

ml	Milliliter ( $10^{-3}$ l)
M	Molekulargewicht
mM	Millimol
mol	molar
mmol	Millimolar ( $10^{-3}$ g)
mV	Millivolt ( $10^{-3}$ g)
$\mu$ g	Mikrogramm ( $10^{-3}$ g)
$\mu$ l	Mikroliter ( $10^{-3}$ g)
ng	Nanogramm ( $10^{-3}$ g)
nm	Nanometer ( $10^{-3}$ g)
pg	Pickogramm ( $10^{-3}$ g)
sek	Sekunde
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
U	(„unit“) Einheit
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
W	Watt
W/V	Gewicht pro Volumen



# I. Einleitung

## 1. Historie und Definitionen

### *Chromosomen/Chromatin*

Ende des 19. Jahrhunderts begann ein neuer Wissenschaftsbereich der Cytologie, der sich mit der lichtmikroskopischen Beschreibung des Erbmaterials auseinandersetzte. Schon sehr früh wurde VON HAECKEL 1866 die Hypothese aufgestellt, daß der Zellkern der wichtigste Träger der Erbeigenschaften ist, was wenig später (1875) durch den Botaniker STRASBURGER sowie die Zoologen HERTWIG, KÖLLIKER und WEISMAN (1884/85) bewiesen wurde. Zum ersten Mal wurden Chromosomen, die Träger des Erbmaterials, abgebildet (SCHNEIDER, 1873) und beschrieben (STRASBURGER, 1875). FLEMMING (1879) charakterisierte die Eigenschaft des Erbmaterials als stark anfärbbare Substanz und definierte den Begriff „Chromatin“. Der Begriff „Chromosom“ wurde von WALDEYER (1888) für den kondensierten, stäbchenförmigen Zustand des Chromatin aufgrund der Anfärbbarkeit seiner basischen Komponenten geprägt. Erste Beobachtungen zeigten damals schon, daß Chromatin nicht einheitlich, sondern in zwei verschiedenen Zuständen vorkommt, wobei eine Komponente stärker sauer, die andere mehr basischer Natur ist (HEIDENHEIN, 1894). Beide können durch spezielle Färbung selektiv unterschieden werden. Sichtbare, chromatische Klümpchen im Chromosomenfaden, die reihenweise aneinander geordnet sind, erhielten von FOL (1888) die Bezeichnung Chromomeren. Bei lichtmikroskopischen Beobachtungen wurden die dunkel kontrastierten Knötchen in den Kernen als Chromozentren bezeichnet (BACCARINI, 1908). Wenige Jahre später erhielten diese von HEITZ (1929) die allgemeine Bezeichnung Heterochromatin und wurden dem Euchromatin als „übriges Gerüstwerk“ gegenübergestellt.

### *Mitose*

Mit den ersten Beobachtungen wurde ein noch intensiveres Studium des Kernes, der Kernstrukturen und deren Rolle bei der Vererbung eingeleitet. Die erste Definition der vegetativen Zellteilung geht dabei auf FLEMMING (1879) und HEUSER (1884) zurück. FLEMMING beschrieb die Aufteilung und Längsspaltung der Chromosomen bei der Zellteilung von Körperzellen und prägte 1882 als Erster den Begriff „Mitose“ (griech.: *mitos* = Faden, Schlinge). Schon früh zeigte sich, daß Chromatin meist in einem dekondensierten Zustand im Zellkern vorliegt, „ruht“ (Interphase). Erst Jahrzehnte später konnte nachgewiesen werden, daß dieser Ruhezustand des Kernes nur auf eine kurze (G1 = „gap1“) Phase zutrifft. In der nachfolgenden S-Phase („Synthese“) wird die DNA synthetisiert und der DNA-Faden repliziert (NAGL, 1974), gefolgt von einer erneuten kurzen Ruhephase (G2-Phase). Die Mitose beginnt letztendlich mit der Kondensation der Chromosomenfäden in einem Stadium, das als Prophase bezeichnet wird. Im darauffolgenden Metaphasestadium, wenn die Kondensation am weitesten fortgeschritten ist,

findet eine Längsspaltung der Chromosomen in zwei Chromatiden statt. Die Trennung der beiden Chromatiden wird in der Anaphase durch Spindelfasern bewirkt, welche die individuellen Chromatiden zu den Polen der sich neu bildenden Tochterzellen ziehen. Dieser Prozess ist bei Pflanzen und Tieren vergleichbar, wenngleich sich Unterschiede in der Spindelbildung und der Art der Cytoplasmateilung zeigen. Bei tierischen Zellen werden Spindelfasern von einem extranukleären Körper (Zentrosom) gebildet, was bei Pflanzen, mit Ausnahme von niederen Pflanzen, nicht beobachtet wird. In der Telophase, wenn die Chromosomen an den Polen fokussiert sind, findet in den sich neu gebildeten Tochterzellen eine Umstrukturierung der Chromosomen zur Interphase statt.

### ***Meiose***

Während schon im Altertum bekannt war, daß Pflanzen eine geschlechtliche Vererbung besitzen, wurde der Nachweis erst im 17. Jahrhundert durch CAMERARIUS (1691) erbracht. Er zeigte, daß Staubblätter als männliche Geschlechtsorgane eine Entwicklung der Eizellen zur Frucht auslösen. Der Gedanke an eine geschlechtliche Vererbung (= Sexualität) im Pflanzenreich war jedoch in den darauffolgenden Jahren erneut heftig umstritten. Den Anstoß zum ausführlichen Studium der weitaus komplexeren, geschlechtlichen Zellteilung, als Meiose (griech.: *meiosis* = das Verkleinern, Verringern) bezeichnet, gab VAN BENEDEN (1883), der im Gegensatz zur Mitose, eine Reduzierung der Chromosomenzahl in der Meiose beobachten konnte. STRASBURGER (1888) konnte nachweisen, daß in der Meiose die diploide Chromosomenzahl ( $2n$  = jeder Chromosomentyp ist zweimal vorhanden) von Samenpflanzen (Angiospermen) bei der Entwicklung zu reifen weiblichen (Oozyten) und männlichen Geschlechtszellen (Spermatozyten) auf die Hälfte ( $n$  = haploider Chromosomensatz) reduziert wird. Diese periodische Reduktion der Chromosomenzahl, die bei allen auf geschlechtlichem Wege sich fortpflanzenden Organismen vorkommt, verhindert bei der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle (Syngamie) eine Vermehrung des genetischen Materials (HERTWIG, 1890; STRASBURGER, 1894).

Die Chromosomenreduktion ist eine wichtige Voraussetzung für die Bewahrung der genetischen Kontinuität. Fälschlicherweise wurde damals die Reduktion, bei der die elterlichen Chromosomen auf die Tochterzellen aufgeteilt werden, auf eine Querteilung der Chromosomen bzw. auf eine Eliminierung ganzer Chromosomen zurückgeführt (WEISMANN, 1887, 1891). Hinweise, daß die Meiose aus zwei aufeinander folgenden Zellteilungen besteht, waren zu dieser Zeit nur ein rein theoretisches Postulat von WEISMAN (1885). Die zweite Teilung wurde als eine Längsspaltung des Chromosomenfadens charakterisiert, wie bei der mitotischen Zellteilung, wodurch die Erbmasse halbiert und gleichmäßig auf die Tochterkerne verteilt wird. Dieser Teilungsmodus, der sich als richtig erwiesen hatte, wurde Äquationsteilung genannt.

Heute ist bekannt, daß die Meiose aus zwei aufeinanderfolgenden Zellteilungen besteht, wobei nur eine einzige S-Phase vorgeschaltet ist. In der ersten Teilung werden die elterlichen, homologen Chromosomen nach der Rekombination zufällig aufgeteilt, und in der zweiten Teilung, der Äquationsteilung, die Schwesternchromatiden wie in der Mitose getrennt. Phylogenetisch leitet sich der Meiose-Zyklus vom Mitose-Zyklus ab, wenngleich mehrere auffällige Veränderungen im Verlauf der Kondensation zu beobachten sind. Neben der Reduzierung des Chromosomensatzes auf die Hälfte, besteht die zweite wichtige Aufgabe der Meiose in der Neukombination genetischer Faktoren. Der Meiose-Zyklus wird in zwei aufeinanderfolgenden Zellteilungen durchgeführt, wobei die erste Zellteilung in mehrere Stadien unterteilt wird. Die Termini der einzelnen Stadien gehen dabei auf Vorschläge von WINIWARTER (1900) und HAECKER (1897) zurück. Die erste meiotische Zellteilung (Meiose I), die durch ein verlängertes Prophasestadium (Prophase I) gekennzeichnet ist, wird in 5 verschiedene Unterstadien gegliedert - jedes mit einer charakteristischen Chromosomen-konfiguration. Im Verlauf der ersten meiotischen Teilung vergrößern sich der Kern und die Zelle beträchtlich. Das Chromatin wird mit Beginn der Prophase I in lange dünne Chromosomenfäden restrukturiert und als Leptotänstadium bezeichnet. In diesem Stadium findet die erste Erkennung und Annäherung der homologen Chromosomen statt. Dabei liegen die Chromosomen häufig mit den Telomeren in einer polaren Orientierung, die als Leptotän-Bukett (*Bouquet*-Konformation) bezeichnet wird. Die auffälligste Chromosomen-konfiguration ist jedoch die parallele Aneinanderlagerung zweier homologer Chromosomen (Konjugation). Im Zygotän beginnt die Parasynapsis, das Aneinanderlegen der Homologen. Lichtmikroskopisch können neben gepaarten, homologen Fäden noch einzelne dünne, ungepaarte Chromosomen beobachtet werden. Im Pachytänstadium ist die Homologenpaarung der elterlichen Chromosomen vollendet, so daß nur noch ein einfacher Chromosomensatz erkennbar ist. Innerhalb der Paarungsbereiche der homologen Chromosomen findet die Rekombination in einer speziellen, lichtmikroskopisch nicht nachweisbaren Paarungsstruktur, dem synaptonemalen Komplex (SC), statt. Im Diplotän beginnen die Homologen sich zu trennen. In der Diakinese können unregelmäßige, fädige Fortsätze an der Chromosomenperipherie erkannt werden, die auch als Lampenbürsten-Chromosomen bezeichnet werden (SHARP und JARETZKY, 1931). Mit fortschreitender Kondensation wird die Verbindung zwischen den gepaarten homologen Chromosomen, die von MOORE (1905) als Synapsis (*syn. Syndesis*) bezeichnet wurde, aufgelöst. Verbindungen zwischen den gepaarten Chromosomen (Chiasmata) werden als sichtbare Ereignisse von „crossing-over“-Strukturen interpretiert. Mit dem Fortschreiten der Kondensation werden diese Konjugationen durch eine endständige Verbindung („end-to-end conjugation“) der beiden „bivalent-gepaarten“ Chromosomen ersetzt. Die Bivalente bilden dadurch eine charakteristische O-förmige Paarungsstruktur. Nach der Segregation der elterlichen Chromosomen in der Anaphase I und Telophase I bleiben die neu gebildeten Tochterzellen meist in engem Kontakt zueinander (Dyadenstadium). Die zweite meiotische Teilung (Meiose II) beginnt mit einer mehr oder weniger kurzen Dekondensationsphase der Chromosomen. Dieses Stadium wird als Interkinese bezeichnet und unterscheidet sich von mitotischen Interphasestadien durch das

Fehlen einer S-Phase. Der Meiose II-Zyklus wird äquivalent zur Mitose betrachtet, da hier nach einem kurzen Pro- und Metaphase II-Stadium in der nachfolgenden Anaphase II eine Aufteilung der Chromatiden erfolgt. Der Meiose II-Zyklus endet mit der Bildung einer Tetrade, die aus 4 haploiden Zellen und der anschließenden Freisetzung von Ei- bzw. vier individuellen Pollenzellen besteht.

### ***Rekombination***

Die schon von RÜCKERT 1892 ausgesprochene Vermutung, daß die synaptischen Partnerchromosomen die Deszendenten der im Befruchtungsprozess vereinten, elterlichen (= homologen) Chromosomen sind und damit ein Stoffaustausch (Amphimixis) der Chromosomen verbunden sein könnte, wurde erst Jahre später bestätigt. Dieser Vorgang, der heute als Rekombination bezeichnet wird, wurde durch MONTGOMERY (1901) und SUTTON (1902) in der Hypothese ausgebaut, daß die Paarung (Konjugation) nur zwischen homologen Chromosomen stattfindet. In normalen allogamen (fremdbestäubenden) Organismen werden die synaptischen Partner von beiden Eltern geliefert, in autogamen (selbstbestäubenden) von einem Elter. Dabei konnten Beobachtungen an polyploiden Organismen zeigen, daß unterschiedliche Herkunft und Abstammung keine Vorbedingung für die Konjugation sind, sondern allein der Homologiegrad innerhalb der Chromosomen entscheidend ist. Die Paarung überzähliger Chromosomen in Bastarden kann dabei auf Homologien innerhalb einiger Segmente dieser Chromosomen zurückgeführt werden.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche molekular- und cytogenetische Untersuchungen unternommen, um den Prozess der meiotischen Rekombination im Meiose I-Zyklus aufzuklären. Dennoch ist bis heute wenig über die strukturelle Organisation meiotischer Chromosomen im Verlauf der Erkennung, Annäherung, Aneinanderlagerung, der Ausbildung spezifischer Paarungsstrukturen, wie die des synaptonemalen Komplexes (SC) und Rekombinationsnodulen (RN) oder bivalent-gepaarten Chromosomen (SYBENGA, 1999) bekannt. Mehrere an der Rekombination beteiligten Enzyme sind bislang in der Hefe identifiziert und charakterisiert worden (HAWLEY und ARBEL, 1993). Untersuchungen der Chromosomenpaarung und Kondensation verschiedener Organismen zeigten bislang widersprüchliche Ergebnisse. Daher ist anzunehmen, daß die Prozesse der Identifizierung und Aneinanderlagerung homologer Chromosomen variabler sind, als bisher vermutet. Mutantanalysen in Hefe konnten zeigen, daß die Homologenerkennung (KLECKNER *et al.*, 1991) schon zu einer Zeit eingeleitet wird, in der sich das Chromatin noch in einem „diffusen“ Zustand im Kern befindet (PADMORE *et al.*, 1991). Lichtmikroskopie und *in situ*-Hybridisierungen in Hefe unterstützen dabei die Hypothese, daß die Aneinanderlagerung und Paarung der homologen Chromosomen durch die Chromatinkondensation und Kompaktion gefördert werden kann. In einigen höheren Pflanzen wurde dagegen gezeigt, daß selbst im Leptotän die Paarung noch nicht stattgefunden hat (MOENS, 1969; GILLIES, 1975; HOLM, 1977; JENKINS, 1983).

Über die Kräfte, welche die Affinität und Anziehung (Attraktion) der Chromosomen hervorrufen, ist bis heute wenig bekannt (MAQUIRE, 1984; SYBENGA, 1999; WALKER und HAWLEY, 2000). Sie scheinen jedoch vom Gehalt an gleichen Genen abhängig zu sein (YAMAMOTO und HIRAOKA, 2001). DAPI-Kontrastierungen von meiotischen Prophase-Chromosomen des Mais zeigten, daß sich im Präzygotän eine Initiation der Paarung und damit verbunden eine größere strukturelle Umorganisation des Chromatins ereignet. Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, daß eine aktive Bewegung der Chromosomen sowie eine spezialisierte Chromatin- und Kernarchitektur wichtige Elemente während der frühen Paarungsphase darstellen (DAWE *et al.*, 1994; ZICKLER und KLECKNER, 1998). Wie Untersuchungen an Deletionslinien zeigen konnten, nehmen die Telomere bei der Initiation der Synapsis eine wichtige Rolle ein. So wird bei großen, aber auch kleinen, terminalen Deletionen das „crossover“ unterdrückt (LUKASZEWSKI, 1997). In Mais wurde die strukturelle Organisation der Telomere im zeitlichen Verlauf der Meiose beobachtet. Ausgehend von einer diffusen Struktur im prämeiotischen Stadium werden die Telomere im Leptotän zu einer lockeren Assoziation restrukturiert. Im Zygotän beginnt *de novo* eine Annäherung der Telomere. Im Pachytän wird diese wieder aufgelöst und die Telomerbereiche werden erneut zufällig verteilt (BASS *et al.*, 1997). Diese Daten zeigen, daß terminale Bereiche der Chromosomen eine aktive Rolle bei der Initiierung der Synapsis während der meiotischen Prophase einnehmen.

Bei der Chromosomenkonjugation kommt der Synapsis eine wichtige biologische Bedeutung zu. Zahlreiche Proteinkomplexe, die bei Pflanzen und Vertebraten hoch konserviert und bei der Ausbildung des synaptonemalen Komplexes involviert sind, wie Topoisomerase II (MOENS und EARNSHAW, 1989), Zip-Proteine (SYM *et al.*, 1993; CHUA und ROEDER, 1998) und andere Proteine (ALLEN *et al.*, 1996; DOPSON *et al.*, 1994; MEUWISSEN *et al.*, 1992; THOMPSON und ROEDER, 1989; HOLLINGSWORTH *et al.*, 1990), konnten in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert werden. Dennoch bleiben strukturelle Fragen beim Konjugationsprozess der homologen Chromosomen bis heute unbeantwortet. So ist nicht bekannt, ob die Homologen bei der Paarung vollkommen oder nur teilweise miteinander verschmelzen, oder ob sie eine lockere, zeitweilige Paarung eingehen. Findet eine wechselseitige Beeinflussung statt, die sich in einer veränderten Chromatinorganisation ausdrückt? Können bei der Erkennung und Ausbildung des SC größere chromosomale Umbauten beobachtet werden? Wie sind der SC und die „crossing-over“-Strukturen aufgebaut?

Die genetische Bedeutung dieses Prozesses für die Neukombination genetischer Faktoren wurde durch DE VRIES, CORRENS und TSCHERMAK (1929) mit der Wiederentdeckung der schon 1865 formulierten Mendelschen Vererbungsphänomene zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannt. Damit wurde eine neue Ära der Cytologie eingeleitet. Dabei wurden Fragen der Vererbung nach der Ausprägung von morphologischen Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten von Eltern und Nachkommen und deren regelmäßiges Auftreten in den nachfolgenden Generationen untersucht. Beobachtungen zeigten, daß die „mendelnden“ Eigenschaften, die den genetische Faktoren (=

Genen) einer Spezies gleichzusetzen sind, teilweise gemeinsam (= gekoppelt) vererbt werden. Diese Kopplungsgruppen entsprechen dabei genau der Anzahl der beobachteten Chromosomenpaare. Die Beobachtungen stützen sich dabei auch auf die Annahme, daß Gene auf dem Chromosomenstrang linear angeordnet sind (MULLER und PAINTER, 1929). Regelmäßig beobachtete Unterbrechungen innerhalb der Kopplungsgruppen bei den Nachkommen wurden von JANSSEN (1909) durch die Chiasmatischelehre erklärt. Dieser postulierte, daß Chromosomen in der Meiose „brechen“ und die beiden homologen Chromosomenarme nach einem reziproken Austausch anschließend wieder „verschmelzen“. Dieser Vorgang wird heute als reziproke Rekombination bezeichnet. Strukturen, die bei diesem Prozess entstehen, werden als „crossing-over“ bezeichnet. Später, wenn die rekombinierten, homologen Chromosomen noch miteinander verbunden sind, spricht man von Chiasmata. Die reziproken Rekombinationsereignisse führen zur Entstehung neuer Kopplungsgruppen und damit zur Ausbildung neuer genetischer Populationen unter den Nachkommen. Dies bedingt eine Erhöhung der genetischen Diversität der Nachkommenschaft und stellt eine wichtige Voraussetzung dar, auf dessen Basis die genetische Evolution arbeitet. Durch STRASBURGER, CORRENS, GUYER und GANNON (1902) sowie SUTTON (1903) wurde klar gezeigt, daß zwischen Spaltung der Erbfaktoren und Reduktionsteilung der Chromosomen in der Meiose eine direkte Beziehung besteht, wobei das Verhalten der Chromosomen eine cytologische Erklärung für die mendelschen Phänomene liefert. Jahre später wurde deutlich, daß neben der reziproken Rekombination, dem Austausch von Genen homologer Chromosomen, auch ein weiterer Prozess des Genaustausches möglich ist. Dieser wird als Konversion oder nicht-reziproker, einseitiger Austausch bezeichnet. Beide Prozesse wurden sowohl in *Drosophila*, als auch bei niederen Pilzen und höheren Pflanzen wie Mais (LAMB 1984; SUDUPAK *et al.*, 1993) beobachtet, so daß mit deren allgemeinem Vorkommen zu rechnen ist.

## 2. Chromosomenkarten und Genomanalyse

### **Genetische Karten**

Mit Hilfe der Kreuzungsgenetik können Gene in Kopplungsgruppen zusammengefasst und deren Lage zueinander kartiert werden. Studien zur Kopplung von Genen der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) (MORGAN, 1922) und des Mais (*Zea mays*) (LINDSTROMS, 1923) als Modellorganismen führten zu den ersten Chromosomenkarten. In diesen werden Gene individuellen Chromosomen zugeordnet und in linearer Reihenfolge zueinander kartiert. Bis heute stellt diese Methode noch eine wichtige Grundlage für die Erstellung „genetischer Chromosomenkarten“ dar. Der Abstand zweier Gene wird durch die prozentuale Wahrscheinlichkeit in centiMorgan oder centimorganischen Einheiten (cM) berechnet, mit der zwei Erbfaktoren gemeinsam vererbt werden. Dabei zeigte sich jedoch, daß die Rekombinationsrate (Austauschfrequenz von Genen) im Centromerbereich (MAHTANI und WILLARD, 1998) und in heterochromatischen Regionen (STACK, 1984) deutlich reduziert ist, während andere Regionen,

die auch als „hot-spot“-Regionen bezeichnet werden, eine deutlich erhöhte Rekombinationsfrequenz aufweisen (LICHTEN und GOLDMAN, 1995). Vor allem in genreichen Regionen sind doppelte „crossover“-Ereignisse dabei nicht ungewöhnlich (GILL, 1997). Im Weizen konnte so auf dem langen Arm von Chromosom 5B eine bis zu 11-fache höhere Rekombinationsrate im Vergleich zum übrigen Genom beobachtet werden (FARIS *et al.*, 2000). Viele der agrarwirtschaftlich wichtigen Gene, wie Resistenz- und Speicherproteine, liegen in dieser Region und lassen auf eine einzigartige Chromatinorganisation in dieser „hot-spot“-Region schließen (FARIS *et al.*, 2000).

Desweiteren konnte schon früh gezeigt werden, daß die Wahrscheinlichkeit eines Austausches einen weiteren Austausch unmittelbar benachbarter Gene deutlich reduziert. Dieses Phänomen, das als Interferenz bezeichnet wurde (STURTEVANT, 1913; WEINSTEIN, 1918), ist bis heute molekular und strukturell ungeklärt. Es wird darauf zurückgeführt, daß ein doppelter Austausch (zwei benachbarte Chiasmata) eine extrem starke, sterisch ungünstige Biegung der Chromosomen bedingen würde. Vergleiche individueller Genkarten zeigen ferner, daß die Abstände von individuellen Genen mitotischer (DEBETS *et al.*, 1993) und meiotischer, sowie genetische Karten von männlichen und weiblichen Keimzellen stark variieren können (BECKER, 1974). Die molekularen Ursachen dieser Beobachtungen sind bislang noch nicht geklärt.

### ***Molekulare Genomanalyse und physikalische Genkarten***

Seit dem ersten Nachweis von Nukleoproteiden im vergangenen Jahrhundert (MIESCHER, 1871) vergingen noch mehr als 50 Jahre bis zum direkten Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Erbträger (GRIFFITH, 1928; AVERY, 1943; HERSHEY und CHASE, 1952). Die Identifizierung der Nukleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin als Grundbausteine der Polynukleotidkette DNA (CHARGAFF, 1946) und Aufklärung der DNA-Struktur als Doppelhelix 1953 durch WATSON und CRICK (Nobelpreis 1962) begründeten einen neuen Wissenschaftszweig der Biologie: die Molekulargenetik. Ziel ist dabei die Genomanalyse, die sowohl die Kartierung von Genen, die Sequenzanalyse, die genetische Steuerung und das Verständnis um Funktions- und Konstruktionsprinzipien miteinschließt.

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen und DNA-Vermehrungstechniken (Klonierungs- und PCR-Techniken) erschlossen sich neue Möglichkeiten zur Analyse der Genomorganisation. Restriktionskarten, die eine lineare Anordnung der Restriktionsschnittstellen wiedergeben, ermöglichen eine Erfassung von Genombauten auf molekularer Ebene. Bei einer RFLP-(Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus)-Analyse können Gene individuellen Restriktionsfragmenten (genetische Marker) zugeordnet und molekulare Kopplungskarten erstellt werden (BOTSTEIN *et al.*, 1980; LEWIN, 1988). Hilfreich für die Kartierung sind dabei aneuploide Linien (zahlenmäßige Abweichungen vom vollständigen Chromosomensatz; KIANIAN *et al.*, 1997) oder Deletionslinien, wie z.B. telosome Linien, bei denen Telomer-nahe Chromosomensegmente eliminiert wurden (LIN *et al.*, 1997). Dabei konnte gezeigt werden, daß

Gene nicht gleichmäßig und zufällig verteilt vorkommen, sondern häufig, wie im Weizen, in genreichen Regionen am distalen Chromosomenende lokalisiert sind. Die Anordnung von Genen innerhalb einer Kopplungsgruppe ist zwischen vielen Getreidespezies konserviert (FEUILLET und KELLER, 1999) und für eine Identifizierung von Resistenz- und Speicherproteingenen von wirtschaftlichem Interesse (MOORE *et al.*, 1993; COLLINS *et al.*, 1998). Aufgrund dieser Chromosomenkolarität, die in großen und kleinen Grasgenomen beobachtet werden kann, besteht eine Syntanie zwischen diesen Genomen. Überlappende Deletionen in genreichen Regionen, mit ähnlichem cM/Bp Verhältnis, bieten so die Möglichkeit zur schnellen Kartierung und Isolierung von Genen auch innerhalb großer Genome (FEUILLET und KELLER, 1999).

Umfangreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der molekularen Beschreibung (Sequenzierung) ganzer, auch komplexer Genome. Hilfreich dafür sind überlappende Chromosomenkarten (Contig-Karten) mit Chromosomenbibliotheken, wie z.B. künstliche Hefe- (YAC) (BURKE *et al.*, 1987; KURATA *et al.*, 1997), künstliche bakterielle Chromosomen (BAC) (HAN *et al.*, 1999) oder cDNA-Sequenzen, die unterschiedlich große Anteile des Genoms enthalten. Mit Hilfe dieser, als Megabasen-Technik bezeichneten Strategien, können komplexe Genome kartiert und bei Überlappung der analysierten Segmente das Genoms vollständig erfasst werden. Zur Kartierung werden dazu die Fragmentvarianzen durch Restriktionsenzyme (RFLP) (HONG *et al.*, 1997) oder kurze Sequenzmotive (EST) als Marker eingesetzt (YAMAMOTO und SASAKI, 1997). Dies führt letztendlich zur Erstellung von physikalischen Genkarten, deren Abstände zwischen individuellen Genen in Basenpaaren (Bp) angegeben werden.

Derzeit stehen zahlreiche Genomsequenzen niederer Pilze wie Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und photosynthetischer Bakterien wie z.B. *Synechocystis* sp. PCC6803 zur Verfügung. Mehrere Genome höherer Eukaryonten sind heute ebenfalls komplett entschlüsselt, wie die des Fadenwurms (*Coenorhabditis elegans*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Maus, (*Mus musculus*), des Menschen (*Homo sapiens*) und der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). *Arabidopsis* nimmt aufgrund ihres sehr kleinen Genoms von „nur“ 120 Mb eine wichtige Stellung als Modellpflanze in der pflanzlichen Molekulargenetik ein. Weitere Projekte, wie die Genomanalysen wirtschaftlich bedeutsamer Getreidepflanzen, wie Reis (MCCOUCH *et al.*, 1988; HONG *et al.*, 1997), Mais (HELENTJARIS *et al.*, 1986), Gerste (GRANER *et al.*, 1991), Roggen (MELZ *et al.*, 1992) und der Hirse (Whitkus *et al.*, 1992; KLEIN *et al.*, 2000), aber auch der Kartoffel (GEBHARDT *et al.*, 1989), Zuckerrübe (PILLEN *et al.*, 1992) sind weit vorangeschritten und von besonderem Interesse für Kartierungen von Resistenz- und Speicherproteinen.

### **Topographische Chromosomenkarten**

Vergleiche von genetischen Chromosomenkarten, die auf Rekombination basieren, mit physikalischen Chromosomenkarten, die auf Sequenzanalysen beruhen, zeigen deutliche Abweichungen (cM/bp) beim Vergleich der Abstände individueller Gene. Der tatsächliche



Abstand zweier Gene innerhalb des dreidimensionalen Chromosomenmoleküls kann weder durch genetische, noch physikalische Genkarten exakt wiedergeben werden, sondern lässt sich nur durch topographische Kartierungen über molekulare cytogenetische Methoden (FISH, EMISH) beschreiben. Für Kartierungen erweisen sich frühe Prophasestadien aufgrund des geringen Kondensationsgrades der Chromosomen als besonders geeignet.

Topographische Genkarten sind wichtig für das Verständnis der dreidimensionalen Organisation von Sequenzen innerhalb des Genoms und könnten sich zudem als hilfreich erweisen, um die Diskrepanz zwischen mitotischen und meiotischen physikalischen Genkarten zu erklären. Untersuchungen, die veränderte Genaktivitäten nach einer Transposition beschreiben, zeigen ausserdem, daß die Lage von Genen im Chromosom eine wichtige Rolle spielt. So konnte eine Abnahme der Genaktivität, wenn aktiv transkribierte Gene in die Nähe bzw. in heterochromatische Segmente gebracht werden (PEV = „position effect variegation“) auf den Einfluß repetitiver, nicht-kodierender Sequenzblöcke zurückgeführt werden. Solche Effekte beruhen dabei auf Strukturveränderungen von „aktiven“ Chromatin, bzw. auf Interaktionen von genetischen Kontrollelementen (Promotoren oder „enhancer“-Elementen) mit Heterochromatin-assoziierten Proteinen wie z.B. RAP- (GILSON E. *et al.*, 1994) oder SIR-Proteinen (DERNBURG *et al.*, 1996). Genmodulation durch heterochromatische Segmente spielt auch bei der entwicklungs-genetischen Aktivierung von Genen eine wichtige Rolle. Diese wurde erstmalig anhand von Segmentmusteränderungen (Puffs) bei polytären Chromosomen von *Drosophila melanogaster* beobachtet (LAKHOTIA und MISHRA, 1980). Aber auch in *Arabidopsis thaliana* konnten räumliche und zeitliche Veränderungen des Segmentmusters heterochromatischer Knoten beobachtet werden (FRANSZ *et al.*, 2000).

### 3. Cytogenetische Methoden

#### *Klassische Cytogenetik*

Für eine Karyotypanalyse unbekannter Spezies müssen Chromosomen zuerst über strukturelle Charakteristiken identifiziert werden. Historisch wurden Chromosomen primär auf der Grundlage der Chromosomenanzahl und morphologischer Merkmale unterschieden, wie Länge, Lage von primären (Centromer) und sekundären Einschnürungen (Satelliten), sowie dem daraus resultierendem Armlängenverhältnis. Diese Methode ist jedoch nur informativ, wenn sich die individuellen Chromosomen gut unterscheiden lassen und nicht, wie z.B. beim Weizen, über etwa gleichgroße, metazentrische Chromosomen verfügen. Aber auch das Paarungsverhalten in der Meiose ermöglicht eine Unterscheidung individueller Chromosomen. Erst seit der Entwicklung verschiedener Bänderungstechniken (C-, N-, G-, R-Banden-Techniken) vor mehr als 30 Jahren, ist eine Längsdifferenzierung der Chromosomen anhand zusätzlicher Marker gegeben (TRAUT, 1991). Diese Methoden, die als klassische, cytogenetische Bänderungsverfahren bezeichnet werden, ermöglichen eine Identifizierung individueller

Chromosomen, auch wenn morphologische Einordnungen unzureichend sind. Je nach Bänderungstechnik können so fakultatives und konstitutives Heterochromatin von Euchromatin, Nukleolus-organisierende-Region (NOR) und Centromerbereiche unterschieden werden. Über die genauen molekularen Ursachen dieser Bänderungsverfahren, die häufig eine Denaturierung und Renaturierung der Chromosomen einschließen, ist bislang nichts bekannt. Während bei den meisten Vertebraten eine ausreichende Anzahl von Banden entstehen, sind bei Pflanzenchromosomen häufig nur C- und N-Bänderungstechniken möglich. Die N-Banden-Analyse ist häufig auf eine beschränkte Anzahl von Pflanzenspezies begrenzt. Im Weizen und Roggen kann über N-Banden keine ausreichende Anzahl informativer Banden erzeugt werden, die eine uneingeschränkte Identifizierung aller chromosomaler Bereiche ermöglicht. Dennoch haben diese Methoden bis heute, insbesondere in der Pflanzenzüchtung noch einen hohen Stellenwert, um größere chromosomale Umbauten zu diagnostizieren, da informative molekulare DNA-Sonden als Marker häufig noch nicht zur Verfügung stehen.

### ***Molekulare Cytogenetik***

Die größten Fortschritte in der pflanzlichen Cytogenetik wurden in den letzten 20 Jahren durch die Einführung von molekularen Chromosomenbänderungstechniken erzielt. *In situ*-Hybridisierungen (BUONGIORNO-NARDELLI und AMALDI, 1969; GALL und PARDUE, 1969; JOHN *et al.*, 1969; LANGER-SAFER *et al.*, 1982) stellen dabei eine direkte Korrelation zwischen molekular-genetischen und strukturellen Eigenschaften her. Bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) werden RNA- oder DNA-Sequenzen durch Biotin-, Digoxigenin- bzw. mit Fluorochrom-gekoppelten Nukleotiden markiert, die dann nach der Hybridisierung mit Fluorochrom-gekoppeltem Avidin oder Antikörpern (indirekte Nachweismethode) (PINKEL *et al.*, 1986) bzw. direkt im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON, 1994; BAUMANN *et al.*, 1980; PINKEL *et al.*, 1986).

Die FISH-Technik hat sich in den vergangenen Jahren als eine sehr effektive Methode erwiesen, um komplexe Genomanalysen durchzuführen und repetitive oder Einzelkopie-sequenzen nachzuweisen. Die Verwendung von gekühlten CCD-(= „charge coupled device“) Kameras mit entsprechenden Bildverarbeitungsprogrammen erzeugen hochauflösende Signalbilder (NEDERLOF *et al.*, 1989; RIED *et al.*, 1992) und ermöglichen eine Detektion auch von schwachen Signalen. Durch Kombination unterschiedlicher Markierungs- und Detektionssysteme (Vielfarben- oder „multicolor“-FISH) ist ein gleichzeitiger Nachweis von mehreren DNA-Sonden möglich. Zusätzliche Signalverstärkungen, die durch eine Antikörperkaskade in der sogenannten „sandwich“-Technik (PINKEL *et al.*, 1986) durchgeführt werden, erweisen sich bei der Detektion von kurzen Einzelkopie-sequenzen ebenfalls von Vorteil. Seit dem ersten Nachweis einer Einzelgensequenz in der Brunnenkresse (*Crepis capillaris*) (AMBROS *et al.*, 1986) wurden bis heute mehrere Gene topographisch auf pflanzlichen Chromosomen kartiert. Erfolgreich waren vor allem Kartierungen in kleineren Chromosomen, wie von Erbse, Luzerne, Ackerschmalwand und Tomate. Von großem Interesse sind Kartierungen von wirtschaftlich

relevanten Resistenz- und Speicherprotein-genen. So konnten auch in großen Chromosomen, wie Getreiden, Prolamine (w-Secalin), die für die Backeigenschaften von Bedeutung sind, auf dem Chromosom 1 R des Roggens (BUSCH *et al.*, 1995) und B-Hordein-Gene auf dem Chromosom 1 H der Gerste (LEHFER *et al.*, 1993) kartiert werden. Aber auch Genorte von repetitiven, kodierenden Sequenzen wie z.B. die 5S, 16S, 28S rDNA-Loci, die aufgrund fehlender polymorpher Marker über RFLP-Technik nicht kartiert werden konnten, wurden in der Gerste und dem Weizen über FISH zugeordnet (MUKAI *et al.*, 1990 und 1991; LEITCH und HESLOP-HARRISON, 1993). Die Nachweisgrenze von DNA-Sonden für Feinkartierungen liegt derzeit bei 1 – 2 kb bei Kartierungen auf Metaphase-Chromosomen. Hybridisierungen auf gering kondensierte Stadien wie z.B. der Interphase (JIANG *et al.*, 1996) oder meiotischen Pachytänstadien (BERGEY *et al.*, 1989; PETERSON *et al.*, 1999; JI *et al.*, 1999) erweisen sich ebenfalls von Vorteil um Einzelgensequenzen zu kartieren (SONG *et al.*, 2000). Durch die neu entwickelte „extended fibre“-Technik (EF), bei der Chromatin vom Proteingerüst („scaffold“) befreit auf Objektträger gespreitet wird, wurde eine räumliche Auflösung von zwei benachbarten Genen von 1 kb (DE JONG *et al.*, 1999) und eine maximale Detektionsgrenze von Signalen bei 0,7 kb langen Sonden erreicht (FRANSZ *et al.*, 1996). Diese Methode eignet sich insbesondere bei der physikalischen Kartierung, um Lücken innerhalb der genetischen Karten zu schließen (JACKSON *et al.*, 1998).

Genombauten innerhalb polyploider Arten, wie sie bei der natürlichen Artenbildung entstehen (BENNET *et al.*, 1992; MUKAI *et al.*, 1993), aber auch Polymorphismen, die bei Chromosomen von Additions- und Substitutionslinien häufig beobachtet werden, können mit Hilfe der genomischen *in situ*-Hybridisierung (GISH) schnell nachgewiesen werden (ALKHIMOVA *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 2000; WETZEL und RAYBURN, 2000). Diese Methode ermöglicht dabei sowohl die Analyse der Zusammensetzung der Genomstruktur als auch den Nachweis von transferiertem Chromatin (LE *et al.*, 1998; SCHWARZACHER *et al.*, 1998; LEICH *et al.*, 1990). Kompetitions-*in situ*-Hybridisierungen (CISS; „chromosome *in situ* suppression hybridization“) mit repetitiven DNA-Sequenzen verringern bei der Hybridisierung komplexer DNA-Sonden [genomische DNA, Chromosomenbibliotheken, YACs (FUCHS *et al.*, 1996), BACs (JIANG *et al.*, 1995)] einen störenden, unspezifischen Signalthintergrund. Bei Hybridisierungen mit Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken konnten in einer Multiplex-FISH-Analyse alle individuellen Chromosomen des Menschen, aber auch innerhalb nah-verwandter Spezies identifiziert werden (WIENBERG *et al.*, 1990; SCHERTHAN *et al.*, 1994; RETTENBERGER *et al.*, 1995; UHRIG *et al.*, 1999). Bislang sind verschiedene topographische Kartierungen von Megabasen-DNA aus künstlichen Bakterien- (WOO *et al.*, 1994; HANSON *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1995) und Hefechromosomen (FUCHS *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 1996; SCHMIDT *et al.*, 1997) auch in Pflanzen gelungen. Die Isolierung Chromosomen-spezifischer DNA-Bibliotheken über Mikrodisektion oder Durchflußcytometrie ist jedoch meist aufwendig und im Pflanzenbereich aufgrund der meist gleichgroßen Chromosomen schwierig. Deshalb sind Chromosomen-spezifische Bibliotheken bislang nur für *Brachycone dichromosomatica* (DONALD *et al.*, 1977)

oder für Sex-Chromosomen von *Silene latifolia* (SCUTT *et al.*, 1997) beschrieben worden. Vergleichende genomische *in situ*-Hybridisierungen (CGH), die in der klinischen Diagnostik den Nachweis von amplifizierten und unbalancierten Chromosomensätzen (DU MANOIR *et al.*, 1993) ermöglichen, wurden für Pflanzengenome bislang nicht beschrieben.

Eine detaillierte Karyotypanalyse stellt eine wichtige Voraussetzung für die physikalische Kartierung von Einzelsequenzen und den Nachweis von Chromosomenumbauten. Repetitive Sequenzmotive, die im Genom lokal gehäuft angeordnet und nach der Hybridisierung Signalbanden erzeugen, sind für Karyotypanalysen gut geeignet. Einige erzeugen aufgrund der großen Anzahl von Signalbanden einen Strichkode („chromosome bar code“), der eine Identifizierung individueller Chromosomen und Domänen ermöglicht (MÜLLER *et al.*, 1997).

Eine umfassende molekulare, cytogenetische Charakterisierung von Pflanzengenomen, die eine Untersuchung des Verteilungsmusters repetitiver Sequenzen miteinschließt, ist bis heute auf diejenigen Pflanzenspezies beschränkt, für die molekulare DNA-Sonden zur Verfügung stehen. Karyotypanalysen wurden insbesondere in den Getreidepflanzen (Graminaceae) wie z.B. Roggen (*Secale cereale*) (BUSCH *et al.*, 1995), Weizen (*Triticum aestivum*) (RAYBURN und GILL, 1985), Gerste (*Hordeum vulgare*) (PEDERSEN, *et al.* 1996) und der Saubohne (*Vicia faba*) (FUCHS *et al.*, 1998) durchgeführt. Die Saubohne gehört heute zu einem der am besten charakterisierten Pflanzengenome (FUCHS *et al.*, 1998). Im Roggen wurden bislang mindestens fünf verschiedene, repetitive Sequenzfamilien beschrieben, wobei diese meist Telomer-nah, aber auch interstitiell kartieren (BEDBROOK *et al.*, 1980; APPELS *et al.*, 1981). Dieses Telomer-nahe Heterochromatin ist C-Banden positiv. Der Übergang vom hetero- zum euchromatischen Bereich wird als Ort des meiotischen „crossing-over“ angesehen (JONES und FLAVELL, 1982) und kann als Fertilitätsbarriere eine wichtige Bedeutung für die evolutionäre Diversität und Artenbildung besitzen (YUNIS und YASMINEH, 1971).

Die Isolierung und Selektion informativer, repetitiver Sequenzmotive aus großen Genomen, wie der Lilie (10.000 Mb), dem Roggen (7.000 Mb), der Gerste (5.300 Mb) oder dem Weizen (17.000 Mb), die einen Anteil von 75 – 90% repetitiver Sequenzen (FLAVELL *et al.*, 1974) aufweisen, ist arbeitsintensiv und erweist sich häufig als „Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen“. Erschwerend für Karyotypanalysen ist ferner das ubiquitäre Vorkommen von repetitiven Sequenzen innerhalb einer gegebenen Pflanzenfamilie, sowie deren disperse Verteilung auf den Chromosomen. Während bei den Vertebraten kurze Sequenzwiederholungen, wie z.B. die „L1“-repetitive Sequenzen der Maus (LICHTER *et al.*, 1990) oder „Alu“-Sequenzen des Menschen, beschrieben wurden (MÜLLER *et al.*, 1996), die mit einem umfassenden Bandenmuster von mehr als 100 Signalen eine Identifizierung individueller menschlicher Chromosomen ermöglichen, stehen im Pflanzenreich bislang nur wenige Banden-erzeugende Karyotypisierungssonden für Feinkartierungen zur Verfügung. Kurze repetitive Sequenzmotive, wie die  $(GAA)_m(GAG)_n$ -Satelliten-DNA (DENNIS *et al.*, 1980; GERLACH und PEACOCK, 1980)

oder andere einfache Sequenzwiederholungen, SSRs („simple sequence repeats“), die im Weizen, in der Gerste und anderen *Triticeae*n enthalten sind (PEDERSEN *et al.*, 1996; PEDERSEN und LANGRIDGE, 1997; CUADRADO und JOUVE, 1995; SCHARZACHER *et al.*, 1998), konnten nach der Hybridisierung ein N-Bandenmuster erzeugen. Für C-Banden fehlt bislang ein Sequenznachweis über informative DNA-Sonden. Die Mehrzahl der Pflanzengenome kann daher bislang nur über den Nachweis konservierter Gensequenzen, wie rRNA- oder Telomer-Sequenzen (SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON, 1991) charakterisiert werden.

#### 4. Elektronenmikroskopische Methoden

Lichtmikroskopische Beobachtungen, deren maximale Auflösungsgrenze für Strukturen bei 280 - 300 nm liegt, sind ungeeignet, um die Chromatinorganisation innerhalb des Chromosoms zu untersuchen. Mit der Anwendung und Verbesserung von elektronenmikroskopischen Methoden wurden neue Impulse zur Aufklärung der Chromatinstruktur gegeben. Feldemissionskraftfeld- (AFM), Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) ermöglichen eine räumliche Auflösung von Strukturen im Nanometerbereich. Insbesondere Techniken der Transmissionselektronenmikroskopie wurden seit den frühen 50iger Jahren für Strukturanalysen eingesetzt, wobei sich die Analysen hauptsächlich auf die Chromatinorganisation in Metaphase- und Interphasestadien konzentrierten (HYDE, 1965; ALLEN *et al.*, 1986). Einblicke in die Organisation meiotischer Chromosomen wurden bis heute fast ausschließlich durch TEM-Untersuchungen von Pachytänstadien gewonnen. In Kombination mit verschiedenen Färbetechniken (MOSES, 1956, 1968; FAWCETT, 1956; ENGELS und CROES, 1968; COMINGS und OKADA, 1970; VON WETTSTEIN *et al.*, 1984; GILLIES, 1985; LOIDL und JONES, 1986; LOIDL, 1988; SHEN und WU, 1989) und immunologischen Methoden (BARLOW, 1996; SOLARI und DRESSER, 1995) wurden erste Untersuchungen von DNA- und Proteinstrukturen des synaptonemalen Komplexes möglich. Silberfärbungen von Pachytänspreitungen konnten zeigen, daß der SC aus einer 3-geteilten Struktur aus je zwei lateralen Elementen (die den Achsen der beiden homologen Chromosomen entsprechen) und einer zentralen Region besteht. Innerhalb dieser Kernregion, die leitersprossenartig die beiden tangentialen Achsen durchzieht, findet wohl der genetische Austausch („crossing-over“) statt. Trotz hoher Auflösung des TEM sind Bildrekonstruktionen aus Seriendünnschnitten für die Untersuchung der Chromatinorganisation bislang unzulänglich, um den strukturellen Aufbau mitotischer und meiotischer Chromosomen aufzuklären.

Mit Einführung der Rasterelektronenmikroskopie in den späten 60er Jahren eine neue Ära zur Analyse komplexer Chromosomenstrukturen eingeleitet (CHRISTENHUSS *et al.*, 1967; GOLOMB und BAHR, 1970; KALISCH und JACOB, 1983; WELTER und HODGE, 1985; MARTIN *et al.*, 1996; MILES, 1997). Im Vergleich zu den zweidimensionalen TEM-Signalbildern ermöglicht die topographische Darstellung im REM eine detailliertere Strukturanalyse ganzer Chromosomen

bis zu einer Auflösung von wenigen Nanometern (SUMNER, 1991; WANNER *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1995, 1996; WANNER und FORMANEK, 2000). Durch zusätzliche technische Entwicklungen wie metallische „Oberflächenlegierungen“ (DASKAL *et al.*, 1976) oder Kohlebedampfungen ist eine Darstellung von Oberflächenstrukturen ungeachtet der Elektronendichte des Präparates möglich. Mit der Einführung von Tropf-Gefrierbruch-Techniken (MARTIN *et al.*, 1996) konnte ferner die dreidimensionale Chromosomenultrastruktur erhalten bleiben, die bei einer Lufttrocknung kollabieren würde.

REM-Analysen von pflanzlichen und tierischen Chromosomen wurden bis heute fast ausschließlich an mitotischen Chromosomen (CHRISTENHUSS *et al.*, 1967; HARRISON *et al.*, 1981, 1982; ALLEN *et al.*, 1988; SANCHEZ-SWEATMAN *et al.*, 1993; RATTNER, 1987; WANNER *et al.*, 1990; SCHUBERT *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1996; IWANO *et al.*, 1997) und Interphasekernen (ALLEN, 1989) durchgeführt. Dabei konnte übereinstimmend ein Aufbau aus fädigen und verknäuelten Fibrillen von 10 nm und 30 nm Durchmesser beobachtet werden, die sich im Verlauf der Kondensation zu einem zylindrischen Metaphase-Chromosom verdichten. Es zeigte sich auch, daß die dominant vorkommende, geknäuelte Fibrillenorganisation der Metaphase-Chromosomen insbesondere in den Konstriktionsbereichen von longitudinalen Längselementen unterbrochen wird. Über den strukturellen Aufbau meiotischer Chromosomen ist dagegen bis heute so gut wie nichts bekannt. Im Vergleich zu den zahlreichen Beschreibungen mitotischer Chromosomen gibt es nur zwei Berichte über REM-Darstellungen des synaptonemalen Komplex, die im Roggen, in der Ratte und beim Menschen bei niedriger Vergrößerung durchgeführt wurden und keine Ultrastrukturdetails zeigten (SUMNER, 1986, BARLOW, 1993). Diese Defizite in der Analyse meiotischer Chromosomen lassen sich auf die aufwendigere Isolierung der einzelnen Stadien und auf störenden Oberflächenschichten zurückführen (HARRISON *et al.*, 1982; ALLEN 1989; WANNER *et al.*, 1991), die verstärkt bei meiotischen Chromosomen beobachtet werden. Aber auch die schwierige Unterscheidung einzelner Stadien, die Erfahrung bei der Interpretation benötigt, kann dazu beigetragen haben, daß meiotische Chromosomen bislang elektronenmikroskopisch nicht intensiv untersucht wurden. Letztlich kann aber auch die Beobachtung dazu beigetragen haben, daß unterschiedlich große, pflanzliche und tierische Chromosomen in der Mitose eine ähnliche Chromatinorganisation aufweisen. Aufgrund dessen könnte diese Chromatinorganisation so als universell betrachtet und den Chromosomen des Meiose-Zyklus ein gleichartiger Aufbau zugrunde gelegt werden.

Das Potential der REM-Analysen wird durch methodische Erweiterungen deutlich erhöht. Mit Hilfe von Goldkolloid konjugierten Antikörpern bzw. Avidin können fluoreszenzmikroskopische Techniken auf die Rasterelektronenmikroskopie übertragen und Signale im Rückstreudetektor unter Hochauflösung nachgewiesen werden. Damit ist die Möglichkeit für eine hochauflösende, physikalische Kartierung von Proteinen (Immunomarkierungen) und DNA-Sequenzen (EMISH) *in situ* im nm-Bereich gegeben. Nach dem ersten Nachweis von DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen (MANNING, 1975) sind nur noch einzelne hochauflösende

Kartierungen im REM durchgeführt worden. So konnten rRNA-Gene der Gerste auf proximalen Bereichen der sekundären Konstriktion der Chromosomen 5H und 6H (HERRMANN *et al.*, 1996) und Telomer-Sequenzen in Assoziation mit dem synaptonemalen Komplex nachgewiesen werden. Zusätzliche Behandlungen mit DNase- und Proteinase erleichtern die Analyse des Chromosomenaufbaus (WANNER und FORMANEK, 2000). In Kombination mit DNA-Färbetechniken, wie Kontrastierungen mit „Platinblau“, einer organischen Platinverbindung, erschließen sich neue Möglichkeiten die Chromosomenarchitektur zu untersuchen (WANNER und FORMANEK, 1995, 2000). Erste Ergebnisse daraus führten u.a. zu einem neuen Chromosomenmodell (WANNER und FORMANEK, 2000).

## 5. Chromosomenaufbau

### *Interphase*

In mitotischen Interphasekernen vieler Pflanzenspezies, u.a. auch in Weizen, Roggen und Gerste, kann eine polare Ausrichtung der Centromere und Telomere, die als *Rabl*-Konfiguration bezeichnet wird, beobachtet werden (COMINGS, 1980). BENNETT konnte in einem Modell (1982) nachweisen, daß in verschiedenen Gräsern jedes Chromosom in der Mitose an einer fixierten Position liegt. Aber auch in Hybridlinien besetzen die unterschiedlichen Genome distinkte Bereiche im Kern (LEITCH *et al.*, 1990). Optische Schnitte und konfokale Mikroskopie bieten neue Einblicke in die dreidimensionale Architektur von Chromosomen oder Interphasekernen und helfen mit, den Zellkern als Funktionsstruktur besser zu verstehen (AGARD und SEDAT, 1983; HIRAOKA *et al.*, 1991; CREMER *et al.*, 1995 und 2000). Als Ergebnis daraus wurde postuliert, daß Gene mit ähnlicher Funktion wahrscheinlich in den gleichen Kerndomänen liegen. Diese fixierte Anordnung kann sowohl den Karyotyp bestimmen, als auch als Kontrolle für die meiotische Paarung eine wichtige Bedeutung in der Evolution von Spezies haben (HESLOP-HARRISON und BENNETT, 1984).

### *Centromer/Telomer/NOR*

Centromere, der Nukleolenbildungsort (NOR, „Nukleolus organisierende Region“) und Telomere bilden funktionelle Einheiten innerhalb eines Chromosoms. Die Centromere, die maßgeblich am Transport der Chromosomen bei der Zellteilung beteiligt sind, können in fixierten Chromosomenpräparationen meist als Konstriktionsbereiche nachgewiesen werden. Wie Untersuchungen in der Hefe zeigen, sind Sequenzmotive innerhalb des Centromers stark heterogen, wobei größere Homologien nur innerhalb der Kinetochor-Region beobachtet werden (CLARKE und CARBON, 1985). Die Spindelfaseransatzstelle (Kinetochor) liegt im Centromerbereich und ist bei vielen Pflanzen als kugelförmige Masse („ball-and-cup“-Typ) beschrieben worden, die in die Chromosomenoberfläche eingesenkt ist und sich von dem „trilaminaren“-Typ der Wirbeltiere, der aus Platten besteht, deutlich unterscheidet. Einige der Centromer-bindenden Proteine sind bei Tieren und Pflanzen hoch konserviert, wie das CENP B-

Protein (BARBOSA-CISNEROS *et al.*, 1997). Bei den monokotylen Pflanzen wurden bislang zwei unterschiedliche, repetitive DNA-Elemente identifiziert, die in den Centromerbereichen von Getreidespezies wie Reis, Mais, Weizen seit über 60 Millionen Jahren konserviert sind. Diese kommen ebenfalls in den B-Chromosomen des Roggens vor und scheinen eine funktionelle Rolle zu spielen (JIANG *et al.*, 1996; ARAGÓN-ALCAIDE *et al.*, 1996; JACKSON *et al.*, 1997). Sie zeigen Homologien zu der CENP-B-Box, einem konservierten 17 bp langen DNA-Motiv aus dem menschlichen Centromer, das ein weiteres Protein an den Kinetochorkomplex bindet. Andere Sequenzen, wie die CSS1-Sequenzen, zeigen Homologien zu den heterochromatischen Knoten in Mais und können unter bestimmten Bedingungen ebenfalls als Centromere fungieren (ARAGÓN-ALCAIDE *et al.*, 1996). Eine Roggen-spezifische Sequenzwiederholung pAWrc (LANGRIDGE, persönliche Mitteilungen), die ebenfalls im Centromerbereich bindet, wurde zur Analyse der Chromosomendynamik in dieser Arbeit eingesetzt.

Die NOR-Bereiche enthalten die Tandemwiederholungen der ribosomalen Gene (18 S, 28 S und 5 S rRNA) in hoher Kopienzahl. In Metaphase-Chromosomen liegen die Hauptorte der NORs meist gut sichtbar in den sekundären Konstriktionen, wodurch ein chromosomales Endstück, als Satellit bezeichnet, separiert wird. Kleinere NORs treten oft ohne Konstriktionen auf. In den Interphasen zeigen die NORs als Ort der Ribosomenbiogenese höchste Transkriptionsaktivität, wobei sie als Nukleolen (dunkel kontrastierte, globuläre Regionen) gut sichtbar sind. Je nach Spezies kann man einen bis mehrere Nukleolen nachweisen, die maximal der Anzahl der aktiven NORs entsprechen.

Die Chromosomenenden (Telomere) sind ebenfalls aus einfachen Sequenzwiederholungen aufgebaut, wobei die in *Arabidopsis* vorkommende Telomer-Sequenz (TTTAGGG)<sub>n</sub> bei vielen Pflanzen und mit kleineren Variationen auch bei Vertebraten anzutreffen ist (FORNEY *et al.*, 1987; HASTIE und ALLSHIRE, 1989). Die Länge dieser Wiederholungseinheit kann von 1 – 20 kb variieren. Dieses Motiv ist Bindungsort für eine Polymerase, die durch Anfügen von tandemartigen Telomer-Sequenzen einer natürlichen Degradation der Chromosomenenden bei der Replikation entgegenwirkt. In wenigen Fällen können jedoch anstelle des konservierten Telomermotives andere, repetitive Sequenzmotive oder Transposons nachgewiesen werden, welche die funktionellen Aufgaben der Telomere übernehmen können. Bei *Drosophila melanogaster* sind Retrotransposons von etwa 6 – 10 kb (PARDUE *et al.*, 1996) und bei der Zwiebel kurze, repetitive Sequenzwiederholungen von etwa 375 Bp nachgewiesen worden (PICH *et al.*, 1996). Strukturell lassen sich die Telomere nur in FISH-Analysen vom umgebenden Chromatin unterscheiden. Nach Bänderungsverfahren werden in den distalen Bereichen häufig zusätzlich Blöcke von konstitutivem Heterochromatin nachgewiesen. Spezies-spezifische Sequenzwiederholungen konnten sowohl in den subtelomeren Bereichen des Roggens mit der DNA-Sonde pSc119.2 (BEDBROOK *et al.*, 1980; APPELS *et al.*, 1981), als auch in der Gerste mit MWG 2315 (BUSCH *et al.*, 1996) nachgewiesen werden, wobei jedoch beide Sequenzmotive zusätzlich interstitielle Bindungsorte aufwiesen. Untersuchungen konnten ferner zeigen, daß die



höchste Genkonzentration oft an den Chromosomenenden auftritt. Da Telomere meistens mit der Kernmembran oder nahe davon lokalisiert sind, können so Transkripte möglicherweise schneller ins Cytoplasma transportiert werden (SUMNER, 1994).

### ***Heterochromatin***

Ein charakteristisches Merkmal höherer Eukaryonten sind Anhäufungen nicht-kodierender, repetitiver Sequenzen, die bei sehr kleinen Pflanzengenomen wie *Arabidopsis thaliana* (120 Mb) etwa 30%, meist jedoch den Hauptteil des Genoms, im Roggen (*Secale cereale*) 70%, bei Lilien (*Lilium longiflorum*) 90% und bei der Schachbrettblume (*Fritillaria spec.*) bis zu 99% betragen können. Heterochromatin kann allgemein als kondensiertes Chromatin betrachtet werden. Während die Genanordnung zwischen unterschiedlichen taxonomischen Pflanzenspezies hoch konserviert ist, können repetitive Elemente sowohl konserviert, als auch Spezies-spezifisch auftreten. Repetitive Sequenzen setzen sich aus mehr oder weniger (2 – 10.000 Bp) langen, repetitiven Sequenzmotiven unterschiedlichen Ursprungs und unterschiedlicher Kopienzahl zusammen (BENNETZEN, 2000). Ein Großteil ist in Tandem-artigen Sequenzwiederholungen angeordnet. Die Vermehrung repetitiver RNA-Sequenzen kann über einen sogenannten „rolling circle“ ausserhalb des Chromosoms erfolgen, der anschließend wieder in das Genom integriert (HOURCADE *et al.*, 1973). In einem anderen Modell werden ungleiches „crossing-over“, Genamplifikation („slippage replication“) (STEPHAN, 1989), sowie ungleicher Schwesterstrangaustausch als mögliche Ursache für die Vermehrung von SSR („simple sequence repeats“), Satellitensequenzen und anderer repetitiver Elemente diskutiert. Ein Teil dieser Sequenzwiederholungen ist in Blöcken angeordnet und erzeugt nach der Hybridisierung ein distinktes Bandenmuster an Telomer-, paracentrischen oder interstitiellen Chromosomenbereichen. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Verteilungsmuster sind bislang nicht geklärt, so daß über die Entstehung und Funktion der repetitiven Elemente nur spekuliert werden kann. Als mögliche Faktoren für die unterschiedliche Lokalisation dieser Sequenzmotive kommen Mechanismen wie Homogenisierung, Dispersion oder Amplifikation in Frage. Die weitere Ausbreitung lokal amplifizierter Sequenzen im Laufe der Evolution ist unklar, wenngleich Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana* gezeigt haben, daß perizentrische Tandemsequenzen durch Inversionsereignisse an interstitielle Positionen gebracht werden können (FRANZ *et al.*, 2000). Aber auch Transpositionen von Megatransposons (ANANIEV *et al.*, 1997) oder Megareplikons (KERESO *et al.*, 1996), wie sie in der Maus beobachtet wurden, sind für eine weitere Ausbreitung denkbar.

Heterochromatin besitzt weniger aktiv transkribierte Gene (Haushaltsgene) als Euchromatin und wird im Zellzyklus spät repliziert. Dennoch konnten Karyotypuntersuchungen in *Alstroemeria spec.* zeigen, daß hochrepetitive DNA-Sequenzen auch in euchromatischen Strukturen nachweisbar sind (KAMASTRA *et al.*, 1997). Cytogenetisch wird Heterochromatin in konstitutiv und fakultativ unterteilt. Fakultatives Heterochromatin kann in Abhängigkeit vom Zelltyp und Entwicklungsstadium unterschiedlich exprimiert werden (DHILLON und MIKSCHKE, 1983) oder zur

Genkompensation von weiblichen X-Chromosomen des Menschen oder B-Chromosomen bei Pflanzen beitragen. Konstitutives Heterochromatin besteht dagegen überwiegend aus sehr kurzen (2 – 10 Bp langen) Sequenzwiederholungen, die auch als Satelliten-DNA bezeichnet wird (ROCHI, 1982). Dieses Heterochromatin, das häufig in Centromerbereichen zu finden ist, bleibt im Laufe des gesamten Zellzyklus kondensiert. Subtelomere Bereiche des Roggens bestehen überwiegend aus einer kleinen Anzahl von tandemartig organisierten DNA-Sequenzfamilien (VERSHININ *et al.*, 1996). Viele dieser Elemente sind transposable Elemente (Transposons oder Retrotransposons) oder haben sich daraus entwickelt. Retrotransposons, wie zum Beispiel Ty1-*copia*-Elemente, können dabei einen Anteil bis zu 40 – 50% des Genoms betragen (HESLOP-HARRISON, 1997). Die Sequenzmotive sind stark heterogen (PEARCE *et al.*, 1996). Als genetische Marker sind sie vor allem für die Kartierung von Genomen und die Analyse der Biodiversität von besonderem Interesse (KUNAR *et al.*, 1997). Wie FISH-Analysen mit Ty1-*copia*-Elementen im Roggen und mit BARE-1-Elementen in der Gerste zeigen konnten, variiert deren mengenmäßiges Vorkommen innerhalb nahe verwandter Spezies stark (PEARCE *et al.*, 1997). Auch das Verteilungsmuster innerhalb der Chromosomen ist sehr unterschiedlich. Während sie im Roggen und der Gerste meist über das gesamte Genom verstreut vorkommen, bleiben Telomer und Zentromerbereich anderer Genome häufig frei. In anderen Genomen wie der *Arabidopsis thaliana* sind sie dagegen in perizentrischen Bereichen (BRANDES, 1997) oder von *Allium cepa* in Telomerbereichen angehäuft (PEARCE *et al.*, 1996). In den terminalen Bereichen von *Allium cepa* konnte außer Ty1-*copia*-Retrotransposons auch Satelliten-DNA nachgewiesen werden (PICH und SCHUBERT, 1998).

Obwohl Heterochromatin bis heute als „genetischer Müll“ betrachtet wird, wurden zahlreiche Effekte auf die Zellorganisation und Funktion beschrieben. Mehrere Untersuchungen beschreiben Einflüsse von repetitiven Sequenzen auf die Zellgröße (LINTS und JONES, 1969), die Zellzyklusdauer (NAGL, 1974; BOSEN und NAGL, 1978) und die Qualität der Rekombination (THOMAS und KALTSIKES, 1974). Gerade Spezialisierungen gehen häufig mit massiven Veränderungen des DNA-Gehaltes, die meist durch Amplifikationen repetitiver Sequenzen hervorgerufen werden, einher (REES *et al.*, 1984). Insertionen in 5'-flankierenden Regionen und Intron-kodierende Gene führen zu phänotypischen Veränderungen (KIANIAN *et al.*, 1997), oder können als Ursache für Replikations- und Expressionspolymorphismen (DARLINGTON *et al.*, 1959) angesehen werden. Diese Effekte führen zu genetischen Modulationen und damit zu Veränderungen der Gewebespezifität oder von Entwicklungsvorgängen. Deren Bedeutung für die phänotypische Divergenz bei der Evolution von Pflanzen- und Tierspezies ist nicht mehr abzustreiten. Dem Wissen und Verständnis der Genomarchitektur von Einzelkopie-Sequenzen einschließlich der Organisation repetitiver, nicht-kodierender Sequenzen kommt eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Funktion des Zellkerns und Chromosomenarchitektur zu.

### ***DNA-Organisation im Chromosom***

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist das größte Molekül in der Eukaryontenzelle. Im Laufe des Zellzyklus unterliegt es während der Replikation, Transkription oder Rekombination dynamischen Konformationsänderungen. Weitgehend ungeklärt ist bis heute die Frage der Verpackung, einen DNA-Faden von wenigen mm Länge in ein nur wenige  $\mu\text{m}$  langes Chromosom, um einen Faktor von etwa 10.000 zu verkürzen. Unbestritten ist, daß die DNA im Chromosom als linearer Doppelstrang (Einstrangmodell) vorliegt, der im Verlauf der S-Phase des Zellzyklus repliziert wird, bevor beide Stränge gemeinsam zu einem stäbchenförmigen Chromosomenkörper kondensieren. Die Chromosomenkondensation erfolgt bei pflanzlichen und tierischen Chromosomen universell und läuft scheinbar unabhängig von der Genomgröße und dem Gengehalt ab. Die Trennung der beiden DNA-Stränge, die im Chromosom als Chromatiden bezeichnet werden, erfolgt erst in der späten Metaphase bzw. Anaphase und führt zu einer gleichmäßigen Verteilung auf die Tochterzellen.

Die DNA im Chromosom liegt in einem Komplex aus basischen Histon- und sauren Nicht-Histon-Proteinen vor, der als Chromatin bezeichnet wird. Die genaue Aufklärung der Struktur erfolgte von KORNBERG (1974), der anhand von Röntgenstrukturanalysen zeigen konnte, daß etwa 146 Basenpaare (Bp) der DNA-Doppelhelix von 2 nm Durchmesser in  $1 \frac{3}{4}$  Linkswindungen um einen Histonkern verpackt sind. Dieser Kern setzt sich aus einem Oktamer von je zwei Histonmolekülen H2A, H2B, H3, H4 zusammen (WANG, 1982; FELSENGELD und MCGHEE, 1986). Bei dieser DNA-Protein-Interaktion spielen Ionenbindungen zwischen den negativ-geladenen Phosphatresten der DNA und den positiv-geladenen Aminogruppen, insbesondere Arginin-Resten, eine wichtige Rolle. An dem 7 nm großen DNA-Proteinkomplex (FINCH *et al.*, 1977), der auch als Chromatosom bezeichnet wird, bindet ein weiteres Histonmolekül H1 (THOMA *et al.*, 1979). Einzelne Chromatosome, die über einen DNA-Faden („linker DNA“) variabler Länge (0 – 90 Bp) verbunden sind, werden als Nukleosomen bezeichnet (ARENTS und MOUNBDRIANAKIS, 1993). Die Aneinanderreihung der Nukleosomen kann bei TEM-Analysen als „Perlschnur-ähnliche“ Kette von etwa 10 nm Durchmesser nachgewiesen werden. Diese, auch als Elementarfibrille bezeichnete „10 nm-Fibrille“, kommt als universelle Komponente in allen Eukaryontenzellen vor (WOODCOCK, 1973; OLINS und OLINS, 1974; WOODCOCK *et al.*, 1976) und führt zu einer ersten Komprimierung des DNA-Fadens um den Faktor 7. Die Anordnung von Nukleosomen ist nicht statisch, sondern zeigt in Abhängigkeit von der Gensequenz und dem Aktivitätszustand Unterschiede in der „linker“-Länge (CZARNOTA *et al.*, 1997). Andernseits können posttranslationale Modifikationen der Histone, wie Ribosylierungen, Ubiquitinierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen, die DNA-Histon-Stabilität beeinflussen und unterschiedliche genetische Effekte auslösen (TURNER und O'NEILL, 1995; DAVIE und CHADEE, 1998). Dabei wurden Auswirkungen auf die Genaktivität, Transkription (HOUBEN, *et al.*, 1996), Replikation (JASENCAKOVA *et al.*, 2001) Rekombination (HANIN, *et al.*, 2000), aber auch auf

Entwicklungsvorgänge (OAKELEY *et al.*, 1997; VERMAKK *et al.*, 1998) und Chromatinkondensation (HANIN *et al.*, 1999) nachgewiesen.

Anhand von elektronenmikroskopischen Darstellungen wurde gezeigt, daß die Nukleosomenkette in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration verschiedene Konformationsänderungen durchlaufen kann. Die Nukleosomenkette kondensiert mit Zunahme des Ionengehalts von einer zick-zack-förmigen Struktur (<1 mM) (SIMPSON, 1978; THOMA und KOLLER, 1977) und perlschnurartigen Anordnung (1 mM) bis hin zu einer übergeordneten Fibrille von 20 – 30 nm Durchmesser. Die Organisation der Nukleosomen innerhalb dieser als „30 nm-Fibrille“ bezeichneten Struktureinheit ist bis heute nicht vollkommen geklärt. Eines der populärsten Modelle ist die spiralenförmige Anordnung der Nukleosomenkette mit 6 Nukleosomen je Windung zu einer Fibrille von 30 nm im Durchmesser, die als Solenoid bezeichnet wird (THOMA *et al.*, 1979; WALKER und SIKORSKA, 1987). Aber auch globuläre Anhäufungen von je 6 – 12 Nukleosomen, die als „Superperlen“ („superbeads“) bezeichnet werden, stehen ebenso zur Diskussion, wie eine unregelmäßige zick-zack-Konformation (HOROWITZ *et al.*, 1994; BEDNAR *et al.*, 1995). Der Kondensationsfaktor des DNA-Fadens in der 30 nm-Fibrille beträgt dabei das 40- bis 50-fache.

Die Frage der Kondensation, wie eine 30 nm-Fibrille in einem Metaphase-Chromosom angeordnet ist, bzw. wie die noch verbleibende Diskrepanz von zwei Zehnerpotenzen des Kondensationsfaktors erklärt werden kann, bleibt bis heute unbeantwortet. Verschiedene Modelle wurden erstellt, um den weiteren Kondensationsmodus der Chromatinfibrillen zu beschreiben, der phänotypische Erscheinungen wie Spiralisierungs- und Bänderungsphänomene der Chromosomen zulässt. Dabei zeichnen sich zwei große, strukturelle Richtungen ab: (a) Chromosomenmodelle (I – IV), die eine regelmäßige Schleifenbildung oder spirale Organisation der Chromatinfibrillen im Chromosom favorisieren oder (b) Chromosomenmodelle (V – VI), die von einer mehr oder weniger unregelmäßigen Fibrillenorganisation ausgehen. Den meisten Modellen wird eine Verankerung der 30 nm Fibrillen an eine längsorientierte, proteinhaltige Kernfaser, dem „scaffold“, zugrunde gelegt. Hinweise dafür erbrachten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chromosomen, die nach dem Entfernen der Histone ein nicht-Histon-Proteingerüst („scaffold“) freilegten, an dem DNA-Schleifen von 30 bis 90 kb Länge (PAULSON und LAEMMLI, 1977) verankert waren. Den Regionen, an denen das Chromatin an das „scaffold“ gebunden ist (und die auch in Centromer- und Telomer-Regionen nachweisbar sind), wird eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation, Transkription oder als Positionen für illegitime Rekombination zugeschrieben (BURKHOLDER, 1988; STRISSEL *et al.*, 1996).

Die Organisation der Chromatinschleifen und des „scaffold“ innerhalb des Chromosoms sind wesentliche Unterscheidungskriterien der aktuell diskutierten Modelle I - VI:

- (I) Beim Chromatinschlaufenmodell („radial loop“) wird das Metaphasechromosom als Ausdruck von regelmäßigen Epichromatinschleifen verstanden, die im Chromosomenkörper von einer zentralen (im Chromosom längsorientierten)

- proteinhaltigen Kernfaser, dem „scaffold“, ausgehen (COMINGS und OKADA, 1970; STUBBLEFIELD und WRAY, 1971, MARDSEN und LAEMMLI, 1979, EARNSHAW, 1991). Etwa 10 000 Chromatin-Bindestellen (SARs: „scaffold attachment regions“) an den „scaffold“ sollen dabei die Chromatinfibrillen in Schleifendomänen im Chromosom organisieren (ADOLPH *et al.*, 1977; ADOLPH *et al.*, 1986; LEWIS und LAEMMLI, 1982).
- (II) Beim „helical coiling“-Modell werden Chromatinschlaufen von 250 – 400 nm Durchmesser, vergleichbar mit dem „radial loop“-Modell über einen „scaffold“ organisiert. Dieses „scaffold“ wird nachfolgend helikal im Chromosomenkörper zu einer Spirale von 600 - 700 nm („Supersolenoid“), die einem Chromatid entsprechen soll, gewickelt (BAC *et al.*, 1979; SEDAT und MANUELIDIS, 1978; RATTNER und LIN, 1985; MANUELIDIS und CHEN, 1990). Hinweise für eine helikale Anordnung ergaben sich aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Lampenbrüsten-Chromosomen von Amphibien (WHITE, 1973), die Chromatinschlaufen als supersolenoidale Röhren interpretierten. Mit kleineren Abweichungen entspricht dieses Konzept auch dem „multiple coiling“-Spiralenmodell von TANIGUCHI und TAKAQAMA (1986).
- (III) Das „scaffold“-Modell von Laemmli (MARDSEN und LAEMMLI, 1979; SAITOH und LAEMMLI, 1995) hat sich in den letzten Jahren zu einem der populärsten Chromosomenmodell entwickelt und stellt ein Intermediat der beiden vorherigen Modelle dar. Es fand Eingang in die Lehrbücher (TRAUT, 1991; NULTSCH, 2001) und prägt unsere Vorstellung vom Chromosomenaufbau ganz wesentlich. Das „scaffold“ ist hier meist helikal im Chromosom angeordnet (MULLINGER und JOHNSON, 1980; SAITOH und LAEMMLI, 1995). Nach Auffassung von SAITOH und LAEMMLI (1995) könnte ein unterschiedlicher Spiralisierungsmodus des „scaffold“ innerhalb des Chromosoms sowie unterschiedliche Ausprägung von Chromatinschlaufen das Bänderungsverhalten in den unterschiedlichen Chromosomsegmenten erklären. Diese Idee einer unregelmäßigen heikalen Grundstruktur wurde auch von den Autoren STACK und ANDERSON (2001) in einem unregelmäßigen Wicklungsmodell aufgegriffen.
- (IV) In Anlehnung an das „radial-loop“-Modell wurde von HADLACZKY (1985) und BURKHOLDER (1988) eine weniger konkrete „scaffold“-Struktur vorgeschlagen. Beide Autoren favorisieren variable Interaktionen von SARs zwischen individuellen Chromatinfibrillen, die dann Chromomere ausbilden, welche schraubig zu einem Metaphase-Chromosom organisiert werden.

Eine deutliche Minderheit geht von einem eher ungeordneten Faltungs- bzw. Kondensationsprinzip aus. Erste interessante Denkanstöße dazu wurden schon 1883 von DE VRIES als Hypothese formuliert und durch ROUX (1883) und WEISMANN (1985) in einem Modell fortgeführt, das auch heute noch im übertragenen Sinn als Modellvorstellung für die Genomorganisation dienlich sein kann. Chromatin wird dabei zu höheren Einheiten (Determinanten) vereint, die dann wiederum zu übergeordneten größeren Einheiten, als Iden bezeichnet, gruppiert werden. Diese Iden sollen letztendlich durch eine lineare

Aneinanderreihung ein Chromatid ausbilden. Diese Vorstellung wurde einige Jahre später auch von HEITZ (1929) in seinem Modell aufgegriffen, bei dem Chromozentren, als elementare Teilchen der Chromosomen, am Wiederaufbau der Chromosomen unmittelbar beteiligt sein sollen.

- (V) Das historisch als Erste aufgrund von REM-Beobachtungen aufgestellte Strukturmodell, ist das „folded-fiber“-Modell (DUPRAW, 1966; BAHR, 1971). Dieses geht von einer direkten, unregelmäßigen Packung der Fibrillen zu einem Metaphase-Chromosom aus. Eine Weiterführung des Modells (BORLAND *et al.*, 1988) beschreibt unregelmäßige Längsfaltung der Chromatinknäuels, die so das Bänderungsphänomen der Chromosomen erklären sollen.
- (VI) Eine Fortführung dieser Modelle stellt das erst kürzlich publizierte Chromosomenmodell (WANNER und FORMANEK, 2000) dar, das anhand von REM-Analysen pflanzlicher mitotischer Chromosomen abgeleitet wurde. Das Metaphase-Chromosom wird hier als eine Aneinanderreihung kondensierter, heterochromatischer Domänen (Chromomeren) beschrieben, die über kontraktile Proteinfibrillen, den MARS („matrix attachment fibres“), variabel in einem Metaphase-Chromosom organisiert und kondensiert werden.

## Ziele

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Einblicke in den Aufbau und die strukturelle Organisation pflanzlicher Chromosomen zu geben. Dazu wurden fünf Aspekte bearbeitet: (1) Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) sollten Chromosomen polyploider Genome, wie Weizen und Weizen-Roggen-Hybriden (Triticale) mit Hilfe komplexer, repetitiver DNA Sonden (genomische DNA, BACs, repetitive DNA) untersucht und Feinkartierungen in der Gerste und dem Roggen durchgeführt werden. (2) Es sollte eine neue DNA-Sonde entwickelt werden, die eine Karyotypanalyse in solchen pflanzlichen Chromosomen ermöglicht, für die bislang noch keine entsprechenden Sonden zur Verfügung stehen. Die Sonde sollte exemplarisch an verschiedenen monokotylen (Roggen, Gerste, Weizen, Agropyron, Zwiebel, Lilie) und dikotylen Pflanzen (Zuckerrübe, Saubohne) getestet werden. (3) Mit Hilfe der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollten vertiefende Erkenntnisse über den ultrastrukturellen Aufbau und Strukturwandel meiotischer Chromosomen gewonnen werden. Dabei sollten meiotische Chromosomen des Roggens im Verlauf der Kondensation im Meiose I- und Meiose II-Zyklus sowie ihre Paarungsstrukturen dargestellt werden. (4) Die Ergebnisse vergleichbarer Kondensationsstadien mitotischer und meiotischer Chromosomen sollten auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten hin untersucht werden. Ergänzende Techniken, wie FISH, EMISH, Proteinase-Behandlung und Platinblau-Kontrastierung sollten dabei helfen, DNA-Verteilung und Organisation innerhalb der chromosomalen Strukturen nachzuweisen, um somit Fragen des Kondensations- und Paarungsverhalten sowie der generelle Chromatinorganisation meiotischer Chromosomen zu klären. (5) Vergleichende Ultrastrukturanalysen an großen (Lilie) und kleinen Chromosomen (Zuckerrübe) sollten durchgeführt werden, um Strukturdiversitäten an unterschiedlich großen Chromosomen darzustellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Chemikalien wurden im allgemeinen in *p.a.*-Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Buchler/USB, Braunschweig; Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (= Roche); British BioCell, England; Difco Laboratories, Detroit, USA; ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim; Merck KGaA, Darmstadt; Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, München; Mikrotechnik EM, GmbH, München; Neubauer Chemikalien, München; Riedel de Hæn AG, Hannover; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemica, Heidelberg und Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen.

#### 2.1.2. Enzyme

AmpliTaq Gold™ Polymerase	Perkin-Elmer Applied Biosystem GmbH
DNA Polymerase I	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
DNase	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
Proteinase K	ICN, Biomedicals GmbH
RNAseA	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
S1 Nuklease	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)

#### 2.1.3. Antikörper

Für den Nachweis Biotin- und Digoxigenin-markierter DNA-Sonden wurden folgende konjugierte Antikörper verwendet:

Streptavidin-alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
Avidin-Cy <sup>TM</sup> 3	Dianova
Biotinyliertes anti-Avidin	Dianova
Anti-Digoxigenin FITC (Maus)	Boehringer Mannheim GmbH (Roche)
Avidin-Gold (10 nm)	British BioCell
Avidin-Gold (12 nm)	British BioCell

#### 2.1.4. Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonucleotide (M13 „reverse“, M13 „forward“) für die Sequenzierung wurden von der Firma Promega GmbH (Mannheim), Sequenz-spezifische „Primer“ für die PCR von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) bzw. MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.



### **2.1.5. Bakterienstämme**

Die Plasmid-Insertionen der repetitiven DNA-Sonden pTa 71, pAWrc, MWG 2314 und pSC 119.2 sind in pBluescript<sup>®</sup>I/KS Vector der Fa. Stratagene GmbH (Heidelberg) inseriert und in den *E. coli*-Stamm CJ236 kloniert. Die Vermehrung der Inserts erfolgte entweder über Anzucht der Bakterienzellen bzw. über PCR Amplifikation mit M13 forward/M13 reverse Primern

### **2.1.6. DNA-Sonden**

#### **Weizen-spezifische DNA-Sonden**

Für Analysen in Weizen und Weizen-Roggen Hybridlinien wurden die D-Genom-spezifischen Sequenzmotive der Sonde pAs1 aus *Aegilops squarosa* verwendet. Markierungen der Nukleolus-organisierenden Regionen (NORs) wurden mit der DNA-Sonde pTa 71 (GERLACH und BEDBROOK, 1979) durchgeführt, die eine Sequenzwiederholung der 18S–5,8S–26S rRNA aus dem Weizen enthält.

#### **Gersten-amplifizierte DNA-Sequenzen**

Das 146 Basenpaaren lange DNA-Fragment MWG 2314 aus der Gerste (*Hordeum vulgare*) (BUSCH *et al.*, 1995) weist einen AT-Gehalt von 46% auf und ist in verschiedenen Gräsern in unterschiedlicher Kopienzahl vorhanden. Der BAC-Klon BAC115, sowie die repetitive DNA-Sonde MT 37-2, die eine 137 bp lange repetitive Sequenzwiederholung enthält, stammen aus der Gerste.

#### **Roggen-spezifische DNA-Sequenzmotive**

Für eine Analyse der Triticale wurde gesamtgenomische DNA des Roggens (*Secale cereale* L. cv. Sorom) verwendet. Die Chromosomendynamik der Zentromerregion in Mitose und Meiose wurde mit der Roggen-spezifischen Zentromersonde pAWrc (nicht publiziert) untersucht, die freundlicherweise von Prof. P. Langridge zur Verfügung gestellt wurde. Als weitere molekulare Markierung für das Roggengenom wurde die im Roggen amplifizierte repetitive DNA-Sonden pSc 119.2 (BEDBROOK *et al.* 1980; MCINTYRE *et al.* 1990) eingesetzt. Telomer Sequenzen des Roggens wurden über PCR mit Hilfe der Primersequenz (TTTAGGG)<sub>n</sub> des *Arabidopsis*genoms im Roggen amplifiziert.

#### **DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana***

Für die vergleichende cGISH-Experimente wurde die repetitive DNA-Sequenz pAR 21 aus *Arabidopsis thaliana* sowie genomische DNA aus Blättern und Blüten der Spezies *Arabidopsis thaliana* L. Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet.

#### **Gensequenz aus Tabak**

Für den Nachweis von Einzelgensequenzen wurde die DNA-Sequenz cTpa1 von Prof. Oelmüller (Universität Jena) zur Verfügung gestellt. .

### 2.1.7. Pflanzenmaterial

Für die Chromosomenanalysen des Roggens wurde der Sommerrogen (*Secale cereale* L.) der Sorte cv. Sorom, die Gerste (*Hordeum vulgare* L.) der Sorte cv. Maresi und Weizen (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) cv. Chinese spring als Samen verwendet. Für die Chromosomenpräparation aus dem Spelzweizen (*Agropyron elongatum*) (Host) P.B.ssp.*elongatum* wurden Wurzelmaterial von Topfpflanzen verwendet. Die Zuckerrübenpflanzen wurden aus Samen (*Beta vulgaris* L.) der Linie A940043 angezogen, der von Herrn Professor C. Jung (Universität Kiel) zur Verfügung gestellt wurde. Kulturen der marinen Rotalge (*Rhodella violacea*) einschließlich des Anzuchtmediums wurde freundlicherweise von Herrn Dr. habil. W. Reuter (Max-Planck-Institut, Martinsried) zur Analyse überlassen. Für die Chromosomenpräparation der Zwiebel (*Allium cepa*), der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) sowie der Saubohne (*Vicia faba*) und blaue Traubenhyazinthen (*Muscari armenaticum* L.) wurden handelsübliche Sorten eingesetzt. Zur Analyse der Lilienchromosomen wurden Wurzelspitzen und Antheren der Sorten *Lilium longiflorum* Thunb. cv. conneticut king und cv. Echancement eingesetzt. Für die DNA-Präparation und Gewinnung meiotische Pollenmutterzellen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wurde ausschließlich der Ökotyp Col-0 verwendet.

Zur Gewinnung von Mitosen wurden alle Samen unter definierten Bedingungen bei 24°C in der Klimakammer zur Keimung gebracht. Pflanzen, die für die Ernte von Mitosen und Meiosen bestimmt waren wurden unter Langtagbedingung (bei 16 Stunden Tag und 8 Stunden Nacht) im Gewächshaus kultiviert.

### 2.1.8. Allgemeine Puffer und Lösungen

10 x PBS	750 mM	Natriumchlorid
	30 mM	Kaliumchlorid
	45 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
1 x TE-Puffer	10,0 mM	Tris-HCl,
	1,0 mM	EDTA, pH8,0
10 x TBE	1,0 M	Tris
	0,5 M	Borsäure
	20 mM	EDTA
	15 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
20 x SSC	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitratdihydrat, pH 7,2
NaAcetat	3 M	pH 8,0

## 2.2. Allgemeine molekulargenetische Methoden

Alle verwendeten Lösungen und Arbeitsmaterialien wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121°C autoklaviert bzw. Lösungen über einen Filter von 0,45 µm steril filtriert. Fixierungslösungen wurden vor Gebrauch stets frisch hergestellt. Nachfolgende Methoden wie das Anlegen von Stammkulturen, Gelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt.

### 2.2.1. Anzucht von Stammkulturen

2YT-Medium	16 g	Trypton
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1000 ml	<i>A.bidest.</i>
		pH 7,4
Ampicillin-Stammlösung	40 mg/ml	in <i>A.bidest.</i>

Stammkulturen wurden in 30 ml 2YT-Medium zusammen mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

### 2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien *E.coli* (BIRNBOIM und DOLBY, 1979)

Lösung I	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
Lösung II	0,2 M	Natriumhydroxid
	1%	SDS (w/v)
Lösung III	3 M	Kaliumacetat
	1,8 M	Ameisensäure
Lysozym-Stammlösung	40 mg/ml	in <i>A.bidest.</i>
RNase A-Lösung	10mg/ml	in <i>A.bidest.</i>

Die Bakterienkultur (siehe 2.2.1.) wurde 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und nachfolgend in 150 µl Lösung I (RT) und 1 µg Lysozym resuspendiert sowie 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte nach Zugabe von 150µl Lösung II und einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis. Die DNA wurde im Anschluß durch Zugabe von 150 ml Lösung III präzipitiert und 10 Minuten bei 10 000 UpM (4°C) sedimentiert. Nach dem

Resuspendieren des DNA-Pellets in einem entsprechenden Volumen *A.bidest.* erfolgte eine RNase-Behandlung (siehe 2.2.4).

### 2.2.3. Isolierung pflanzlicher gesamtgenomischer DNA nach FULTON et al. (1995)

Kernlysepuffer:	0,2 M	Tris
	2,0 M	Natriumchlorid
	50 mM	EDTA
	2%	CTAB
DNA-Extraktionspuffer	0,35 M	D(-)-Sorbit
	0,10 M	Tris-HCl (pH 7,5)
	5 mM	EDTA
Aufschlußpuffer:	2,5 (v/v)	DNA-Extraktionspuffer
	2,5 (v/v)	Kernlysepuffer
	1,0 (v/v)	5% (w/v) N-Laurosylsarcosin-Natriumsalz
	0,3%	Natriumbisulfit
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1	(v/v)

120 mg frisch geerntetes Blattmaterial wurde in einem 1,5 ml Kunststoffreaktionsgefäß mit 200 µl Aufschlußpuffer unter Zugabe von Quarzsand mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette zerkleinert. Anschließend wurden 550 µl Aufschlußpuffer dazugegeben, der Ansatz 2 – 3 mal geschwenkt und im Wasserbad bei 65 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde nach Zugabe von 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch der Ansatz mehrfach gut gemischt und für 5 Minuten bei 4°C bei 10 000 UpM zentrifugiert. 450 µl des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit gleichem Volumenanteil eisgekühltem Isopropanol versetzt. Die DNA wurde durch vorsichtiges Schwenken ausgeschüttelt und für 5 Minuten bei 10 000 UpM (4°C) sedimentiert. Danach wurde das DNA-Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer bei 37°C resuspendiert und eine RNase-Verdauung (siehe 2.2.4.) durchgeführt.

### 2.2.4. RNase-Verdauung

RNase A-Lösung	10 mg/ml	RNase A
	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>



mindestens einen bis drei Tage im Dunkeln auf einem angefeuchteten (*A.demin.*) Filterpapier bei 4°C gelagert. Die Keimung der Samen erfolgte in einer Klimakammer bei 24°C im Dunkeln.

### 2.3.2. Vorbehandlung nicht-synchronisierter Chromosomen

Hydroxychinolin-Lösung                      2 mM                      in *A.bidest.*

Zur Analyse nicht-synchronisierter, mitotischer Chromosomen wurden Wurzelspitzen von Topfpflanzen bzw. von gekeimten Samen geerntet und für 5 bis maximal 12 Stunden in eisgekühltem *A.demin.* gelagert. Bei schlecht spreitenden Metaphase-Chromosomen, wie z.B. von *Agropyron elongatum*, erfolgte alternativ eine Inkubation in eiskalter Hydroxychinolin-Lösung. Beide Methoden führen zu einem Abbau des Spindelfaserapparates und bewirken gleichzeitig eine Verkürzung der Chromosomen, wodurch das Spreitungsverhalten der Chromosomen deutlich verbessert wird. Nach dem Abtropfen auf Filterpapier wurden die Wurzelspitzen in „3:1“-Fixativ (v/v Ethanol/Eisessig) fixiert und für mindestens 1 Tag bei -20°C aufbewahrt.

### 2.3.3. Anreicherung und Synchronisation

Mitotische Chromosomenspreitungen wurden ausschließlich aus dem Wurzelspitzenmeristem (Vegetationspunkt) gewonnen. Durch eine Vorbehandlung des Zellgewebes (BUSCH *et al.*, 1995) kann eine Anreicherung und Synchronisation von teilungsaktiven Zellen erzielt werden. Dies führt bei Getreidepflanzen zu einer Erhöhung des Metaphaseindex bis zu 60%. Für eine Stimulierung des Wurzelwachstums und Anreicherung teilungsaktiver Zellen wurden die Samen vor der Keimung in einer Petrischale auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und mindestens einen Tag bei 4°C gelagert, bevor sie zur Keimung gebracht wurden. Die teilungsaktiven Wurzelspitzen wurden dann mit Hydroxyharnstoff, einem Hemmstoff der Ribonukleotid-Reduktase, behandelt. Dies verhindert den Einbau von dNTPs während der DNA-Replikation und hält teilungsaktive Zellen in der S1-Phase. Während der anschließenden Wachstumsphase durchlaufen die synchronisierten Zellen den Mitose-Zyklus. Eine Behandlung mit dem Herbizid APM, das als Spindelfasergift zum Abbau von Spindelfasern führt, arretiert die Chromosomen in der Metaphase. Eine anschließende Eiswasserbehandlung verbessert zusätzlich das Spreitungsverhalten der Chromosomen.

APM (O-methyl-O-(2-nitro-p-toloyl)N-isopropylphosphoramidothioat)    Bayer, Leverkusen  
Stammlösung                                      24 mg/ml                      DMSO (Dimethylsulfoxid)

Hydroxyharnstoff-Stammlösung              95 µg/ml                      in *A.bidest.*

Wurzelspitzen gekeimter Samen wurden auf ein Filterpapier gesetzt, das mit einer 1/1000 Verdünnung der Hydroxyharnstofflösung getränkt wurde und für 12 Stunden im Dunkeln bei

24°C inkubiert. Nach 3 x Waschen für je 3 Minuten in *A.demin.* wurden die Samen auf ein mit frischem *A.demin.* benetztes Filterpapier für weitere 5 Stunden in der Klimakammer (24°C) inkubiert, bevor sie 3 – 5 Stunden mit einer 1/10000 Verdünnung der APM-Lösung behandelt wurden. Die Wurzelspitzen wurden nochmals in *A.demin.* gewaschen bevor sie von dem Samen abgetrennt und in „3:1“-Fixativ (v/v Ethanol/Eisessig) überführt wurden. Die Präparate wurden für mindestens 1 Tag bis mehrere Wochen bei -20°C gelagert.

#### 2.3.4. Chromosomenpräparationstechniken

Objektträger	25 x 70 mm	Menzel
Deckgläser	24 x 24 mm	Menzel
5% ige Karminessigsäure	5%	Karminrot
	45%	Essigsäure
2,5% Glutaraldehyd-Lösung	2,5%	in Cacodylat-Puffer (pH 7,0)

#### 2.3.5. Reinigung der Objektträger

Die verwendeten Objektträger wurden vor Gebrauch zuerst unter fließendem Wasser gereinigt und anschließend für mindestens 1 Stunde in 5%iger HCl-Lösung in Ethanol gelagert. Nach mehrmaligen Spülen in 100% Ethanol wurden sie luftgetrocknet.

#### 2.3.6. Quetschpräparation (zytogenetische Standardtechnik)

Fixiertes Wurzelspitzen- bzw. Antherengewebe wurde mit dem Skalpell zerkleinert und nach Zugabe von einem Tropfen Karminessigsäure und unter leichter Erwärmung unter einem Deckglas gequetscht bis die gewünschte Chromosomenspreitung eingetreten ist.

#### 2.3.7. Chromosomentropfpräparation nach enzymatischer Vorbehandlung

Die enzymatische Mazeration von Wurzelspitzenmeristemen wurde nach einer von BUSCH *et al.* (1995) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Hauptkomponenten pflanzlicher Zellwände, (Pektine und Zellulose) werden durch Inkubation in einer Pectolyase/Zellulase-Enzymlösung abgebaut und eine Zellsuspension hergestellt. Die Dauer der enzymatischen Verdauung ist dabei sowohl von der Konzentration und der Temperatur des Enzymmixes, als auch von der Pflanzenart und dem jeweiligen Gewebetyp abhängig. Eine im Anschluss durchgeführte hypotone Behandlung mit einer 0,075 mmol KCl-Lösung führt zu einem Anschwellen der Zellen, die dann während der Tropfpräparation leicht zum Aufplatzen gebracht werden können.

Cellulase/Pectolyase-Lösung	2,5%	Cellulase (w/v)	Y-23, Kikkoman, Düsseldorf
	2,5%	Pectolyase (w/v)	„Onozuka“ R-10, Serva
Lyase-Puffer	75 mM	KCl	
	7,5 mM	EDTA, pH 4,0	

KCl	75 mM	in <i>A.bidest.</i>
„3:1“-Fixativ	3:1	Ethanol/Eisessig (v/v)

Fixierte Wurzelspitzen wurden für 30 bis 60 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Wurzelspitze (etwa 2 - 5 mm) wurde abgetrennt, mit einem Skalpell mehrfach zerkleinert, bevor das Gewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Enzymlösung (2,5% Cellulase/2,5% Pectolyase) überführt wurde. Die Mazeration des Gewebes erfolgte im Wasserbad bei 30°C, wobei die Inkubationszeit in Abhängigkeit vom Pflanzenmaterial zwischen 60 und 90 Minuten variieren kann. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml KCl (75 mM) versetzt und nach 5 Minuten Inkubationszeit (RT) durch eine Nylon-Gaze mit einer Porengröße von 80 µm in ein frisches Reaktionsgefäß filtriert. Die Sedimentation erfolgte bei 80xg für 6 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit 1 ml „3:1“-Fixativ vorsichtig resuspendiert. Dieser Waschvorgang mit Fixativ wurde 3 – 5 mal wiederholt, bevor die Zellsuspension in einem geeigneten Volumen aufgenommen und aus einer Höhe von ca. 20 – 40 cm auf eisgekühlte, mit *A.bidest.* angefeuchtete, Objektträger getropft wurden. Die Präparate wurden luftgetrocknet und bis zur Verwendung, jedoch für mindestens einen Tag, bei RT gelagert.

## 2.4. Präparation meiotischer Chromosomen

Der Entwicklungszustand individueller Meiosestadien korreliert innerhalb einer Spezies eng mit der Antheren- und Knospenlänge. Mit der Progression des Zellzyklus nimmt auch die Antherenlängen proportional zu. Die Antheren einzelner Lilienknospen wurden aus dem Perianth (Blütenhülle = Kelch und Kronblätter) entfernt und nachfolgend fixiert. Für eine vergleichende Untersuchung unterschiedlicher Fixantien wurden einzelne Staubgefäße gedrittelt und jeweils für einen Tag in „3:1“-Fixativ (-20°C), 70% Ethanol (-20°C) oder in 2,5% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert. Entwicklungsstadien von Pollenmutterzellen wurden vor der Präparation anhand eines Quetschpräparates (siehe 2.3.6.) lichtmikroskopisch bestimmt.

Bei der Isolierung der Roggenstadien wurde der Reifegrad einzelner Roggenähren anhand des Längenverhältnisses der Ähre zum letzten Blattinternodium abgeschätzt. Zur Isolierung von Meiose I und Meiose II-Stadien soll dabei der Abstand der Ähre zum Internodium etwa 2/3 der Länge der Blattscheide entsprechen. Nach der Ernte werden die Ähren von den Blattscheiden getrennt. Zur besseren Identifizierung einzelner Spindelstufen wurden die Grannen kurz über den Blütenständen beschnitten bevor sie in „3:1“-Fixativ überführt und bei -20°C gelagert wurden. Die Präparation individueller Antheren einzelner Spindelstufen erfolgte frühestens nach einer Fixierung von 24 Stunden bei -20°C.



Zur Präparation sehr kleiner Antheren, wie der Ackerschmalwand und der Zuckerrübe, werden ganze Knospen in „3:1“-Fixativ bzw. 70% Ethanol für mindestens 1 Tag bei -20°C fixiert bevor sie unter dem Binokular präpariert wurden.

#### 2.4.1. Tropfpräparation meiotischer Chromosomen

Cellulase/Pectolyase-Lösung	1,25% Cellulase (w/v)	Y-23, Kikkoman, Düsseldorf
	1,25% Pectolyase (w/v)	„Onozuka“ R-10, Serva, Heidelberg in Lyase-Puffer

Kleine Antheren der Zuckerrübe und Arabidopsis wurden vollständig im Verdauungsmix eingesetzt, während bei den großen Antheren von Roggen und der Lilie zuerst die gut sichtbaren Stiele der Staubgefäße entfernt wurden. Die Antheren wurden soweit wie möglich mit dem Skalpell zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl Cellulase/Pectolyase-Lösung überführt. Die Mazeration des Gewebes erfolgte im Wasserbad bei 25°C. Nach der KCl-Behandlung (siehe 2.3.7) wurden die Zellen 3 bis 5 mal in 70% Ethanol gewaschen und bei 80xg für 6 Minuten zentrifugiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in „3:1“-Fixativ aufgenommen, zentrifugiert und die Zellsuspension auf angefeuchtete, gekühlte Objektträger getropft. Die Präparate wurden mindestens 1 Tag bei RT aufbewahrt.

#### 2.4.2. Präparation mit Isolierungspuffer (IDe) (modifiziert nach BURKHOLDER und MUKHERJEE, 1970)

Meiotische Chromosomen werden nach kurzer Fixierung in 70% Ethanol mit einem Puffersystem von definierter Ionenstärke behandelt. Unter dem Einfluss 2-wertiger Ionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ), Zuckermoleklülen und Natrium-Acetat kann das Chromatin während der Präparation stabilisiert werden. Zellmembran und Zellwandbestandteile werden durch das ionische Detergenz, und das leicht saure Puffermilieu destabilisiert und ermöglichen bei der Gefrierbruchtechnik ein Freisetzung des Zellinhalts.

Isolierungspuffer (IDe)	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,1 M	Sucrose
	0,1 M	NaAcetat
	1 mM	HCl
	0,5%	TritonX-100
		pH 5,4

Antheren wurden für 1 Stunde (RT) in 70%igem Ethanol fixiert, bevor das Gewebe mit dem Skalpell zerkleinert in ein Reaktionsgefäß mit Isolierungspuffer (IDe) überführt. Während einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei RT wurde der Ansatz wiederholt vorsichtig gemischt. Das mazerierte Gewebe wurde im Anschluß durch eine Gaze mit einer Maschennetzgröße von 80 µm

filtriert und bei 80xg für 6 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird das Zellpellet in 70% Ethanol resuspendiert und 3 bis 5 mal in Ethanol gewaschen bevor das Sediment in „3:1“-Fixativ aufgenommen und erneut zentrifugiert wird. Die Zellsuspension wird auf (mit *A.bidest.*) angefeuchtete Objektträger getropft und über die Gefrierbruch-Technik gespreitet (siehe 2.7.1.).

## 2.5. Klassische zytogenetische Methoden

### 2.5.1. C-Banden Färbung

Die C-Banden-Technik (SUMNER, 1972) ermöglicht eine Darstellung des konstitutiven Heterochromatins und stellt heute neben der N-Bandentechnik eine wichtige Nachweismethode in der Diagnostik pflanzlicher Chromosomen dar.

Chromosomen aus Spreitungspräparaten werden dabei zuerst mit einer HCl- und Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung denaturiert und nachfolgend in Citratpuffer renaturiert. Durch Anfärben mit der basischen Giemsa-Färbelösung können konstitutive, heterochromatische Segmente auf den Chromosomen sichtbar gemacht werden. Der Mechanismus der Färbung ist bis heute noch nicht geklärt, beruht jedoch vermutlich auf spezifischen Reaktionen von nicht-Histon-Proteinen mit basischen Gruppen der Farbstoffe.

Ba(OH) <sub>2</sub> -Lösung	gesättigte Lösung in <i>A.bidest.</i>	
Sörensen-Puffer	66,7 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	66,7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		pH 7,0
Giemsa-Färbelösung	1%	in Sörensen-Puffer

Frisch getropfte Chromosomenspreitungspräparate (siehe 2.3.7.) werden vor der Prozedur 1 Tag in 100% Ethanol aufbewahrt. Nach dem Abtrocknen werden die Objektträger für 2 – 5 Minuten in einer Küvette mit 60°C warmer HCl-Lösung (0,2 M) inkubiert und kurz in *A.demin.* gespült, bevor 5 – 7 Minuten lang eine Behandlung in einer Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung (RT) erfolgt. Nach kurzem Spülen in *A.demin.* werden die Präparate für 1 bis 2 Stunden in 2 x SSC-Puffer bei 60°C inkubiert und erneut in *A.demin.* gespült. Die Anfärbung der C-Banden erfolgt mit einer 1%iger Giemsa-Färbelösung für 1 – 3 Stunden bei RT. Der Verlauf der Färbung wird lichtmikroskopisch kontrolliert und bei ausreichender Bänderung überschüssiges Färbereagenz mit *A.demin.* abgewaschen und die Präparate an der Luft getrocknet. Zur Langzeitaufbewahrung empfiehlt sich eine Versiegelung der Präparate mit einem Tropfen Entellan (Fa. Merck) unter einem Deckglas. Die Bilddokumentation erfolgte über eine CCD-Kamera. Die Signalbanden wurden über das Linienmessprogramm des IpLab-Spektrum Programms ausgewertet (siehe 2.6.4.).

## 2.6. Molekulare zytogenetische Methoden

### 2.6.1. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

*In situ* Hybridisierungen ermöglichen den Nachweis von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen an morphologisch erhaltenen Chromosomen, Zellkernen und Zellen. Bei der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) (PARDUE und GALL, 1969; JOHN *et al.*, 1969) werden Nukleinsäureketten entweder direkt mit fluorochrom-gekoppelten Nukleinsäure-Molekülen oder indirekt mit stabilen Reporter-Molekülen wie Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP (BAUMANN *et al.*, 1980, PINKEL *et al.*, 1986) markiert und auf Zellen oder Chromosomen hybridisiert. Indirekt markierte Sonden können im Anschluß über Fluorochrom gekoppeltes Avidin bzw. Fluorochrom gekoppelte Antikörper nachgewiesen werden.

#### 2.6.1.1. Amplifikation von DNA über die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Vermehrung von DNA-Sequenzen aus Plasmiden oder genomischer DNA erfolgte über PCR (MULLIS und FALOONA, 1986). Kurze synthetische Oligonukleotide („primer“) werden an eine denaturierte Ausgangs-DNA angelagert. Diese dient einer thermostabilen DNA-Polymerase als Matrize, von dem aus DNA-Stränge durch den Einbau neuer Markierungsnukleotide *in situ* verlängert werden. Eine Wiederholung dieses Zyklus führt zu einer exponentiellen Vermehrung spezifischer Sequenzen.

#### Reaktionsansatz

Ausgangs-DNA	10 pg – 100 ng	
PCR-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 9,0
	50 mM	KCl
	0,1%	Triton-X-100
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
dATP,dCTP,cGTP)	200 µM	DNTPs (dTTP,dATP,dCTP,cGTP
Oligonukleotid-„primer“ 1	1 µM	
Oligonukleotid-„primer“ 2	1 µM	
Taq-Polymerase (5 E/µl)	2,5 E	Taq-Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde in Reaktionsgefäßen (auf Eis) pipettiert, gemischt und mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Zu Beginn wurde die PCR mit einem Zyklus von 4 Minuten bei 95°C, 2 Minuten 50 °C und 2 Minuten 72°C gestartet und folgendes Programm 35 Zyklen wiederholt:

35 Zyklen	1 min bei 94°C
	1 min bei 55°C
	1 min bei 72°C

Der letzte Zyklus endete mit einer Verlängerung der Synthesezeit bei 72°C auf 5 Minuten.

### 2.6.1.2. Markierung von DNA-Sonden über die Polymerasekettenreaktion

In der PCR-Markierungsreaktion wird die Ausgangs-DNA im Verlauf von 35 PCR-Zyklen durch den Einbau von Reporternukleotide (dUTP-16-Biotin, bzw. dUTP-16-Digoxigenin) markiert. Das Markierungsverhältnis von dTTP zu dUTP-Biotin, bzw. dUTP-Digoxigenin wurde in Abhängigkeit von der DNA-Sonde in folgendem Verhältnis eingesetzt:

- a) bei hoch-repetitiven oder genomischen DNA-Sonden: 1 : 6 = dUTP : dTTP  
 b) bei Einzelgensequenzen, pAR 21 und cGISH.Ara 1 : 2 = dUTP : dTTP  
 c) DNA-Sonden für EMISH 1 : 2 = dUTP : dTTP

### 2.6.1.3. Markierung von DNA-Sonden mittels „nick“-Translation

Komplexe DNA-Sonden, wie gesamtgenomische DNA, BACs und Plasmid-DNA mit Fragmentlängen größer 500 Bp wurden über „nick“-Translation (RIGBY *et al.*, 1977; LANGER *et al.* 1981) markiert. Bei dieser Reaktion setzt die DNase I kleine Brüche, „nicks“, in die doppelsträngige DNA von denen aus die Polymerase I in 5' – 3'-Richtung Nukleotide abbaut (Exonukleaseaktivität). Dieser neu entstandene Einzelstrangbereich wird dann durch Anheften von Nukleotiden einschließlich dUTP-Biotin bzw. dUTP-Digoxigenin an das 3'-OH-Ende (Polymeraseaktivität) neu synthetisiert und dabei gleichzeitig markiert. Die Reaktion wird gestoppt, wenn die DNA eine Länge von durchschnittlich 100 – 500 bp aufweist.

10 x Reaktionspuffer	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mg/ml	Rinderserumalbumin (BSA)
	500 M	Tris-HCl, pH 8.0
β-Mercaptoethanol	0,1 M	
DNase I-Stammlösung	3 mg/ml	DNase I
	0,15 M	NaCl
	50%	Glycerin (v/v)
Nukleotidmix	je 5 mmol/l	dATP, dCTP, dGTP
	5 mmol/l	dUTP-Biotin : dTTP (v/v;1:2 oder 1:6)
	bzw. 5 mmol/l	dUTP-Digoxigenin : dTTP (v/v;1:2 oder 1:6)

Zur Markierung wurden 2 µg DNA zusammen mit dem 1 x Reaktionspuffer, β-Mercaptoethanol und dem Nukleotidmix in einem Reaktionsansatz von 50 µl auf Eis pipettiert. Das Verhältnis von dTTP zu dUTP wird dabei wie oben beschrieben eingesetzt. Nach Zugabe von DNase I und Polymerase I wurde der Ansatz gemischt in einem Wasserbad bei 15°C für 60 – 90 Minuten inkubiert. Die Dauer der Inkubationszeit richtet sich dabei nach der Fragmentlänge der zerkleinerten DNA, die bei optimaler Markierung zwischen 100 und 500 Bp liegen soll. Durch die

Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) wird die Reaktion gestoppt und die DNase I durch Hitzebehandlung (15 Minuten bei 68°C) inaktiviert. Zur Abschätzung der Fragmentlängen wurde jeweils 2% des Reaktionsvolumens auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetragen und aufgetrennt.

#### **2.6.1.4. Aufreinigung der DNA-Sonden im „spin column“-Verfahren**

Die Trennung markierter langer Polynukleotidketten von nicht-inkorporierten Nukleotiden, Primern oder sehr kurzen Fragmenten erfolgte säulenchromatographisch im „spin-column“-Verfahren.

Sephadex-G 50	10g	in 100 ml 1 x TE (pH 8,0)
---------------	-----	---------------------------

Eine 1 ml Spritze, die als Säule dient wird mit der Trenngellösung (Sephadex-G 50) bis auf 0,8 ml Marke aufgefüllt und für 3 Minuten bei 3300 UpM (1600xg) zentrifugiert. Zum Äquilibrieren der Säule wird 1 x TE-Puffer in dem selben Volumen der zu reinigenden Sonde aufgetragen und 3 Minuten bei 3300 UpM zentrifugiert. Die DNA-Sonde wird im Anschluss auf die Säule aufgetragen, für 3 Minuten mit 1600xg zentrifugiert und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen.

#### **2.6.1.5. Semiquantitativer Einbautest mittels NBT/BCIP**

Die Einbaurrate von dUTP-Biotin bzw. dUTP-Digoxigenin markierten DNA-Sonden wird über eine semiquantitative Nachweismethode abgeschätzt. Markierte DNA-Fragmente werden an eine Nylon-Membran gebunden und über Streptavidin (SA-AP) bzw. über alkalische Phosphatase, die kovalent an Anti-Digoxigenin (Anti-DIG-AP) gebunden ist, nachgewiesen. In einer 2-stufigen, enzymatischen Farbreaktion mit NBT-BCIP als Substrat kann die alkalische Phosphatase als blauer Farbniederschlag nachgewiesen werden.

Puffer 1	6 x SSC 0,1 mg/ml	pH 7,5 Heringssperma-DNA		
Puffer 2	0,15 M 0,1 M	NaCl Tris-HCl, pH 7,5		
Puffer 3	6 x SSC 0,1 mg/ml 1% (w/v)	pH 7,5 Heringssperma-DNA BSA (Fraktion V)		
Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase (SA-AP)	1 : 1000	in Puffer 2	Roche	

Anti-Digoxigenin-konjugierte AP, Fab-Fragmente 1 : 5000 in Puffer 2 Roche  
(Anti-Dig-AP)

NBT/BCIP Färbelösung

Biomol

Eine Verdünnungsreihe von 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 0,1 pg der markierten DNA wurde in Puffer 1 hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe je 1 µl auf einer Nitrocellulose-Membran aufgetragen. Die Membran wurde für 30 min bei 80 °C gebacken, anschließend kurz mit Puffer 2 benetzt und für weitere 30 Minuten (37°C) in Puffer 3 inkubiert. Nach dem überschüssiger Puffer entfernt wurde, werden die Biotin-markierten Sonden mit einer SA-AP-Verdünnung, die Digoxigenin-markierten Sonden mit einer Anti-Dig-AP-Verdünnung in Puffer 2 für 15 Minuten (RT) inkubiert. Die Membran wurde anschließend je 2 x 5 Minuten in Puffer 2 gewaschen, mit der NBT/BCIP Färbelösung (Biomol) überschichtet und für weitere 60 Minuten bis zum Eintreten der Farbreaktion im Dunkeln inkubiert. Die Markierungsdichte wurde als sehr gut bewertet, wenn der Farbniederschlag der 0,1 pg Verdünnung auftritt, als gut wenn die 1 pg Verdünnung sichtbar war und als gerade noch ausreichend für repetitive DNA-Sonden, wenn die 10 pg Verdünnung einen Farbniederschlag ergab.

#### 2.6.1.6. Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Chromosomenspreitungspräparate sind häufig von RNA und Proteinen umgeben, welche die chromosomalen Zielsequenzen maskieren und einen unspezifischen Signalhintergrund hervorrufen können. Vorbehandlungen der Präparate mit RNase A oder Proteinasen erleichtern das Eindringen der DNA-Sonde zur Zielsequenz und reduzieren gleichzeitig einen unspezifischen Signalhintergrund.

RNase A	1 mg/ml	in 2 x SSC, pH 7,1
Pepsin-Lösung	1 mg/100 ml	in HCl-Lösung (0,1 mM)
Formaldehyd-Lösung	2,0%	Paraformaldehyd, pH 7,1 in 1 x PBS/MgCl <sub>2</sub>
1 x PBS/MgCl <sub>2</sub>	1 x PBS 0,05 M	pH 7,1 MgCl <sub>2</sub>

Die Präparate wurden nach kurzem Waschen in 2 x SSC mit 100 µl RNase-Lösung überschichtet und mit einem Deckglas versehen in einer Feuchtekammer für 1 Stunde (37°C) inkubiert. Nach 2 Waschschritten von jeweils 5 Minuten in 2 x SSC (pH 7,1; 37°C) und 5 Minuten in 1 x PBS (pH 7,1; 37°C) wurden die Präparate 15 Minuten lang in einer Küvette mit 37°C warmer Pepsin-Lösung inkubiert. Im Anschluß wurden die Objektträger für 2 x 5 Minuten

in 1 x PBS sowie weitere 5 Minuten in 1 x PBS/MgCl<sub>2</sub> gespült, bevor die Chromosomen in 2%iger Formaldehyd-Lösung für 20 Minuten (RT) fixiert wurden. Nach zwei weiteren Waschschritten je 5 Minuten in 1 x PBS (RT) wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert und an der Luft getrocknet.

#### 2.6.1.7. Vorbereitung der DNA-Sonde

Heringssperma-DNA	1 µg/µl	in <i>A. bidest.</i>
Hybridisierungsmix	50%	Formamid <i>p.a.</i>
	20%	Dextransulfat
	2 x SSC	pH 7,0

In Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Sonde (siehe Tabelle 1) wurden 60 – 200 ng markierte DNA zusammen mit fragmentierter Heringssperma-DNA (0,5 µg/µl) unter Hinzugabe von 0,1-fachem Volumen an 3 M NaAcetat (pH 8,0) und 2-fachem Volumen absoluten Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die DNA wurde bei 13 000 Upm für 25 Minuten (4°C) sedimentiert. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet in 70% Ethanol gewaschen und erneut 15 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstand wurde das Sediment über eine „speed-vac“-Apparatur oder alternativ an der Luft getrocknet. Die DNA-Sonde wurde in einem 15 µl Hybridisierungsmix resuspendiert, in einem Heizblock für 5 Minuten bei 85 °C denaturiert und im Anschluss sofort für 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

#### 2.6.1.8. Hybridisierung

Vorbehandelte Chromosomenpräparate wurden in einer Küvette mit 70%igen Formamid in 2 x SSC (pH 7,0) bei 68°C denaturiert. Die Denaturierungszeit varrierte dabei in Abhängigkeit vom Pflanzengenom zwischen 60 bis 120 Sekunden. Im Anschluss wurden die Präparate sofort für jeweils 3 Minuten in einer aufsteigenden, eisgekühlten Alkoholreihe von 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet bevor 15 µl der denaturierten DNA-Sonde im Hybridisierungsmix auf das ausgewählte Areal des Objektträgers gegeben werden. Nachdem der Tropfen mit einem Deckglas (24 x 24 mm) versehen wurde und mit Flüssigklebstoff (Fixogum; Fa. Marabu) versiegelt wurde, erfolgte die Hybridisierung in Abhängigkeit von der zu hybridisierenden DNA-Sonde zwischen einem und 7 Tagen in einer feuchten Kammer bei 37°C.

#### 2.6.1.9. Stringenzbedingung

Der Signalnachweis der hybridisierter Sonde erfolgte in Abhängigkeit vom Homologiegrad der DNA-Sonde zur Genomsequenz bei unterschiedlicher Stringenz. Diese Stringenzbedingungen sind u.a. von der Temperatur, dem pH-Wert, der Ionenkonzentration, der Länge und der Konzentration der Sonde sowie vom organischen Lösungsmittel abhängig und wurden entsprechend der Formel nach MEINKOTH und WAHL (1984) ermittelt. Sequenzübereinstimmung

von 100% – 90% wurden dabei als hohe Stringenz, 70 – 90% als mittlere bzw. bei Übereinstimmungen <70% als niedere Stringenz bewertet.

$$\text{Stringenz (\%)} = 100 - (M_f - T_a)$$

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%GC) - 500/n - 0,61 (\% \text{ Formamid})$$

<b>M<sub>f</sub></b>	:	Fehlpaarungsfaktor (1 = für Sonden über 150 Bp; 5 = für Sonden unter 20 Bp)
<b>T<sub>m</sub></b>	:	errechnete Schmelztemperatur der DNA (°C) bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegen
<b>T<sub>a</sub></b>	:	Temperatur der Waschlösung
<b>% GC</b>	:	prozentualer Anteil der Basen Guanosin und Cytidin (falls unbekannt, wurde bei Getreide ein Durchschnittswert von 45% angenommen)
<b>n</b>	:	Sondenlänge in Basenpaaren
<b>% Formamid</b>	:	Formamidkonzentration in Volumenprozent

Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt und die Objektträger je 3 x 5 min in 50% Formamid/2 x SSC (pH 7,1) und 3 x 5 min in 2 x SSC (pH 7,1) gewaschen. Die Waschtemperatur betrug dabei je nach gewünschter Stringenz zwischen 28°C und 42°C.

#### 2.6.1.10. Signalnachweis

Biotin-markierte DNA-Sonden wurden über Avidin-Cy<sup>TM</sup>3 und Digoxigenin-markierte über spezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper nachgewiesen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Markierungs- und Detektionssysteme für FISH-Analysen**

Detektions-System	Markierungsnukleotid	Antikörper-kaskade	primärer Antikörper (Verdünnung)	sekundärer Antikörper (Verdünnung)	tertiärer Antikörper (Verdünnung)
direkt	dUTP-Fluorescein*	0	–	–	–
indirekt	Biotin-16-dUTP	1	Avidin-Cy <sup>TM</sup> 3* (1:1000 – 1:1500)	–	–
indirekt	Digoxigenin-16-dUTP	1	anti-Dig(Fab)-FITC (1 : 25)	–	–
indirekt	Biotin-16-dUTP	3	Avidin-Cy <sup>TM</sup> 3* (1:1000 – 1:1500)	biotinyliertes anti-Avidin (Maus) (1:40)	Avidin-Cy <sup>TM</sup> 3* (1:1000 – 1:1500)

4 x SSC/Tween-20	4 x SSC	pH 7,2
	0,5%	Tween-20(v/v)
Blockierungslösung	4 x SSC	pH 7,2
	0,5%	Tween-20(v/v)
	3%	BSA (w/v)



Um einen unspezifischen Signalhintergrund zu vermeiden wurden die Objektträger zuerst mit 100 µl Blockierungslösung überschichtet und, mit einem Deckglas (24 x 60 mm) versehen, für 30 Minuten bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen Blockierungslösung wurden Verdünnungen der Antikörper (siehe Tabelle 2) in 4 x SSC/Tween-20 (pH 7,2) frisch hergestellt. Auf das Hybridisierungsareal wurden 100µl der Verdünnung aufgetragen und mit einem Deckglas verschlossen in der Feuchtekammer für 45 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Präparate wurden im Anschluss jeweils 3 mal 5 Minuten in 4 x SSC/Tween-20 (37°C) gewaschen, bevor eine Inkubation mit sekundären bzw. tertiären Antikörpern erfolgte.

#### **2.6.1.11. Kontrastierung**

DAPI	1 mg/ml	in <i>A.bidest.</i>	
Antifading		Vectashield	(Vector)

Zur Kontrastierung von Chromosomen und Zellkernen wurden die Präparate nach dem letzten Waschschrift in einer 0,4%igen DAPI-Lösung in 4 x SSC/Tween-20 für 10 Minuten (RT) gefärbt und anschließend in *A.demin.* (RT) gespült. Um ein rasches Ausbleichen der Signale zu verhindern wurden die Präparate nach der Lufttrocknung mit einem Tropfen Antibleichmittel („Antifading“) versehen und mit einem Deckglas (24 x 50 mm) versehen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.6.2. Chromosomen-*in situ*-Suppressionshybridisierung (CISS)**

Rekombinante DNA oder komplexe, genomische DNA-Sonden enthalten meist hohe Anteile repetitiver Sequenzen, die nach der Hybridisierung zu einem unspezifischen und dispersen Signalmuster auf den Chromosomen führen können. Fragmentierte genomische DNA oder spezielle Fraktionen hoch-repetitiver C<sub>0</sub>t1-DNA können als Kompetitions DNA in einer Prähybridisierung eingesetzt werden um störende repetitive Sequenzen zu „blockieren“. Einige der FISH- und GISH-Analysen (siehe Tabelle X) wurden daher als *in situ*-Suppressionshybridisierungen (CISS) durchgeführt. Zur Blockierung wurden die DNA-Sonden zusammen mit einem 5- bis 20-fachem Überschuss an Kompetitions-DNA (siehe 2.6.1.8.) präzipitiert und in einem Hybridisierungsmix vorbereitet. Der gesamte Ansatz wurde für 5 Minuten bei 85°C denaturiert und anschließend im Wasserbad für 20 Minuten bei 37°C prähybridisiert ehe die DNA-Sonde auf das Hybridisierungsareal aufgetragen wurde (siehe 2.6.1.9.).

##### **2.6.2.1. C<sub>0</sub>t1-DNA Fraktion**

Die C<sub>0</sub>t1-DNA ist eine Fraktion schnell assoziierender, hoch-repetitiver Sequenzmotive, die in fragmentierter, genomischer DNA enthalten ist. Anhand der Reassoziationskinetik kann diese von den mittel (C<sub>0</sub>t2) und langsam reassoziierenden (C<sub>0</sub>t3) DNA-Klassen als gesonderte Fraktion

isoliert werden. Die Reassoziationskinetik ist dabei abhängig von Ionenkonzentration, Temperatur, DNA-Konzentration, Größe des Genoms und der Länge der DNA-Fragmente.

DNase	10 mg/ml	in Glycerin	Roche
10 x Reaktionspuffer	50 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	0,5 mg/ml	Rinderserumalbumin (BSA)/Puffer	
	500 M	Tris-HCl, pH 8.0	
10 x Nuklease-Puffers (RT)	2,0 M	NaCl <sub>2</sub>	
	0,5 M	NaAcetat (pH 4,5)	
	10 mM	ZnSO <sub>4</sub>	
S1-Nuklease	400 U/μl		Roche

1 mg gesamtgenomische DNA wurde in 500 μl Gesamtvolumen gelöst und mit einer geeigneten DNase-Konzentration in 1 x Reaktionspuffer und 1/10 Volumenprozent 0,1 M β-Mercaptoethanol im Wasserbad (15°C) auf eine Länge von 200 – 1000 Bp geschnitten (siehe auch 2.6.1.3.). Diese Fragmente wurden entweder direkt als gesamtgenomische Kompetitions-DNA verwendet oder zur Herstellung von C<sub>0</sub>t1-DNA wie folgt eingesetzt:

Fragmentierte genomische DNA wurde für 5 Minuten bei 95°C im Wasserbad denaturiert und für weitere 10 Minuten in einem 63°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Reassoziationskinetik hoch-repetitiver DNA-Sequenzen erfolgte nach Zugabe von 100 μl einer 0,3 molaren, 63°C warmer NaCl<sub>2</sub>-Lösung nach folgender Reassoziationskinetik:

$$\frac{\text{Cot1-DNA (mM/ml)}}{\text{Nukleotide (mM/ml)}} = \text{Reassoziationszeit (sek)}$$

wobei unter den oben definierten Bedingungen (sowie der Voraussetzung 1 mol/l = 330 mg/ml DNA bzw. 1,66 mg/ml = 0,005 mol/l) die Renaturierungszeit genau 200 Sekunden beträgt. Die Reassoziationskinetik wurde durch Zugabe von 600 μl 2 x Nuklease S1-Puffer (RT) beendet. Einzelsträngige DNA wurde durch Hinzugabe von 1 μl S1-Nuklease (400 U/μl) während einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C abgebaut. Diese Reaktion wurde durch 60 μl 0,2 M EDTA (pH 8,0) auf Eis gestoppt. Zur Fraktionierung der verschiedenen DNA-Klassen wurde eine sterile, mit Glaswolle abgedichtete 10 ml Einmalspritze mit Sephadex G-50 bis zur 9 ml Marke bepackt und die Säule mit 10 ml TE-Puffer (pH 8,0) äquilibriert (siehe auch 2.6.1.4.). Die renaturierten DNA-Fragmente wurden dann in 10 ml TE-Puffer auf die Säule aufgetragen und das Eluat (je 1 ml Fraktionen) in sterilen Reaktionsgefäßen aufgefangen.

Die DNA-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurden photometrisch bestimmt und die C<sub>0</sub>t<sub>1</sub>-Fraktionen, die den Fraktionen des ersten Extinktionsmaximums entsprachen, vereinigt. Die DNA wurde im Anschluss mit 2 Volumenanteilen 100%igen Ethanol und 1/10 Volumenanteil Natriumacetat (3 M) bei -20°C für 1 Stunde präzipitiert, getrocknet und das Pellet erneut in TE-Puffer resuspendiert.

### 2.6.3. Signalauswertung und Bilddokumentation

Die Auswertung von Signalbanden der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurde an einem Zeiss-Axiophot Mikroskop mit einer Beleuchtungsstärke von 100 Watt (Höchstdruck-Quecksilberdampf Lampe) im Auflichtverfahren durchgeführt. Zur Detektion individueller Fluorochrome wurden dabei folgende Filterkombinationen verwendet:

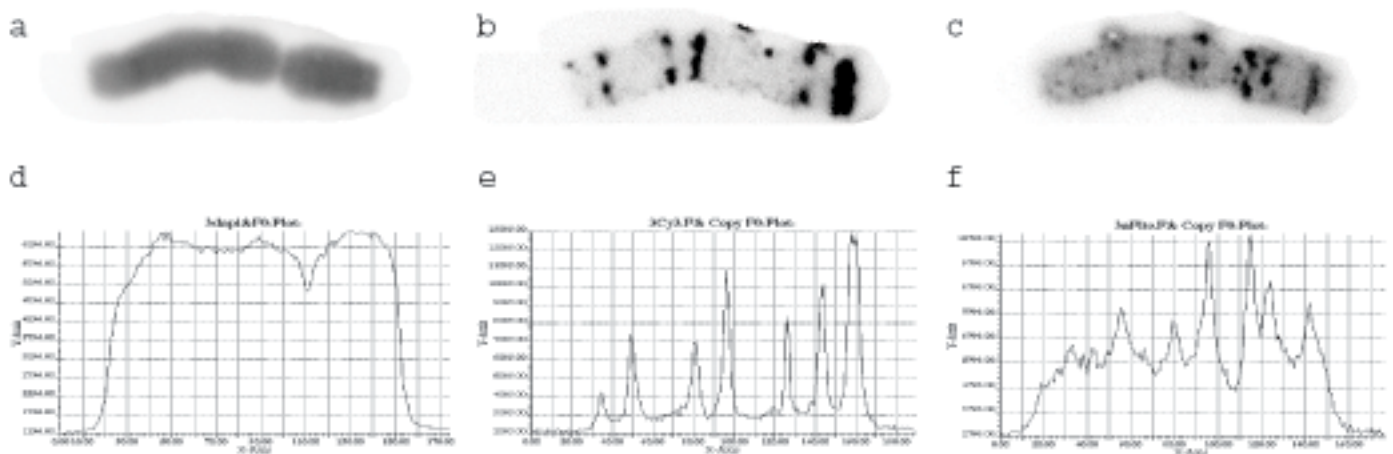
Fluorochrom	Anregungsfilter	Farbteiler	Sperrfilter	Emissionsmaximum
DAPI	BP 365 nm	FT 395 nm	LP 397 nm	395 nm (blaue Fluoreszenz)
FITC	BP 485 nm	FT 510 nm	515–565 nm	523 nm (grüne Fluoreszenz)
Cy3	BP 546 nm	FT 560 nm	LP 590 nm	565 nm (rote Fluoreszenz)

Die Dokumentation erfolgte digital über eine CCD-Kamera (Photometrics) unter Verwendung des IPLab Spektrum-Bildaufnahmeprogrammes (IPLab Spectrum und Multiprobe; Signal Analytics Corporation, Vienna; Virginia, USA). Korrekturen von Pixelverschiebungen, Kolorierung der Schwarzweissaufnahmen durch Fehlfarben sowie Übereinanderlagerungen der Einzelbilder erfolgte entweder mit Hilfe des IPLab- oder des Adobe Photoshop-Programmes.

### 2.6.4. Karyotypanalyse

Zur Klassifizierung der Chromosomen wurden morphologische Charakteristiken wie Chromosomenlänge, Centromerindex (relative Lage des Centromere), Satellitenregion, sowie Ergebnisse von FISH-Analysen und C-Bänderungen mit einbezogen. Die Messungen wurden anhand digitalisierter Schwarzweiß-Aufnahmen individueller Signalbilder aus FISH- und C-Bänderungen durchgeführt. Signalbanden wurden dabei über ein Linien-Mess-Programm (IPLab) ausgewertet, das die Helligkeitsverteilung individueller Pixel als Signalprofile entlang einer definierten medialen Chromosomenachse misst und graphisch darstellt (siehe Abbildung 1). In der Auswertung wurden Fluoreszenzsignale nur dann als Signal gewertet, wenn die Helligkeitswerte mindestens 30% über dem chromosomalen Hintergrund lagen. In die Auswertung wurden ferner die Häufigkeit einbezogen mit denen Signale beobachtet wurden:

\*\*\* = Signale mit 100%, \*\* = Signale >80% und \* = Signale <80% Wahrscheinlichkeit. An Hand der DAPI Bildaufnahmen wurde die Länge der Chromosomen und die Lage der Konstriktionen als Grundlage für die Positionierung einzelner Fluoreszenzsignale verwendet. Die Zuordnung wurde nach (veröffentlichten) Idiogrammen von JENSEN und LINDE-LAURSEN (1992) für Gerste und von SYBENGA (1983) für Roggen, vorgenommen.



**Abbildung 1: Auswertung von Signalbanden der FISH-Analysen über Histogrammanalyse.**  
 Fluoreszenzsignale eines individuellen Roggenchromosoms nach a) DAPI-Färbung; b) FISH-Signal mit pSc119.2 (Cy3); c) FISH-Signal mit cGISH.Ara (FITC);  
 d) - f) Diagramme der Signalverteilungen als Intensitätsprofile entlang der longitudinalen chromosomalen Achse;  
 d) Chromosomenlängenabschätzung und Lokalisation der Zentromerregion anhand des Signalplots nach DAPI-Färbung;  
 e) Signalzuordnung und Signalintensitätsverteilung nach FISH mit pSc119.2 (Cy3);  
 f) Signalzuordnung und Signalintensitätsverteilung nach FISH mit cGISH.Ara (FITC);

## 2.7. Ultrastrukturanalysen im Rasterelektronenmikroskop (REM)

REM Darstellung von Oberflächen entstehen durch Elektronen (Primärstrahl), die mit einer Beschleunigungsspannung von 0,5 bis 3 keV durch elektromagnetische Kondensor- und Objektivlinsen gebündelt, zeilenweise die Präparateoberfläche abrastern. Durch diesen Elektronenbeschuss werden in Abhängigkeit vom untersuchten Objekt Elektronen innerhalb einer Anregungsbirne erzeugt und herausgeschlagen, die so als niederenergetische ( $0 \leq 50 \text{ eV}$ ) Sekundärelektronen (SE) von einem Detektor positiver Spannung aufgenommen und als Helligkeitswerte auf dem Bildschirm dargestellt werden können. Ein Teil der Elektronen des Primärstrahls dringt dabei in das Präparat ein und wird beim Aufprall auf Atomkerne höherer

Ordnungszahl elastisch gestreut. Die Elektronen treten dabei ohne größeren Energieverlust ( $>50\text{eV}$ ) an der Präparateoberfläche aus und können als Rückstreu-Elektronen („back-scattered-electrons“ = BSE) an einem Detektor detektiert werden. Die Anzahl der emittierten Elektronen aus SE und BSE steigt dabei mit zunehmender Ordnungszahl der Elemente der Präparateoberfläche. Die räumliche Darstellung von Objekten im REM wird durch die Anzahl der emittierten SE bestimmt und kann sowohl durch eine Erhöhung der PE-Stromstärke, eine Reduzierung der Beschleunigungsspannung, welche die Eindringtiefe des PE verringert, als auch durch Metallimprägnierungen verbessert werden. Elementen mit hoher Ordnungszahl wie z.B. Goldatome, können nach Eliminieren des „Hintergrundrauschens“ als starkes Signal detektiert werden. Elektronen, die jedoch unelastisch gestreut wurden können im Präparat die kinetische Energie in Wärme umwandeln und damit zu einer Strahlenschädigung des Präparates führen. Die physikalischen Parameter wurden daher jeweils neu angepasst werden um bei größtmöglicher Auflösung keine Strahlungsschäden zu produzieren.

Glutaraldehyd-Lösung	2,5%	Glutaraldehyd (v/v) Cacodylat-Puffer pH 7,0
Cacodylat-Puffer	75 mM 2 mM	Dimethylarsinsäure Natriumsalz Trihydrat MgCl <sub>2</sub> pH 7,0
Objektträger		24 x 64 mm Fa. Menzel Gläser, Berlin
Deckglas		24 x 40 mm Fa. Menzel Gläser, Berlin
„gelaserte“ Rastergravur		Laser Marking Fischen
Trockeneis		eigene Herstellung aus flüssigem CO <sub>2</sub> bzw. Trockeneisplatten von Verpackungsmaterial

### **2.7.1. Tropf-Kryo-Technik (SABATINI et al., 1962)**

Die Gefrierbruchtechnik verhindert ein, mit der Lufttrocknung verbundenes, Kollabieren der 3-dimensionalen Ultrastruktur der Chromosomen und reduziert gleichfalls die Ausbildung störender Oberflächenschichten. Bei der Herstellung von Chromosomenquetsch- (2.3.6.) bzw. Tropfpräparaten (2.3.7.) wurde kurz vor dem vollständigen Verdampfen des „3:1“-Fixatives ein Tropfen 45%ige Essigsäure hinzugefügt. Das Areal wurde sofort mit einem kleinen Deckglas (24 x 40 mm) versehen, überschüssige Essigsäure durch vorsichtigen Druck auf das Deckglas entfernt und die Objektträger mit der Deckglasseite nach unten für mindestens 15 Minuten auf Trockeneis gelagert. Nach dem Absprengen des Deckglases mit Hilfe eines Skalpell wurden die Präparate in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung (RT) fixiert und bei 4°C aufbewahrt.

### 2.7.2. Tanaka-Bruchverfahren (TANAKA, 1980)

Das Tanaka-Bruchverfahren ermöglicht eine Darstellung des strukturellen Aufbaus komplexer Gewebe im REM. Nach Behandlung des Gewebes mit  $\text{OsO}_4$  werden Kohlenstoffdoppelbindungen von Fettsäuremolekülen der Biomembranen, aber auch Chromosomen (vermutlich über die Histone) fixiert. Auf Grund der elektrischen Leitfähigkeit von Osmiumtetroxyd kann die Sputterschichtdicke reduziert werden. Eine Nachbehandlung mit TCH-Lösung (Thiocarbohydrazid,  $\text{CH}_6\text{N}_4\text{S}$ ) führt über SH-Brückenbindung zu einer zusätzlichen Metallimprägnierung durch  $\text{OsO}_4$ .

Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ )-Lösung                      1%    in *A. bidest*                      Mikrotechnik EM, München

Die Antheren wurden in 2,5% Glutaraldehyd mindestens 1 Stunde (RT) fixiert. Das Fixativ wurde durch drei Waschschriffe je 5 Minuten in Cacodylat-Puffer und einem Waschschriff in *A. bidest.* entfernt. Danach wurden die Antheren 10 Minuten lang in einer  $\text{OsO}_4$ -Lösung kontrastiert und im Anschluss 3 x mit *A. bidest.* gewaschen. Nach dem Entfernen der überschüssigen Lösung werden die Antheren in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe eines gekühlten Skalpell im gefrorenen Zustand gebrochen. Einzelne Bruchstücke wurden sofort in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung für 1 Stunde (RT) fixiert. Nach 3 Waschschriffen in Cacodylatpuffer und einem in *A. bidest.* für je 5 Minuten wurden die Gewebestücke über eine aufsteigende Acetonreihe von 20%, 40%, 60%, 80% und 100% dehydriert und am Kritischpunkt (siehe 2.7.4.2.) getrocknet. Die Antherenbruchstücke wurden unter einem Binokular auf einem mit Thermoplast beschichteten Probensteller („stubs“) so positioniert, daß die Bruchfläche nach oben zeigt und mit Platin besputtert (siehe 2.7.8.).

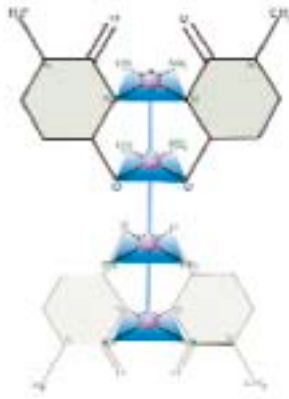
### 2.7.3. Proteinase-Behandlung

Proteinase K    1 mg/ml                      in *A. bidest.*                      ICN

Die in Glutaraldehyd fixierten Chromosomenspreitungspräparate wurden für 5 Minuten in Cacodylat-Puffer (pH 7,0) und 2 x 5 Minuten in *A. bidest.* gewaschen, bevor die Objektträger mit 150  $\mu\text{l}$  einer Proteinase-Lösung (1mg/ml) überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) verschlossen in einer feuchten Kammer für Stunde ( $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert wurden. Nach drei Waschschriffen in *A. bidest.* für jeweils 5 Minuten wurden sie erneut in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung in Cacodylat-Puffer für mindestens 30 Minuten (RT) fixiert.

### 2.7.4. DNA-Färbung mit Platinblau (WANNER UND FORMANEK, 1995)

Der Einbau der organischen Platinblau-Verbindung (Abbildung 2) erfolgt vorzugsweise zwischen den Basen Guanin und Cytosin der DNA-Doppelhelix (DIETER-WURM *et al.*, 1992). Ein direkter Vergleich der topographischen Strukturen aus den SE-Signalen mit Signalen des BSE-Bildes der Platinblaumarkierung ermöglicht eine Unterscheidung von DNA-haltigen Fibrillen und Proteinstrukturen im REM.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung von Platinblau**

#### **2.7.4.1. Herstellung von Platinblau (HOFMANN und BUGGE, 1908)**

2 g Kaliumtetrachlorplatinat wurden mit 3 ml Acetonitril und 40 ml *A.bidest.* gemischt und für etwa 10 Tage bei RT stehen gelassen bis gelbliche Kristalle des Platindichlorodicetamid ausgebildet wurden. Die Lösung wurde dekantiert und der kristalline Niederschlag luftgetrocknet. Danach wurde eine analoge Gewichtsmenge Silbersulfat und 5-faches Volumen *A.bidest.* zugegeben und gemischt. Nachdem nach einigen Stunden eine tiefblaue Färbung der Lösung die komplette Umwandlung zum Platinblau andeutete, wurde das 10-fache Volumen an Methanol zugegeben und die Lösung filtriert. Das Filtrat wird dann durch Zugabe von Diethylether präzipitiert. Das daraus entstandene Präzipitat des Platinblaus (MG 311) wurde durch Filtrieren und Lufttrocknung gewonnen, und bis zur Verwendung trocken gelagert.

Platinblau-Gebrauchslösung            20 mmol            in *A.bidest.*

Fixierte Chromosomenpräparate wurden 5 Minuten in Cacodylat-Puffer (RT) und 2 x 5 Minuten in *A.bidest.* gewaschen, bevor sie mit 150 µl Platinblau-Lösung überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 40 mm) versehen für 30 Minuten (RT) in einer Feuchtekammer inkubiert wurden. Nach zwei Waschschritten in *A.bidest.* für je 5 Minuten wurden die Präparate über eine Acetonreihe (20%, 40%, 60%, 80%, 100%) entwässert und anschließend am Kritischpunkt getrocknet (siehe 2.7.4.2.) und anschließend mit Kohle bedampft (siehe 2.7.9.).

#### **2.7.5. Trocknung der Präparate**

Die in Glutaraldehyd gelagerten Präparate wurden für 5 Minuten in Cacodylat-Puffer (pH 7,0) und weitere 5 Minuten in *A.bidest.* gewaschen, bevor sie über eine aufsteigende Aceton-Reihe von 20%, 40%, 60%, 80% und 100%igem Aceton für je 10 Minuten entwässert wurden. Beim Überführen der Präparate von einer Verdünnungsstufe in die nächste ist ein Abtrocknen des

Acetons unbedingt zu vermeiden. Im Anschluß wurden die Präparate entweder am Kritischpunkt (2.7.5.1.) oder über HMDS (siehe 2.7.5.2.) getrocknet.

#### **2.7.5.1. Kritischpunkt-Trockungsverfahren**

Dieses Trocknungsverfahren ermöglicht eine schonende Trocknung von biologischen Strukturen, ohne daß Oberflächenspannungseffekte auftreten.

Die in 100 % Aceton gelagerten Präparate wurden in eine mit 100 % Aceton gefüllte Druckkammer der Kritischpunkt-Trocknungsanlage (KPT) überführt. Bei dem Verfahren der Kritischpunkttrocknung wird flüssiges Aceton kontinuierlich in einer Hochdruckkammer gegen flüssiges Kohlendioxyd ausgetauscht. Dieses CO<sub>2</sub> wird nachfolgend durch Erwärmen am „Kritischpunkt“ vom flüssigen in den gasförmigen Zustand überführt. Dies geschieht bei der sogenannten „kritischen Temperatur“ von 32°C und einem Druck von 85 bar. In diesem Zustand wird der Druck durch langsames Belüften abgelassen, ohne daß Chromatinstrukturen kollabieren. Die getrockneten Präparate wurden bis zur Weiterbearbeitung in einem Exsiccator aufbewahrt.

#### **2.7.5.2. HMDS-Trocknungsverfahren**

Hexadimethyldisilazan

Merck

Die in 100%igem Aceton gelagerten Objektträger wurden sofort nach der Entnahme aus dem Aceton in Schräglage gebracht und mit etwa 3 ml HMDS-Lösung beträufelt, bis das Aceton vollständig entfernt war. Danach wurden die Objektträger in eine Petrischale gelegt, mit 1 ml HMDS überschichtet und für 5 Minuten zugedeckt inkubiert. Die Präparate wurden im Anschluss in Schräglage getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung in einem Exsiccator aufbewahrt.

#### **2.7.6. Markieren von Präparatstellen**

Um ein schnelles Auffinden ausgewählter Chromosomenstadien oder ganzer Gewebestückchen der Tanaka Bruch-Präparation im REM zu ermöglichen, wurden individuelle Stadien sowie deren relative Lage zu den Gravurstellen lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Videoprinters dokumentiert und graphisch auf Papier übertragen.

#### **2.7.7. Montage auf Probenhalter**

Leitkohlenstoff (nach Göcke)

Neubauer Chemikalien

Objektträger für SE-Analysen wurde mit Hilfe eines Diamantschneiders auf Areale von 24 x 40 mm und für BSE-Analysen auf maximal 20 x 20 mm zurechtgeschnitten, bevor sie mit einem doppelseitigen Klebeband auf Metallstubs (Eigenfabrikat) fixiert wurden. Um die Leitfähigkeit



der Präparateoberfläche zu erhöhen, wurden dünne Kontaktpunkte von der Objektträgeroberfläche zu den Stub angebracht.

### **2.7.8. Platinbesputterung**

Für hochauflösende Chromosomenstrukturanalyse wurden die Präparate mit Metallatome höherer Ordnungszahl beschichtet. Diese Besputterung verbessert die Darstellung von Objekten, da die Metallbeschichtung die Anzahl der emittierten Sekundärelektronen (SE) bei einer Anregung durch den Primärstrahl deutlich erhöht und zudem elektrostatische Aufladungen der Probe verhindert. Eine Reduzierung der Eindringtiefe der Elektronen und Verbesserung der Wärmeableitung verringert so strahlenbedingte Schäden am Präparat während des Abtasten durch den Elektronenstrahl.

Die Besputterung der getrockneten Präparate erfolgte in einem Magnetron-Besputterungsgerät. Die Präparate wurden in einer Vakuumkammer zuerst mehrmals mit Argon gespült. Nach Anlegen einer Beschleunigungsspannung von 4 kV wurden die Präparate mit einer homogenen Schicht von Platin beschichtet („besputtert“). Die Schichtdicke wurde anhand von Vergleichspräparaten kontrolliert und lag in einem Bereich von 2 bis 5 nm.

### **2.7.9. Kohlebedampfung**

Präparate mit Gold- oder Platinblau markierungen wurden zur besseren Leitfähigkeit mit Kohle bedampft. Die Probenkammer des Bedampfungsgeräts der Firma Balzer wurde evakuiert und die Kohlestäbe unter Anlegen einer hohen Spannung in der Rezipientenkammer zum Verdampfen gebracht, so daß die Präparate mit Kohlenstoff beschichtet wurden. Die Schichtdicke der Kohlekontrastierung lag im Bereich zwischen 4 und 6 nm und wurde anhand von Papierstreifen kontrolliert.

### **2.7.10. Bilddarstellung**

Die Präparate wurden an einem Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-4100) mikroskopiert. Um einen maximalen Kontrast und damit einen räumlichen Eindruck von der Präparateoberfläche zu erhalten, ist es entscheidend eine möglichst hohe Anzahl von SE-Signalen aus der Besputterungsschicht zu erhalten und dabei gleichzeitig ein Aufheizen des Präparates, wie sie durch unelastische Streuung der Elektronen entstehen kann, zu vermeiden. Die Spannung betrug 10 – 15 kV. Für die 3-D-Darstellungen wurden zwei Aufnahmen des Objektes in einem Kippwinkel von 3° aufgenommen, vor einer Übereinanderlagerung mit Fehlfarben (grün und rot) belegt und im Computer übereinandergelagert.

### **2.7.11. Bilddokumentation**

Agfapan APX 100/120 Professional (S/W-Rollfilm für REM)	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Rodinal Einmalentwickler für S/W-Filme	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Acidofix Schnellfixiersalz für S/W-Filme und -Papiere	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen

Neutol NE S/W-Papierentwickler  
Ilford Hypam: Schnellfixierbad

Agfa-Gevaert AG, Leverkusen  
Ilford limited Mobberley, England

Die Bilddaten wurden entweder auf Rollfilmen bzw. digital über das Bildaufnahme-Programm Digital Micrographs dokumentiert. Filmnegative wurden nachträglich „eingescannt“. Längen und Dickenmessungen wurden an Hand von Bildabzügen mit Hilfe eines Lineals und eines analogen Kartenmessgerätes (Kurvenmesser) vermessen.

## **2.8. Elektronenmikroskopischer Nachweis von *in situ*-Hybrisierungen (EMISH)**

Die von NARAYANSWAMI *et al.* (1989) und MARTIN *et al.* (1995) beschriebene Methode der EMISH ermöglicht einen elektronenmikroskopischen Nachweis von DNA-Sonden auf den Chromosomen. Die Markierungsnukleotide, meist Biotin-dUTP können dabei über Gold-konjugierte Antikörper bzw. Avidin-Gold als BSE-Signal nachgewiesen werden. Durch eine Übereinanderlagerung des BSE-Signals mit dem SE-Bild können einzelne Signale individuellen Chromatinstrukturen zugeordnet werden. Mehrere Faktoren sind für den Erfolg einer EMISH wichtig:

- a) hohe Markierungsdichte der DNA
- b) effizientes Detektionssystem, mit hoher Signaldichte und Spezifität
- c) Sequenz-nahe Detektion der Markierungsmoleküle
- d) geringes Signal/Hintergrundrausch-Verhältnis des BSE-Bildes
- e) gute Zugänglichkeit der DNA-Sonde zur Zielsequenz
- f) gute Konservierung der 3-dimensionalen Chromosomenstruktur und
- g) hohe Auflösung von strukturellen Details der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen.

Die Hybridisierung repetitiver DNA-Sequenzen wurden zum einen nach der von MARTIN *et al.* (1995) etablierten Methode durchgeführt, bei der das Reporter-Molekül dUTP-Biotin indirekt über ein 6-fach Antikörper-Kaskadensystem von Avidin-Cy<sup>TM</sup>3 und Gold (12 nm)-konjugiertem Antikörper nachgewiesen wurden (siehe 2.8.1.) Andererseits wurde dieser Methode ein neu etabliertes Kurzprotokoll gegenübergestellt, in der das Reportermolekül (dUTP-Biotin) über einen Avidin-Gold (10 nm) Monolayer nachgewiesen wurde. Dies ermöglicht eine direkte Signalzuordnung auf individuellen Chromatinfibrillen (siehe 2.8.2.)

### **2.8.1. EMISH mit 6-facher Antikörperkaskade (MARTIN *et al.*, 1985)**

Chromosomentropfpräparationen wurden nach dem Gefrierbruch-Verfahren hergestellt und über Nacht in 2,5% Glutaraldehyd (4°C) fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate 5 Minuten in Cadodylat-Puffer, zweimal je 5 Minuten in *A.bidest.* und einmal 5 Minuten in 2 X SSC gewaschen, bevor sie entsprechend dem Protokoll für FISH-Analysen (siehe 2.6.1.6.) mit

RNaseA und Pepsin behandelt werden. Nach der Pepsin-Behandlung wurden die Präparate 2 mal 5 Minuten in 1 x PBS, sowie 5 Minuten in 1 x PBS/MgCl<sub>2</sub> gespült, bevor die Chromosomen in 2%iger Formaldehyd-Lösung 20 Minuten (RT) fixiert wurden. Nach erneuten 2 Waschschritten für jeweils 5 Minuten in 1 x PBS-Puffer und einmal 5 Minuten in 2 x SSC wurden sie für die Hybridisierung eingesetzt.

### ***Markierung der DNA-Sonde***

Die DNA-Sonde für EMISH wurden mittels „nick“-Translation im Verhältnis 1:2 mit dUTP-Biotin zu dTTP markiert (siehe 2.6.1.3.) und über das „spin column“-Verfahren (siehe 2.6.1.4.) gereinigt.

### ***Hybridisierung***

Die markierte DNA wurde in 2,5 fachen Volumen Ethanol/Natriumacetat (20 : 1; v/v) zusammen mit 1 mg Heringssperm-DNA präzipitiert und im getrockneten Zustand wie unter 2.6.1.8. beschrieben in einem Hybridisierungsmix (50% Formamid, 2xSSC, 10% Dextransulfat, pH 7,0) in einem Verhältnis von 10 – 15 µl DNA/µl Hybridisierungslösung gelöst. Die Hybridisierungslösung wird auf das vorbehandelte, feuchte Chromosomenspreitungspräparat aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 24 mm) und Fixogum (Fa. Marabu) versiegelt. Die Denaturierung von DNA-Sonden und Chromosomen findet in einem Wasserbad bei 70°C für 4 Minuten statt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer Feuchtekammer bei 37°C.

### ***Stringente Waschschrritte***

Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt und die Objektträger je 3 x 5 min in 50% Formamid/2 x SSC und 3 x 5 min in 2 x SSC gewaschen, wobei die jeweilige Waschttemperatur in Abhängigkeit von den Stringenzbedingungen nach MEINKOTH und WAHL (siehe 2.6.1.10.) berechnet wurde.

### ***Antikörperkaskade***

4 x SSC/Tween-20	0.5 %	Tween-20 (v/v) pH 7,2
4 x SSC/Tween-20/BSA	1% 0,5%	BSA (w/v) Tween-20 (v/v) 4 x SSC, pH 7,2
1 x PBS/Tween-20	1%	BSA (w/v) 1 x PBS, pH 7,2
1 x PBS/Tween-20/Albumin	1%	Albumin (w/v) 1 x PBS, pH 7,2

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurden die Objektträger mit 100 µl Blockierlösung in 4 x SSC (pH 7,1) überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) versehen für 30 Minuten bei 37 °C in einen Wärmeschrank inkubiert. Nach dem Entfernen des Deckglases wurden die Präparate mit 100 µl Antikörperverdünnung überschichtet, die jeweils vor Gebrauch frisch in dem jeweiligen Puffer hergestellt wurde (siehe Tabelle 2). Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten in der Feuchtekammer (37°C) folgten 3 Waschschrte je 5 Minuten (42°C) in der jeweiligen Verdünnungslösung der Antikörper. Nach dem vierten Layer mit anti-Avidin-Cy<sup>TM</sup>3 wurden die Präparate 2 x in 4 x SSC/Tween-20 und sowie einmal in 1 x PBS/Tween-20 für 5 Minuten gewaschen bevor eine Inkubation mit dem Maus-Antikörper erfolgte. Nach 3 x Waschen in PBS/Tween-20 bei 42°C wurden die Objektträger mit 100 µl des anti-Maus (Ig) Gold (12 nm) über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 2 Waschschrten für je 5 Minuten in 2 x PBS bei 42°C und einem in Cacodylat-Puffer für 5 Minuten wurden die Präparate in 2%igem Glutaraldehyd über Nacht fixiert.

### 2.8.2. Kurzprotokoll mit Avidin Monolayer

Chromosomentropfpräparate wurden nach der Gefrierbruchmethode hergestellt und in 2% iger Formaldehyd-Lösung (RT) für 30 Minuten fixiert. Vor der Hybridisierung, wurde das Fixativ durch einen Waschschrte je 5 Minuten in Cacodylat-Puffer, zweimal in *A.bidest.* und einmal je 5 Minuten in 2 x SSC-Puffer (pH 7,0) entfernt. 15 µl der Hybridisierungslösung wurden auf das noch feuchte Areal aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und mit Fixogum luftdicht verschlossen (siehe 2.8.1.). Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 37°C. Nicht-gebundene DNA-Sonden werden durch stringente Waschschrte entsprechend dem Protokoll (2.6.1.10.) entfernt.

1%ige Blockierungslösung	1%	(w/v) BSA
	1%	(v/v) Tween-20
		1 x PBS, pH 7,2
Avidin-Gold (10 nm)	1 : 25 (v/v)	1 x PBS, pH 7,2

Vor dem Signalnachweis wurden die Objektträger mit 100 µl einer 1% igen BSA-Blockierungslösung überschichtet und mit einem Deckglas (24 x 60 mm) verschlossen für 30 Minuten bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden 80 µl einer 1 : 25 (v/v) Verdünnung von Avidin-Gold (10 nm) auf die Objektträger gegeben, und die Präparate mit einem Deckglas versehen für 2 Stunden in einer Feuchtekammer bei 37°C inkubiert. Überschüssiges Avidin wurde im Anschluß durch 2 Waschschrte je 5 Minuten in 1 x PBS (pH 7,2) entfernt bevor die Präparate in 2,5% Glutaraldehyd für mindestens 30 Minuten (RT) fixiert wurden.

**Tabelle 2: Immunogold-Nachweis im 1-fach- und 6-fach-Antikörper-Kaskaden-System**

Antikörper Kaskade	1. Layer (Verdünnung)	2. Layer (Verdünnung)	3. Layer (Verdünnung)	4. Layer (Verdünnung)	5. Layer (Verdünnung)	6. Layer (Verdünnung)
1-fach ohne Fluorochrom	Avidin-Gold (1 : 1000) in 4xSSC/Tw./BSA	-	-	-	-	-
1-fach mit Fluorochrom	Avidin-Gold (1 : 1000) in 4 xSSC/Tw./BSA	anti-Avidin (Maus Cy3 (1 : 40) in 4 xSSC/Tw./BSA	-	-	-	-
6-fach	Avidin- Cy <sup>TM</sup> 3* (1 : 1000) in 4 xSSC/Tw./BSA	biotinyliertes anti-Avidin (1 : 40) in 4 xSSC/Tw./BSA	Avidin- Cy <sup>TM</sup> 3* (1 : 1000) in 4 xSSC/Tw./BSA	biotinyliertes anti-Avidin (1 : 40) in 4xSSC/Tw./BSA	(Maus) IgG-anti-Biotin (1 : 1000) PBS/Tween	Anti-Maus Gold (1 : 20) in 1xPBS/Tw./Alb.

### 2.8.3. Abschätzung der Markierungsdichte des Avidin-Gold-Detektionssystem

Ein Signalnachweis biotinylierter DNA-Sonden ist sowohl von der Markierungsdichte der Reporter-moleküle, als auch von einer effizienten Erkennung und Nachweis durch Avidin-Gold im REM abhängig. Zur Abschätzung der Signaleffizienz wurden Biotin-markierte DNA-Sonden auf einer Nylonmembran gebunden mit Gold-konjugiertem Avidin nachgewiesen und die Goldpartikel im REM als BSE-Signale detektiert.

Nylonmembran

Baxter/Amersham

Die repetitive DNA-Sonde pSc119.2 wurde über Polymerase-Ketten-Reaktion im Verhältnis von 2:1 (v/v) dTTP:dUTP-Biotin markiert (siehe 2.6.1.3.) und gereinigt (siehe 2.6.1.4.). Nach kurzem Erhitzen (5 Minuten bei 85 °C) wurde die Sonde auf Eis gestellt. Jeweils 1 µl einer Verdünnung von 10 ng, 1 ng und 0,1 ng/µ DNA in *A.bidest.* wurde auf eine Nylon-Membran aufgetragen und durch Hitze-Behandlung (60°C, 20 Minuten) an die Membran gebunden. Avidin-Gold (10nm) wurde in 1 x PBS (pH 7,2), bzw. in 2 x SSC (pH 7,2) im Verhältnis 1/200 (v/v) verdünnt und zusammen mit der Membran in kleinen Inkubationsgefäßen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C folgten 3 Waschriffe für je 5 Minuten in dem jeweiligen Verdünnungspuffer bei 37°C. Die Trocknung der Membranen erfolgte über eine Acetonreihe von 20%, 40%, 60%, 80 und 100%. Die Filter wurden mit Flüssigharz (Temfix) auf dem Probenteller montiert und mit Kohle bedampft (siehe 2.7.9.). Als negative Kontrolle diente eine nicht-markierte DNA-Sonde, als positive Kontrolle eine unverdünnt aufgetragene Avidin-Gold-Lösung.

## 2.9. Geräte

Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Phasenkontrast	
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100W/	
Objektive: Plan-Neofluar, 10 x/n.A. 0,3; 40 x/n.A. 0,75, 100 x/n.A. 1,3	
Plan-Apochromat 63x/n.A. 1,4	
CCD-Kamera	Photometrics, USA
CCD-Kamera Nikon N90 Digital,	Nikon, Japan
Videoprinter: VideoCopy Processor	Mitsubishi
Kritisch-Punkt-Trocknungsapparatur POLARON VG	Microtech, Uckfield, England
Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop S-4100	Hitachi
Besputterungsgerät Sputter Coater (mit Platin-Target)	Bal-tec GmbH, Schalksmühle
Kohlebedampfungsanlage BAE080T PV951	Balzers Union, Balzers Lichtenstein

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Karyotypanalysen pflanzlicher Chromosomen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Molekulare cytogenetische Karyotypanalysen von pflanzlichen Genomen sind bislang auf die Verwendung weniger repetitiver DNA-Sonden beschränkt, die „geclustert“ als Banden auf den Chromosomen hybridisieren. Für uneingeschränkte Genom-unabhängige Analysen von heterozygoten Genomen oder für Translokationsnachweisen in Hybridlinien stehen bislang nur universelle Marker wie rRNA- und Telomer-Sequenzen zur Verfügung. Drei unterschiedliche cytogenetische Versuchsansätze wurden durchgeführt um eine schnelle Identifizierung und Isolierung neuer, informativer Karyotypisierungssonden zu ermöglichen:

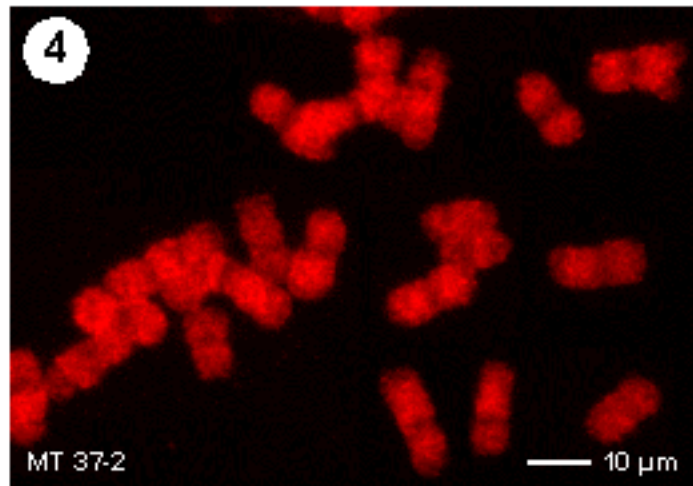
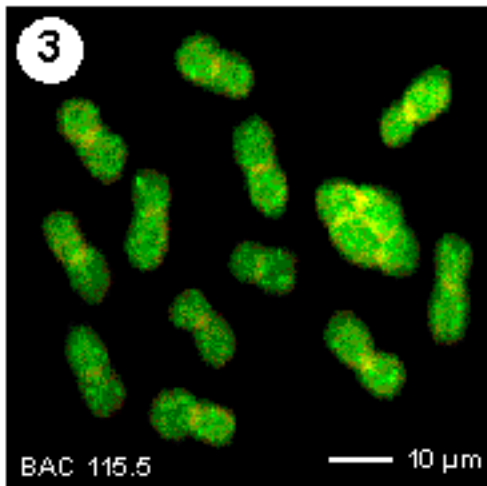
- FISH-Experimente mit komplexen genomischen Bibliotheken (BACs), die in heterologen und homologen Hybridisierungsexperimenten auf Verteilung und Vorkommen von informativen Sequenzen getestet wurden,
- FISH-Experimente mit unterschiedlichen verschiedenen Genom-spezifischen Sequenzen, die in einem heterologen System gemeinsam auf einer Weizen-Roggen-Hybridlinie getestet wurden, und
- GISH-Experimente mit DNA aus *Arabidopsis thaliana*, um konservierte Sequenz-motive, die für eine Karyotypanalyse geeignet sind, in entfernten Genotypen nachzuweisen.

##### 3.1.1. Verteilungsmuster repetitiver Sequenzen aus BAC's der Gerste

*In situ*-Hybridisierungen mit künstlichen bakteriellen Chromosomen (BACs: „bacterial artificial chromosomes“) BAC 115.5 die repetitive Sequenzen der Gerste (*Hordeum vulgare*) enthalten, zeigen nach der Detektion eine disperse Signalverteilung auf allen Chromosomen der Gerste (Abb. 3) und dem Weizen (Abbildung nicht gezeigt). Die 267 bp lange DNA-Sonde MT 37-2, die einen AT-Gehalt von 53 % (Abb. 5) aufweist, zeigt in der Gerste eine schwache Präferenz für Centromer-nahe Loci, während auf den großen Chromosomen des A und B-Genoms des Weizens überwiegend interstitielle Loci markiert werden. Eine Identifizierung einzelner Chromosomen ist nicht möglich. Konkurrenzexperimente mit fragmentierter gesamtgenomischer DNA oder C<sub>0</sub>t1-DNA-Fraktion der Gerste führten zu einer vollständigen Signalunterdrückung in beiden Genomen ohne daß einzelne Signale oder Banden nachweisbar waren.

##### 3.1.2. Translokationsnachweis in hexaploiden Triticale

Detaillierte Analysen von Umbauten zwischen den Chromosomen 1A und 1D von Triticale (Weizen-Roggen-Hybriden) mit dem Genotyp AABBRR sind auf Grund der geringen Anzahl polymorpher C-Banden von Weizen- und Roggenchromosomen beim klassischen



<b>5</b>	GAATTCTTCA	GATGGAT
	AGACGAAAGA	GGGGATG
	TCCCGGGGCA	GAGGAGA
	TGTTTGAGGA	ATTTNTC
	TTTAAGCTTG	CAACCTG
	TGCTTGGCTT	GCTGTTC
	CCACTTGGCT	TCATTGA
	AAGTGGCTCC	ATGTGGC
	TGCAGGGGAA	GTTTCAA
	TAAGCGGAGT	GTTTGGG
	CTCATACCAG	ATGTTTA
	GGAATTCCTA	TAGTGAG
	AATAATCGTA	ATATGTC
	GCTGTTC	
	MT 37-2	

**Abbildung 3 – 5: FISH-Analyse mit dem rekombinierten BAC-Klon 115.5 und repetitiven Sequenzen MT 37.2 der Gerste:**

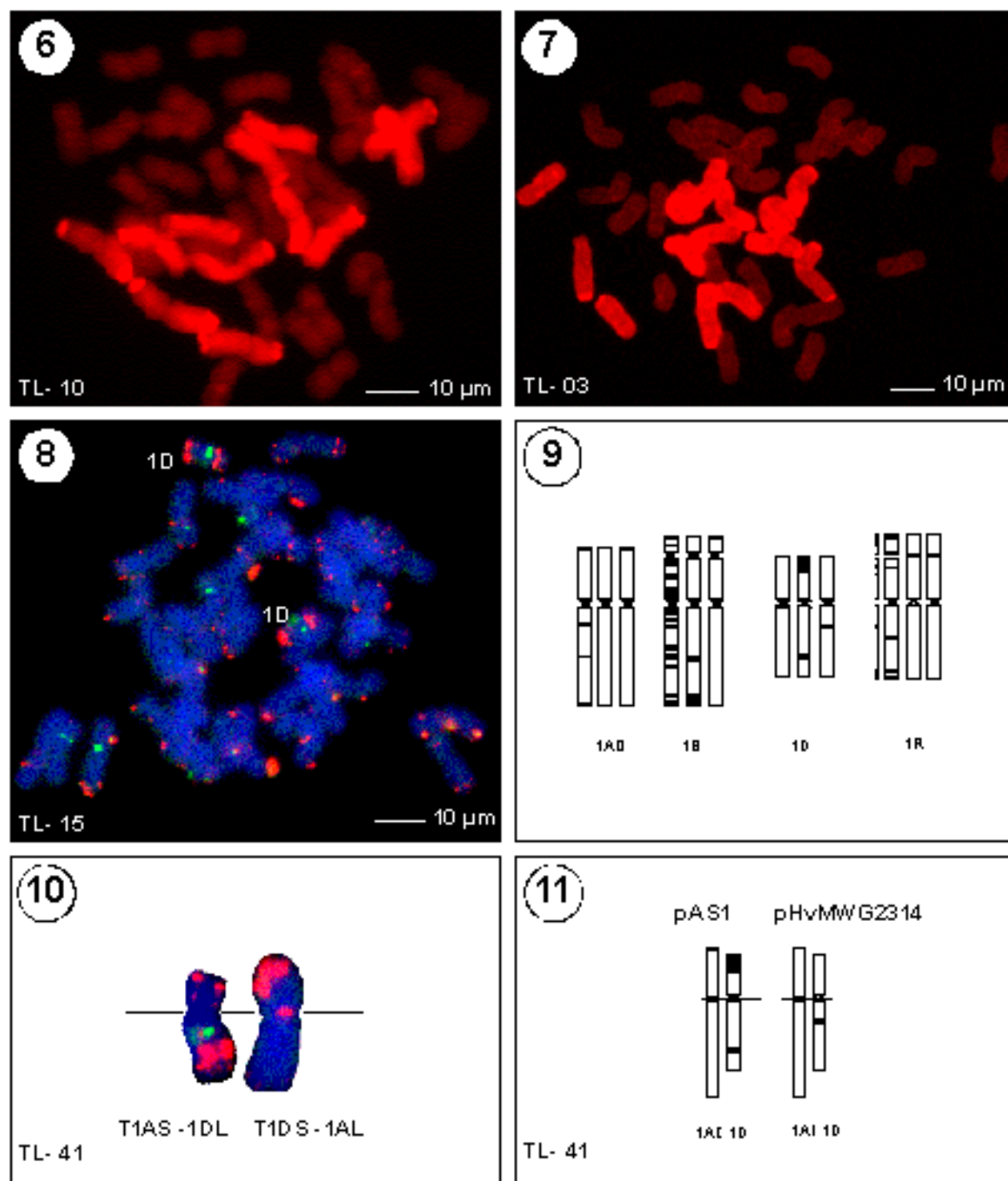
**Abbildung 3:** Disperse Signalverteilungsmuster der BAC-Sonde 115.5 (FITC\*-markiert: grüne Signale) auf Metaphase-Chromosomen der Gerste (*Hordium vulgare*).

**Abbildung 4:** Im Weizen (*Triticum aestivum*) zeigen die Chromosomen nach der Hybridisierung mit MT 37.2 (Cy3\*-markiert: rote Signale) eine disperse Markierung.

**Abbildung 5:** Sequenzanalyse der 267 Basenpaar langen, Gerstengenom amplifizierten Sequenz MT 37.2

C-Bänderungsverfahren nicht möglich. Die *Triticale*-Linien TL-10, TL-15 und TL-41 wurden daher mit Hilfe genomischer *in situ*-Hybridisierung (GISH) mit Roggen-DNA untersucht, um chromosomale Roggenkomponenten darzustellen. Zusätzlich wurden FISH-Analysen, mit repetitiven Sequenzen der DNA-Sonden pAs1 und pHvMWG2315 durchgeführt, um Translokationen innerhalb der Homoelogengruppe 1 (1A; 1B; 1D) des Weizens nachzuweisen (HOHMANN *et al.*, 1999). Dabei können nach der Hybridisierung in der Linie TL-10 nur 12 Roggenchromosomen (Abb. 6), in der TL-Linie 41 dagegen ein vollständiger Roggenchromosomensatz von 14 Chromosomen (Abb. 7) markiert werden. Die D-Genomspezifität der pAs1-DNA-Sonde ermöglicht eine Charakterisierung insbesondere der distalen Bereiche der Chromosomen 1DL und 1DS auf denen starke Signale generiert werden (Abb. 8). Nach der Hybridisierung mit pAs1 kann auf dem kurzen Arm (1AS) von





**Abbildungen 6 – 11: Genomische *in situ*-Hybridisierungen (GISH) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) in Triticale.**

**Abbildung 6:** GISH mit Roggen-DNA (Cy3\*-markiert: rotes Signal) in der Triticale TL-10 markiert einen unvollständigen Chromosomensatz von 12 Roggenchromosomen. **Abbildung 7:** GISH-Analyse mit Roggen-DNA in der Linie TL-03 markiert einen vollständigen Chromosomensatz von 14 Roggenchromosomen. **Abbildung 8:** FISH mit pAS1 und pHvMWG2314 in der Linie TL-15 weist keine Translokation zwischen den Chromosomen 1A und 1D nach. pAS1 (Cy3\*-markiert: rotes Signal), pHvMWG2314 /FITC\*-markiert: grünes Signal). **Abbildung 9:** Idiogramm der Homoeologengruppe 1 mit relevanten Markerbanden zur Charakterisierung von Chromosomenumbauten: C-Banden (linkes Chromosom), pAS1 (mittleres Chromosom und pHvMWG2314 (rechtes Chromosom). **Abbildung 10:** Translokationsnachweis zwischen den Chromosomen 1A und 1D (1AS-1DL;1DS-1AL) in der Triticale-Linie TL-41 mit pAS1 (Cy3\*-markiert: rotes Signal) und pHvMWG2314 (FITC\*-markiert: grünes Signal). **Abbildung 11:** Karyotyp der Chromosomen 1A und 1D mit pAS1 und pHvMWG2314 nach der Translokation.

ein abgeschwächtes Signal, auf dem langen Arm (1AL) kein Signal beobachtet werden. Die Satelliten DNA-Sonde pHvMWG 2315 aus der Gerste hybridisiert auf der proximalen Region des langen Arms des Chromosoms 1D (Abb. 8 und 9). Auf Grund dieses Hybridisierungsmusters ist ein Nachweis von Rekombination zwischen den Chromosomen 1A und 1D möglich. In der *Triticale* TL-15 kann so nach einer Doppelhybridisierung eine reziproke Translokation zwischen dem äußerst distalen Bereich des Chromosomenarms 1AS und dem Chromosomenarm 1DS nachgewiesen werden (Abb. 8 und 9). Zusätzlich markierte die genomische Roggen-DNA einen vollständiger Chromosomensatz des Roggens (Abbildung nicht gezeigt). In der *Triticale*-Linie TL-10 und TL-03 konnte mit Hilfe der GISH-Analyse eine Weizen-Roggen-Translokation nachgewiesen werden, die jedoch auf Grund fehlender molekularer, zytogenetischer Marker nicht weiter analysiert werden konnte. Die Ergebnisse der cytogenetischen Untersuchungen wurden zusätzlich durch RFLP- und Proteinanalysen bestätigt (HOHMANN *et al.*, 1999).

### **3.2. Vergleichende Genomische-*in situ*-Hybridisierung (cGISH.*Ara*) mit *Arabidopsis thaliana* in mono- und dicotylen Pflanzen**

Gesamtgenomische DNA von *Arabidopsis thaliana* wurde aus Blatt- und Blütengewebe isoliert und über eine „nick“-Ttranslation in einem Markierungsverhältnis von 1:2 (dUTP-Biotin: dTTP) markiert, um eine optimale Markierungseffizienz zu erhalten. Die mittlere Fragmentlänge der DNA-Sonde betrug 100 – 300 Bp. Vergleichende *in situ*-Hybridisierungen mit markierter gesamtgenomischer *Arabidopsis* DNA (c.GISH.*Ara*) wurden mit verschiedenen großen Chromosomen unterschiedlicher mono- und dicotyler Pflanzen durchgeführt. Nach 2 – 7 Tagen Hybridisierungsdauer können die Signale ohne weitere Verstärkung nachgewiesen werden. Unter Bedingungen niedriger Stringenz zeigt sich auf allen Chromosomen eine charakteristische Anzahl von Haupt- und Nebensignalen ohne unspezifischen Signalhintergrund. Bei einer Detektion unter hoher Stringenz (mehr als 80%) wird die Anzahl der Signale sowie deren -intensität deutlich reduziert. Bei allen untersuchten Spezies korreliert das stärkste Hybridisierungssignal mit der Nukleolus-organisierenden-Region (NOR) und ermöglicht dadurch eine Identifizierung der Satellitenpaare. Zusätzlich können meist interstitielle Signale und/oder Markierungen an den Telomeren nachgewiesen werden. Einige dieser Signale repräsentieren rDNA, 5S rDNA und Satelliten-DNAs, während andere Signale auf bislang unbekannt Positionen hybridisieren.

#### **3.2.1. Hybridisierungskinetik und Konkurrenzexperimente mit *C<sub>0</sub>t1*-DNA- und rDNA-Sequenzen**

Bei einer Verkürzung der Hybridisierungsdauer auf einen Tag oder Waschschritten bei hoher Stringenz (80 – 100%) nimmt die Signalintensität deutlich ab, so daß nur noch starke Signale nachweisbar waren. Dies zeigt, daß die hybridisierenden Sequenzen einen deutlich geringeren Homologiegrad im Vergleich zum untersuchten Genom aufweisen. Konkurrenzen mit *C<sub>0</sub>t1*-

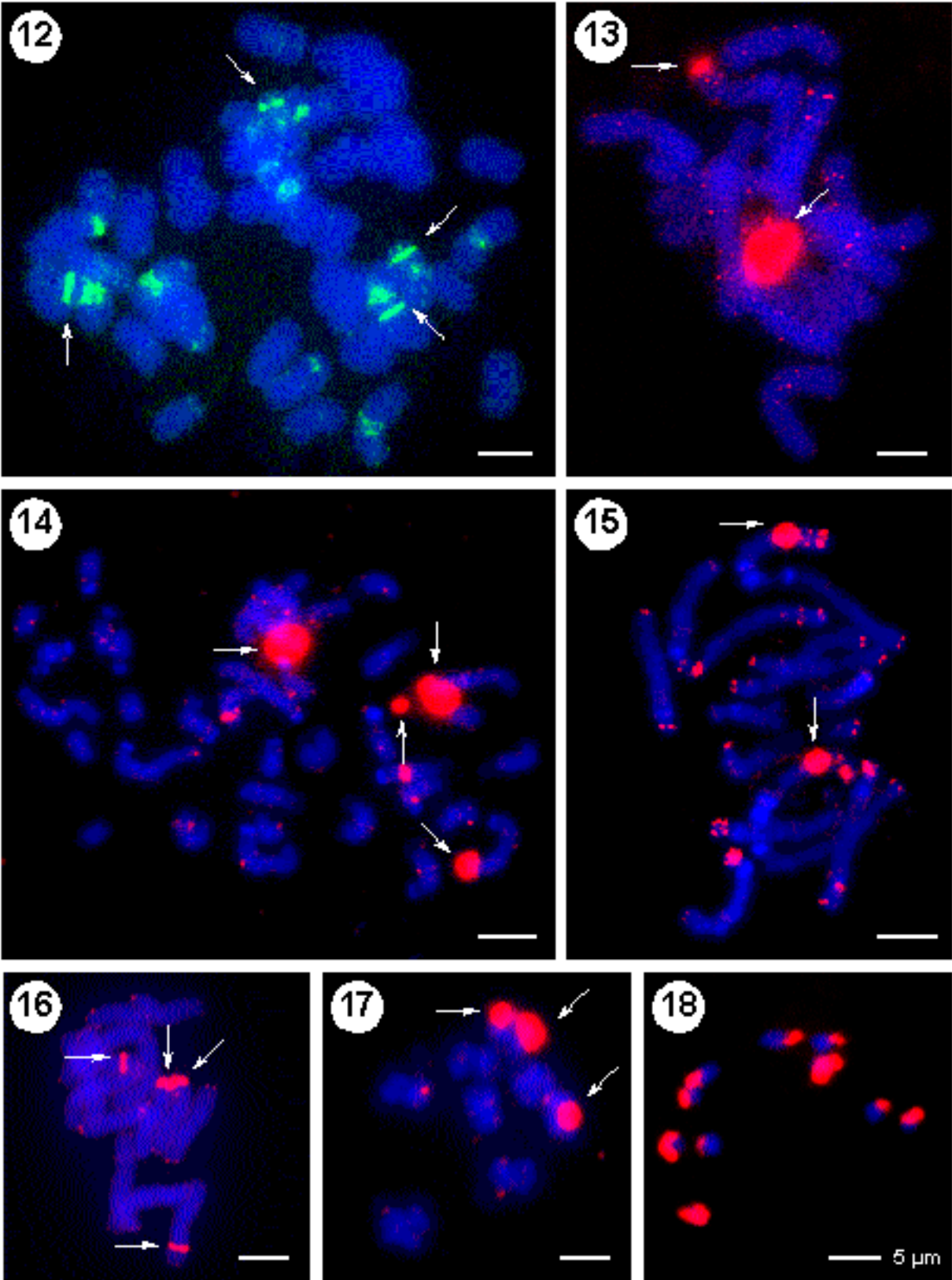
DNA, die zur Blockierung eingesetzt werden, können ebenfalls die meisten Signale im CISS-Experiment (Kompetitions-*in situ*-Hybridisierung) unterdrücken, so daß nur noch die Hauptsignale der NOR nachweisbar sind. Konkurrenzexperimente mit unmarkierter DNA-Sonde pTa 71, einer 18S–5,8S–25S rRNA Sequenzwiederholung aus dem Weizen, führt zu einer Signalunterdrückung aller Hauptsignale an den NOR-Regionen, wobei nur noch vereinzelt schwache Signale an den Satelliten auftreten. Dies zeigt, daß Sequenzen der cGISH-*Ara*-Sonde hauptsächlich repetitiven Ursprungs sind und vorwiegend rDNA, sowie weitere konservierte, unbekannte Sequenzen enthalten.

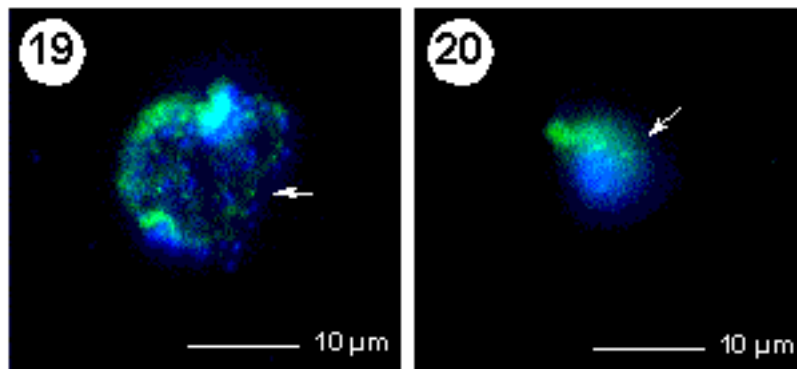
Bei der Auswertung der Signale der cGISH-*Ara* Sonde zeigt sich in den unterschiedlichen Genomen folgendes Verteilungsmuster: Im Weizen (*Triticum aestivum* L.) können insgesamt mehr als 60 Signale unterschiedlicher Signalintensität und Frequenz beobachtet werden, die auf den A und B Chromosomen meist proximal angeordnet sind. Dabei zeigen 4 Chromosomen eine starke Markierung an den NOR-Regionen, sowie weitere 14 Chromosomen ein Signalbandenmuster, das dem C- und N-Bandenmuster des B-Genoms ähnelt (Abb. 12). Die A- und D-Genom Chromosomen des Weizens weisen überwiegend schwache interstitielle und distale Signale auf. Insgesamt können bei 21 Chromosomenpaaren schwache Markierungen an den Telomeren beobachtet werden, die jedoch in Abbildung 10 kaum zu erkennen sind. Bei der Lilie (*Lilium longiflorum*), die eines der größten pflanzlichen Genome besitzt, lassen sich 12 Signale nachweisen. Drei Chromosomenpaare zeigen dominante Markierungen in den NOR-Regionen, bei 4 weiteren Chromosomenpaaren können 8 weniger starke Signale interstitiell beobachtet werden (Abbildung nicht gezeigt). Alle Chromosomen zeigen Markierungen im subtelomeren und Telomerbereichen (Abbildung nicht gezeigt). In der Zwiebel (*Allium cepa*) werden die NORs von 2 Chromosomenpaaren markiert, wobei jeweils ein Hauptsignal und ein kleinerer Locus nachweisbar sind (Abb. 13). Die meisten der 38 Signale markieren interstitielle Bereiche. An den Telomeren treten keine Signale auf. Bei den verschieden großen, teils akro zentrischen Chromosomen der Traubenhyazinthe (*Muscari armenaticum*) können 6 starke Signale der NOR-Regionen unterschieden werden (Abb. 14). Weitere 30 Signale unterschiedlicher Intensität markieren interstitielle und perizentrische Positionen. Die Telomere blieben unmarkiert.

---

**Abbildungen 12 - 18: *In situ*-Hybridisierung mit gesamtgenomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* (cGISH-*Ara*), auf mitotische Chromosomen aus Wurzelspitzen von (12) *Triticum aestivum*, (13) *Allium cepa*, (14) *Muscari armenaticum*, (15) *Vicia faba*, (16) *Agropyron elongatum* und meiotische Chromosomen von (17) *Beta vulgaris* und (18) *Arabidopsis thaliana*.**

Die *Arabidopsis* DNA wurde mit Digoxigenin-11-dUTP oder Biotin-16-dUTP markiert und mit anti-Digoxigenin-FITC (grünes Signal) bzw. Cy3-konjugiertem Avidin (rotes Signal) nachgewiesen. Die Chromosomen sind mit DAPI (blau) gegen gefärbt. Die stärksten Hybridisierungssignale stammen von der Nukleolus organisierenden Region (NOR) (siehe Pfeile). Durch die Überbelichtung der starken NOR-Signale können die kleineren Signale kaum wahrgenommen werden. In *Arabidopsis* können die NOR nicht deutlich unterschieden werden.





**Abbildungen 19 und 20:** Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* cGISH. *Ara* (FITC\*-markiert: grünes Signal) auf Interphasestadien von *Rhodella violacea* (Abb. 19; Peil) und der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Abb. 20; Pfeil). (Gegenfärbung mit DAPI, blaue Markierung)

Die Hybridisierung mit der Saubohne (*Vicia faba*) ergibt insgesamt 36 Signale, wobei 10 der 14 Chromosomen Signale im distalen Bereich der beiden Arme aufweisen (Abb. 15). Nur 4 Chromosomen zeigen auf nur einem Arm eine Markierung. Die zwei Hauptsignale korrespondieren mit dem Satelliten-tragenden Chromosom 1 von *Vicia faba*. Von den restlichen 32 Signalen sind 6 von stärkerer Intensität. Dabei zeigt sich auch, daß heterochromatische, subtelomere Bereiche, die DAPI-positiv sind, mit der *Arabidopsis*-Sonde nicht hybridisieren. In *Agropyron elongatum* weisen alle 4 NOR-Regionen sowie alle 14 Telomere Fluoreszenzsignale auf (Abb. 16). Zwei der 14 Chromosomen tragen zusätzlich subterminale Signale. Interstitielle Signale treten nicht auf. In der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) können insgesamt mehr als 18 Signale beobachtet werden, wovon 12 Hybridisierungsorte interstitiell lokalisiert sind. Die Telomere weisen nur sehr schwache Signale auf (Abb. 17). Die Hybridisierungscharakteristik und Qualität der verwendeten cGISH. *Ara*-Sonde wurde an meiotischen Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* getestet. Dabei zeigt sich im Anaphase I-Stadium, daß zwei der 10 *Arabidopsis* Chromosomen vollständig und 8 Chromosomen nur teilweise markiert werden (Abb. 18). In vergleichenden cGISH. *Ara* Analysen an Interphase-kernen von niederen Eukaryonten wie der Rotalge (*Rhodella violacea*) (Abb. 19) und der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Abb. 20) können jeweils 2 größere Signale, die mit den NOR-Regionen korrespondieren, sowie einige kleinere, schwache Fluoreszenzsignale erzeugen.

### 3.2.2. cGISH. *Ara* in Roggen und Gerste

Hybridisierungen von cGISH. *Ara* mit Roggen (*Secale cereale*) (Abb. 21 – 24) und mit Gerste (*Hordeum vulgare*) (Abb. 25 und 26) zeigen, daß eine Unterscheidung aller 14 Chromosomen und deren Chromosomenarme möglich ist. Zur Auswertung wurde die Signalhäufigkeit und -intensität in 3 Kategorien unterteilt: (i) Regionen mit einer Signalhäufigkeit von mehr als 50% und der höchsten Signalintensität, (ii) Signale mit gleich hoher Frequenz aber geringerer Intensität und (iii) Regionen mit einer Signalhäufigkeit zwischen 30 und 50% (Abbildungen 27). Die stärksten Signale können erwartungsgemäß in der NOR-Region (26S–5.8S–18S rDNA) beobachtet werden sowie an den Genorten der 5S rDNA und 5S rDNA-„spacer“-Region. Insgesamt werden im Roggen 56 (Abb. 27a) und in der Gerste 61 (Abb. 27b) unterschiedliche

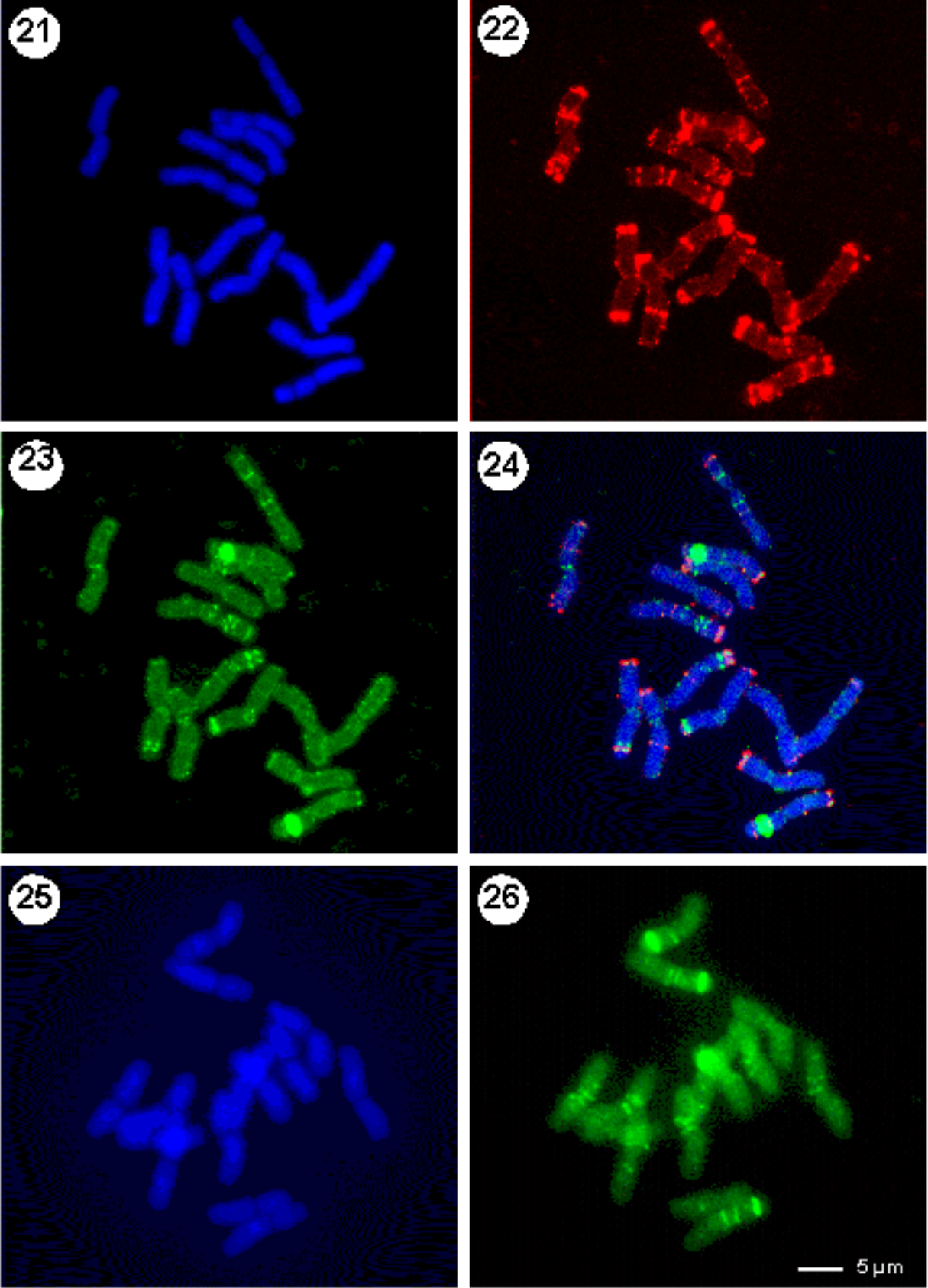
Hybridisierungssignale nachgewiesen, die mit einer Häufigkeit von mehr als 30% auftreten. Dies entspricht einem Vorkommen von mindestens 4 Signalen pro Chromosomenarm, wobei das Hybridisierungsmuster spezifisch für die Chromosomenarme ist. In Kombination mit der Roggen-spezifischen repetitiven Sonde pSc119.2 kann so eine Feinkartierung im Roggen mit mehr als 100 Signalen erzielt werden.

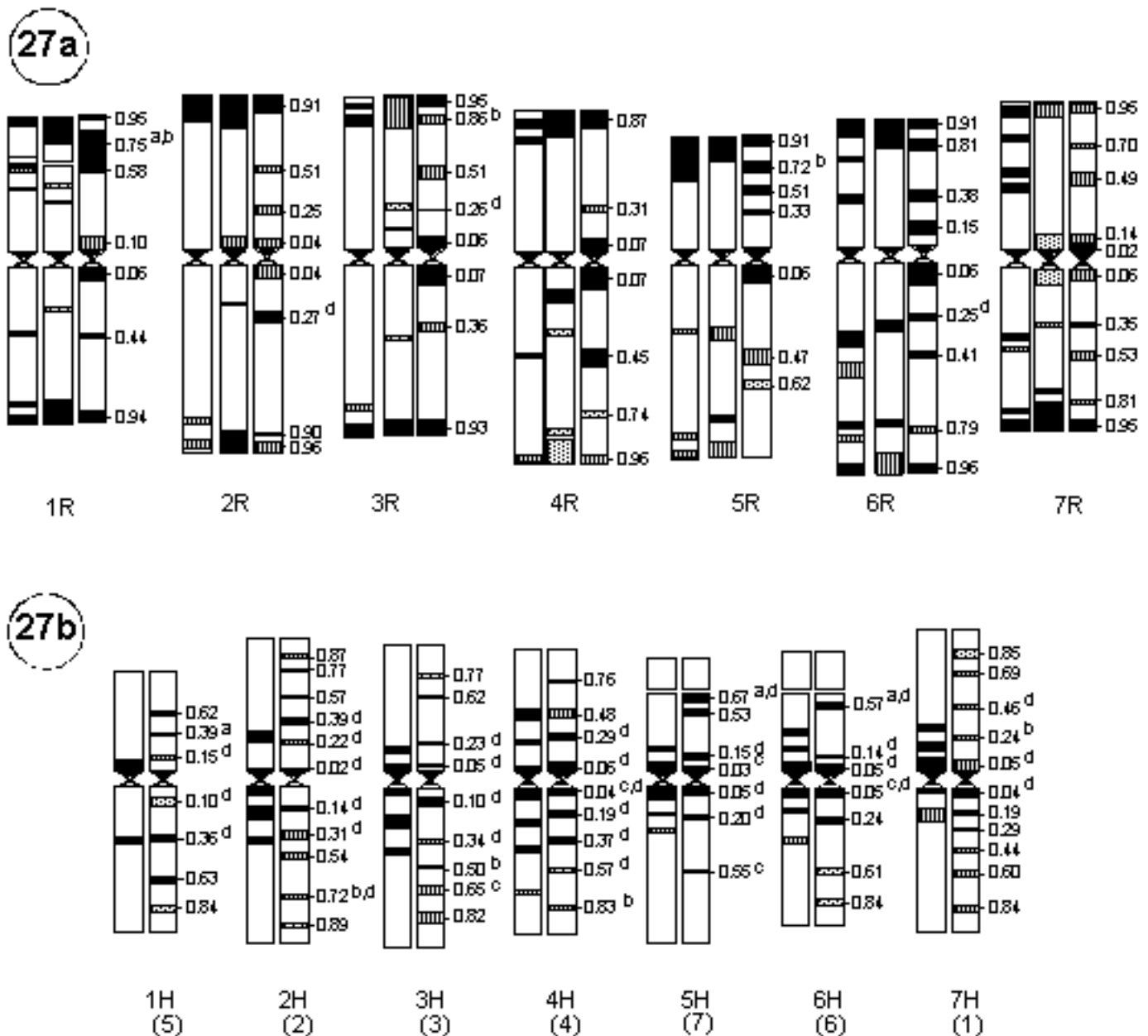
Im Roggen können mit Ausnahme des Chromosomenarms 5RL alle Telomerregionen und proximalen Bereiche, einschließlich der zwei kurzen Arme der submetazentrischen Chromosomen 5R und 6R markiert werden. Interstitielle Signale treten beinahe an gleichen Positionen auf und unterteilen die Chromosomenarme auf 25%, 30% oder 50% der Länge. Die interstitiellen Signale können oft mit unterschiedlicher Intensität oder Häufigkeit, manchmal sogar auf nur einem der Homologen identifiziert werden. Im Detail werden folgende Hybridisierungsorte im Roggen nachgewiesen: Auf dem submetazentrischen Chromosom 1, dem kleinsten der Roggenchromosomen, können insgesamt 7 Signale erzeugt werden, wobei das stärkste Signal am Satelliten auftritt. Diese Region enthält die Hauptfraktionen der rRNA-Gene, die 26S–5,8S–18S rDNA sowie den 5S rDNA-Genort. Zusätzlich werden auf beiden Telomeren weitere Signale sowie je ein interstitielles Signal auf jedem Chromosomenarm identifiziert. Auf Chromosom 2R, dem größten meta- bis submetazentrischen Chromosom des Roggens, können distal gelegene Signale auf dem kurzen und langen Arm beobachtet werden. Die auf dem langen Arm gelegenen Signale weisen eine für das Chromosom 2 charakteristische geringere Signalintensität auf. Die Chromosomen 2R und 3R zeigen jeweils 8 Signale. Das submetazentrische Chromosom 3R trägt das stärkste Signal im Telomerbereich des langen Arms. Auf dem kurzen Arm können 2 Signale unterschieden werden, wobei das proximal an der Position 0,86 gelegene Signal mit einer geringeren Häufigkeit auftritt und mit dem Genlokus der 5S rDNA korreliert. Dieser Signalort ist ein wichtiges Unterscheidungskriterium für die gleich großen Chromosomen 3R und 2R, die ein etwa gleiches Armlängenverhältnis besitzen. Chromosom 4, das submetazentrisch ist, besitzt insgesamt 7 Signale. Mit Ausnahme der Telomer- und Centromer-nahen Signale, die auf jedem Arm zu finden sind, können 3 interstitielle Banden auf dem kurzen Arm differenziert werden. Das Hybridisierungssignal an Position 0,72 des kurzen Arms entspricht dem Genort der 5S rDNA.

---

**Abbildung 21 - 26:** *In situ*-Hybridisierung mit gesamtgenomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* (cGISH.Ara), auf mitotische Chromosomen aus Wurzelspitzen von *Secale cereale* und *Hordeum vulgare*:

**Abbildung 21:** DAPI-Kontrastierung der Chromosomen von *Secale cereale* ( $2n = 14$ ). **Abbildung 22:** identischer Chromosomensatz wie in Abb. 21 nach Hybridisierung mit Roggen-spezifischer, repetitiver Sequenzen der Sonde pSc119.2 (rotes Signal). **Abbildung 23:** identischer Chromosomensatz wie in Abb. 21 nach Markierung (cGISH.Ara) (grünes Signal). **Abbildung 24:** Übereinanderlagerung von Abb. 22, 23 und 24. Die Signalbanden der roten (pSc119.2) und grünen Signale (cGISH.Ara) markieren alternierend die Chromosomen. An einigen wenigen Stellen findet eine Übereinanderlagerung beider Sonden statt (weißes Signal). **Abbildung 25:** DAPI-Kontrastierung der Chromosomen von *Hordeum vulgare* ( $2n = 14$ ). **Abbildung 26:** identischer Chromosomensatz wie in Abb. 25 nach Markierung mit cGISH.Ara (grünes Signal).





**Abbildungen 27: Idiogramm von *Secale cereale* (a) und *Hordeum vulgare* (b):**

**Abbildung 27a:** Die Signalbanden der C-Banden (links), cGISH mit gesamtgenomischer DNA von *Arabidopsis* (mitte) und pSc119.2 (rechts) des Roggens sind gegenübergestellt;

**Abbildung 27b:** Darstellung der C-Banden (links) und cGISH *Ara*-Signalbanden der Gerste.

Die Signalverteilung wurde in Regionen mit Hauptsignalen und einer Häufigkeit von mehr als 50 % (schwarz), kleinere Signale mit Häufigkeiten von mehr als 50 % (schraffiert) und Signale mit einer Häufigkeit zwischen 30 und 50 % (grau) unterteilt. Die Messungen der Fraktionarmlängen (FL) sind rechts daneben angegeben. Die cGISH Signale entsprechen den Klustern der 28S rDNA (a), 5S rDNA Gerste (b), 5S rDNA Spacer-Gerste (c) sowie N-Banden (d). Die C-Banden Signale wurden nach der gleichen Methode ausgewertet, wobei die Zeichnung und Signalfrequenz hier auf die Häufigkeit der Signale als auf die Intensität bezogen ist.



Der lange Arm zeigt keine distalen Marker. Terminale Signale sowie eine Serie von je 3 interstitiellen Signalbanden auf jedem Arm, kennzeichnen das submetazentrische Chromosom 6. Auf Chromosom 7R, das beinahe metazentrisch ist, können Telomersignale sowie 5 Banden auf jedem Arm unterschieden werden. Für Chromosom 7R sind die verschiedenen Signale in der distalen Chromosomenhälfte beider Arme sowie starke Hybridisierungsbanden an den Telomeren charakteristisch.

Im Gegensatz zu Hybridisierungen im Roggen können mit der cGISH.*Ara*-Sonde auf den Chromosomen der Gerste überwiegend Signale im proximalen und nur wenige Signale in distalen Bereichen nachgewiesen werden. Telomersignale treten nicht auf. Das kleinste Gerstenchromosom 1H zeigt 7 Signale, von denen zwei größere, interstitielle Hybridisierungsorte auf beiden Armen liegen. Das Signal in Position 0,39 entspricht einem kleineren Genort der 28S, 5,8S und 18S rDNA. Alle anderen Signale weisen eine geringere Signalintensität auf. Chromosom 2H, das längste der Gerstenchromosomen, zeigt nach der Hybridisierung 11 Signale. Bis zu drei starke Signalbanden können in der Zentromerregion beobachtet werden, davon zwei auf dem kurzen und ein Signal auf dem langen Arm. Die übrigen Signale sind schwächer und werden weniger häufig beobachtet. Das starke Signal auf dem langen Arm in Position 0,72 entspricht dem 5S rDNA-Genort. Das submetazentrische Chromosom 3H zeigt 9 Hybridisierungssignale. Die Signalintensität ist bei den proximalen Signalen am größten. Die distalen Signale zeigen dagegen eine geringere Signalintensität. Die Positionen der Signale des langen Arms stimmen mit denen des 5S rDNA Genortes an der Position 0,50, sowie des 5S rDNA-„spacer“, der an Position 0,82 kartiert. Bei dem ebenfalls submetazentrischen Chromosom 4H können 9 Signale beobachtet werden, davon 4 Signale auf dem kurzen und 5 auf dem langen Arm. Die proximalen Signale an den Positionen 0,04, 0,19 und 0,37 auf 4HL sind wichtige Marker für eine Identifizierung und Unterscheidung der Chromosomen 2H und 3H, die ein gleiches Armlängenverhältnis aufweisen. Das Signal des langen Arms an Position 0,83 stimmt mit der Position des 5S rDNA Genortes überein. Das Chromosom 5H, das einen Satelliten trägt, kann anhand von zwei Doppelsignalen identifiziert werden. Ein Signal liegt benachbart vom Zentromer, daß andere kartiert auf dem Satelliten. Charakteristisch für den langen Arm ist ein Signal an Position 0,55 und kein Signal im subtelomeren Bereich. Diese Eigenschaft, sowie die geringe Anzahl von nur 7 Hybridisierungspositionen sind die auffälligsten Charakteristiken von 5H. Die Signale in Position 0,03 des kurzen Arms und 0,55 des langen Arms entsprechen der Genposition des 5S rDNA-„spacer“. Das Chromosom 6H ist ein submetazentrisches Satelliten-Chromosom. Es weist 7 Hybridisierungsorte auf, von denen drei mit einer Signalhäufigkeit von kleiner als 50% auftreten. Das Bandenmuster ist dem von 5H sehr ähnlich, jedoch besitzt dieses Chromosom einen größeren Satelliten sowie ein Signal, das proximal zum Satelliten auftritt. Der lange Arm zeigt ein Signal in der subtelomeren Region. Die Hybridisierungssignale in der proximalen Armregion korrelieren mit der Position der 5S rDNA-„spacer“-Region. Das Chromosom 7H zeigt insgesamt 11 Signale, davon 2 Hauptsignale auf dem langen Arm 7 HL, die an den

Positionen 0,04 und 0,19 Centromer-nah gelegen sind. Die interstitiellen Signale des kurzen und langen Arms werden mit einer geringeren Häufigkeit beobachtet und sind daher charakteristisch für die Identifizierung von 7 H. Das Signal 0,24 im kurzen Arm korrespondiert mit dem des 5S rDNA-Genortes.

### **3.2.3. Vergleichende Analyse von cGISH.Ara mit C-Banden**

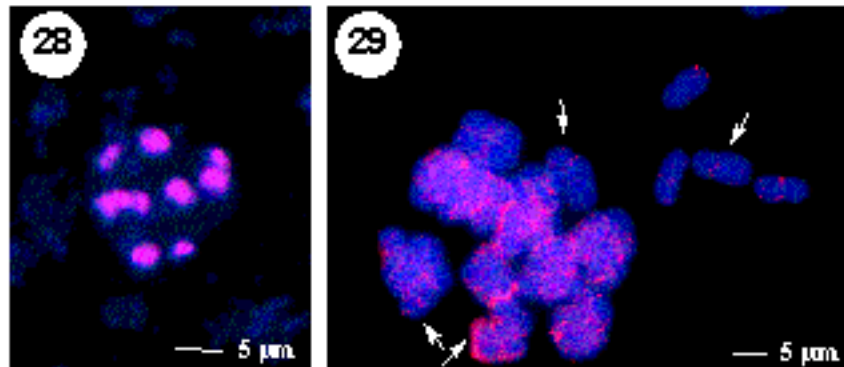
Die Signale der cGISH.Ara-Sonde zeigen eine Genom-spezifische Verteilung auf den Chromosomen. Dieses Bandenmuster korreliert teilweise mit dem Verteilungsmuster des konstitutiven Heterochromatins das mit der klassischen C-Bandentechnik nachgewiesen wird. Die C-Banden liegen beim Roggen bevorzugt in der Telomerregion, in der Gerste dagegen proximal zum Centromer. Von den 34 C-Banden, die im Roggen der Sorte „Sorom“ nachweisbar sind, stimmen 16 Banden mit den Hybridisierungssignalen von cGISH.Ara überein. Davon sind 13 Signale an den Telomeren und nur drei Signale in den Centromer-nahen Bereichen der Chromosom 2R und 7R nachweisbar. Die verbliebenen Markierungen stammen von interstitiellen Signalen, die alternierend zu den C-Banden auftreten. In der Gerste können 33 C-Banden detektiert werden, die bevorzugt an Centromer nahen Positionen auftreten. Die 61 cGISH.Ara-Banden zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster in der Gerste, wobei jedoch ein Großteil nicht eindeutig mit den C-Banden korreliert und eine alternierenden Anordnung zu den im Roggen generierbaren Signalen aufweist: der Hauptteil dieser Gerstensignale liegt interstitiell und an distalen Bereichen in denen keine C-Banden erzeugt werden können.

### **3.2.4. FISH-Analyse mit der repetitiven Sequenz pAR21 aus *Arabidopsis thaliana***

Der über „nick“-Translation markierte Klon pAR21 aus *Arabidopsis thaliana* zeigt nach der Hybridisierung auf meiotischen Metaphasestadien von *A. thaliana* eine disperse Signalverteilung auf allen Chromosomen, einschließlich der Centromerregion.(Abb. 28) Vergleichende Hybridisierungen auf Metaphase-Chromosomen der *Triticale*-Linie TL-41 können nach einer mehrtägigen Hybridisierungsdauer und Waschbedingungen mit niedriger Stringenz einzelne distinkte Signale meist auf interstitiellen Bereichen der Chromosomen nachweisen. Signalbanden treten nicht auf (Abb. 29).

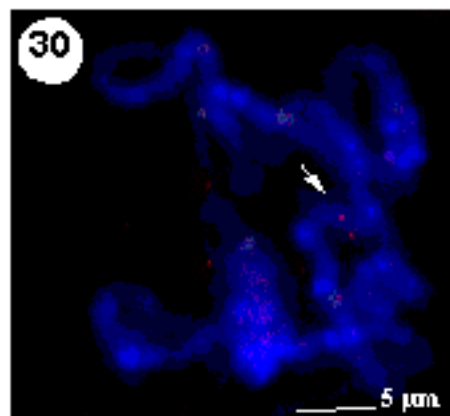
## **3.3. In situ-Nachweis der Einzelgensequenz cTpA**

Die 1600 bp lange Sequenz cTpA1 (OEHLMÜLLER, persönliche Mitteilung), die eine Endopeptidase aus Spinat kodiert, wurde über „nick“-Ttranslation“ markiert und auf Metaphase-Chromosomen aus Wurzelspitzenchromosomen der Gerste, des Roggens, sowie auf meiotischen (Pachytän) Chromosomen des Roggens und der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) hybridisiert. Nach der Detektion, die unter niedriger Stringenz und mit Hilfe einer 3-fach Kaskade von Fluorchrom-



**Abbildung 28 - 29 : Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) mit repetitiven Sequenzen der Sonde pAR21:**

**Abbildung 28:** FISH-Analyse mit pAR21 (Cy3\*-markiert: rote Signale) auf Metaphase-Chromosomen von *Arabidopsis thaliana*. Die Chromosomen sind vollständig markiert. **Abbildung 29:** FISH-Nachweis von pAR21 (Cy3\*-markiert: rote Signale) in der Triticale-Linie TL-12. Die Signale können ohne Signalverstärkung in distalen Bereichen (siehe Pfeile) nachgewiesen werden. (Gegenfärbung mit DAPI: blaue Markierung).



**Abbildung 30:** Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) von *ctpA1* (Cy3\*-markiert: rote Signale siehe Pfeil) auf Pachytän-Chromosomen der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*). (Gegenfärbung mit DAPI: blaue Markierung).

gekoppelten Antikörpern erfolgte, konnten keine bzw. nur unspezifische Signale auf den mitotischen und meiotischen Chromosomen des Roggens und der Gerste nachgewiesen werden. Konkurrenzexperimente mit C<sub>0</sub>t1-DNA Fraktionen oder unmarkierter gesamtgenomischer DNA führen zu einer Unterdrückung aller Signale. Im Gegensatz dazu wurden bei Hybridisierungen auf Pachytänstadien der Zuckerrüben-Chromosomen (*Beta vulgaris*) zwei distinkte Signale auf einem Chromosomenpaar nachgewiesen (Abb. 30). Die Signaleffizienz liegt mit etwa 20 % deutlich unter der Hybridisierungseffizienz, die mit repetitiven Sequenzen erzielt wird. In kondensierteren meiotischen Stadien der Zuckerrübe (Diakinese bis Anaphase) konnten keine Signale beobachtet werden.

### 3.4. Mitose- und Meiose-Zyklen des Roggen (*Secale cereale*) im Licht- (LM) und Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Mitose- und Meiose-Zyklen des Roggens (*Secale cereale*:  $2n = 14$ ) wurden anhand von mehr als 350 Chromosomenspreitungen im Licht- (LM) und Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht und miteinander verglichen. Auf Grund des höheren Auflösungsvermögens zeigen Analysen im Rasterelektronenmikroskop schon bei geringer Vergrößerung deutliche Vorteile gegenüber der Lichtmikroskopie. Sie ermöglichen

- die Untersuchung der strukturellen Qualität und Integrität von chromosomalen Strukturen,
- den Nachweis, welche der strukturellen Elemente „oben“ oder „unten“ liegen,
- die Unterscheidung, was Chromatinbestandteil ist oder ob es sich um Kerntümmer handelt,
- die Darstellung von Chromatin ohne Unterscheidung von DNA und Proteinen und
- Messungen der Chromosomendurchmesser und -längen sogar in Prophasestadien.

Die Tropfpräparationstechnik, die für Strukturanalysen pflanzlicher mitotischer Chromosomen etabliert wurde (MARTIN *et al.*, 1994) erweist sich nach kleineren Modifikationen gleichfalls geeignet, um Chromosomen von Meiose I- und II-Stadien aus Pollenmutterzellen (PMZ) zu isolieren. In Kombination mit der Gefrierbruchtechnik können chromosomale Strukturen dreidimensional gut erhalten werden, ohne daß störende zytoplasmatische Schichten auftreten. Die etwa 10 µm langen Chromosomen des Roggens erwiesen sich für Untersuchungen im REM als besonders gut geeignet, da bei einer durchschnittlichen Bespatterungsschicht von 2 – 4 nm während der Betrachtung kaum größere Aufladungen zu verzeichnen waren. Die Darstellung im REM ermöglicht Einblicke in den strukturellen Aufbau bis zur maximalen, technischen Auflösungsgrenze von 2 bis 4 nm. Im Gegensatz zu Ethanol-Eisessig (3:1; v/v) fixierten Zellen können Nukleoli und Elemente des Spindelfaserapparates nach der enzymatischen Verdauung mit Cellulase-Pectolyase nicht mehr nachgewiesen werden. Die Verwendung von Laser-gravierten Markierungsobjektträgern erlauben einen Vergleich individueller Stadien im LM und REM. Dabei zeigt ein direkter Vergleich identischer Stadien, daß durch den Dehydrierungsprozess bei der Probenvorbereitung für das REM kaum Schrumpfungartefakte auftreten (Abb. 31 und 43; 34 und 46; 35 und 47; 39 und 51; 40 und 52; sowie 41 und 53).

#### 3.4.1. Mitose-Zyklus des Roggens im Lichtmikroskop (LM)

Im Phasenkontrast sind Inter- und Prophasestadien der Chromosomen als graue Strukturen erkennbar, die mit Zunahme des Kondensationsstatus in der Metaphase bis zur Telophase kontrastreicher erscheinen. Heterochromatische Regionen können ausschließlich in gering kondensierten Stadien der Interphase und frühen Prophase sowie nach der Dekondensation in der Telophase als dunkle, heterochromatische Bereiche von den helleren, euchromatischen Regionen unterschieden werden (Abb. 31 und 32). Die Segmentierung der Chromosomen nimmt mit der Zunahme der Kondensation ab. Die Spreitung mitotischer und meiotischer Chromosomen

verbessert sich im Verlauf der Chromosomenkondensation bis zur Metaphase und nimmt in der Anaphase erneut ab.

### ***Interphase***

Interphasen zeigen charakteristische granuläre Segmentierungen von (dunklen) heterochromatischen und (hellen) euchromatischen Bereichen (Abb. 31). Mehrere globuläre Heterochromatinbereiche treten polar an der Kernperipherie auf.

### ***Prophase***

Mit Beginn der Prophase werden erstmals dünne, fädige Chromosomen sichtbar, die leicht wellig im Kern angeordnet sind (Abb. 32). Mit Zunahme der Kondensation zeichnet sich früh eine parallele Ausrichtung der Chromosomenarme ab (Abb. 33), wobei freie Telomere sichtbar werden. Die Centromer- und Telomerregionen liegen in polarer Ausrichtung, die als *Rabl-*

---

## **Abbildungen 31 – 402: Lichtmikroskopische Darstellung des Mitose-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*).**

**Abbildung 31:** Interphase (G<sub>2</sub>-Phase): Mitotische Interphasekerne zeigen eine charakteristische Organisation in Euchromatin (Pfeilspitze) und Heterochromatin (Pfeil). Einige dominante, polare heterochromatische Bereiche werden an der Kernperipherie sichtbar. C = Centromerbereich, T = Telomerbereich.

**Abbildung 32:** Beginnende Prophase: Die Chromosomen können erstmals als dünne Fäden nachgewiesen werden, die wellig im Kern angeordnet sind. Eine polare Orientierung der Centromer- (C) und Telomerbereiche (T) in *Rabl*-Konfiguration und parallele Orientierung der Chromosomenarme wird erkennbar.

**Abbildung 33:** Frühe Prophase: Die Chromosomen grenzen sich voneinander ab. C = Centromerbereich, T = Telomerbereich.

**Abbildung 34:** Prophase: Der Kontrast der Chromosomen nimmt zu. Einzelne wellige Chromosomen können unterschieden werden. C = Centromerbereich, T = Telomerbereich. (LM-Übersicht zu REM-Abbildung 44)

**Abbildung 35:** Späte Prophase: Die Chromosomen liegen in einem aufgelockertem Knäuel. Die *Rabl*-Orientierung nimmt deutlich ab. (LM-Übersicht zu REM-Abbildung 33)

**Abbildung 36:** Prometaphase: Stäbchenförmige Chromosomen weisen schwache Konstriktionen auf. C = Centromer, T = Telomer, NOR = Nukleolus organisierende Region.

**Abbildung 35:** Metaphase: Die Chromosomen sind kontrastreich und zeigen deutliche Einschnürungen im Centromer (C) und NOR. T = Telomer.

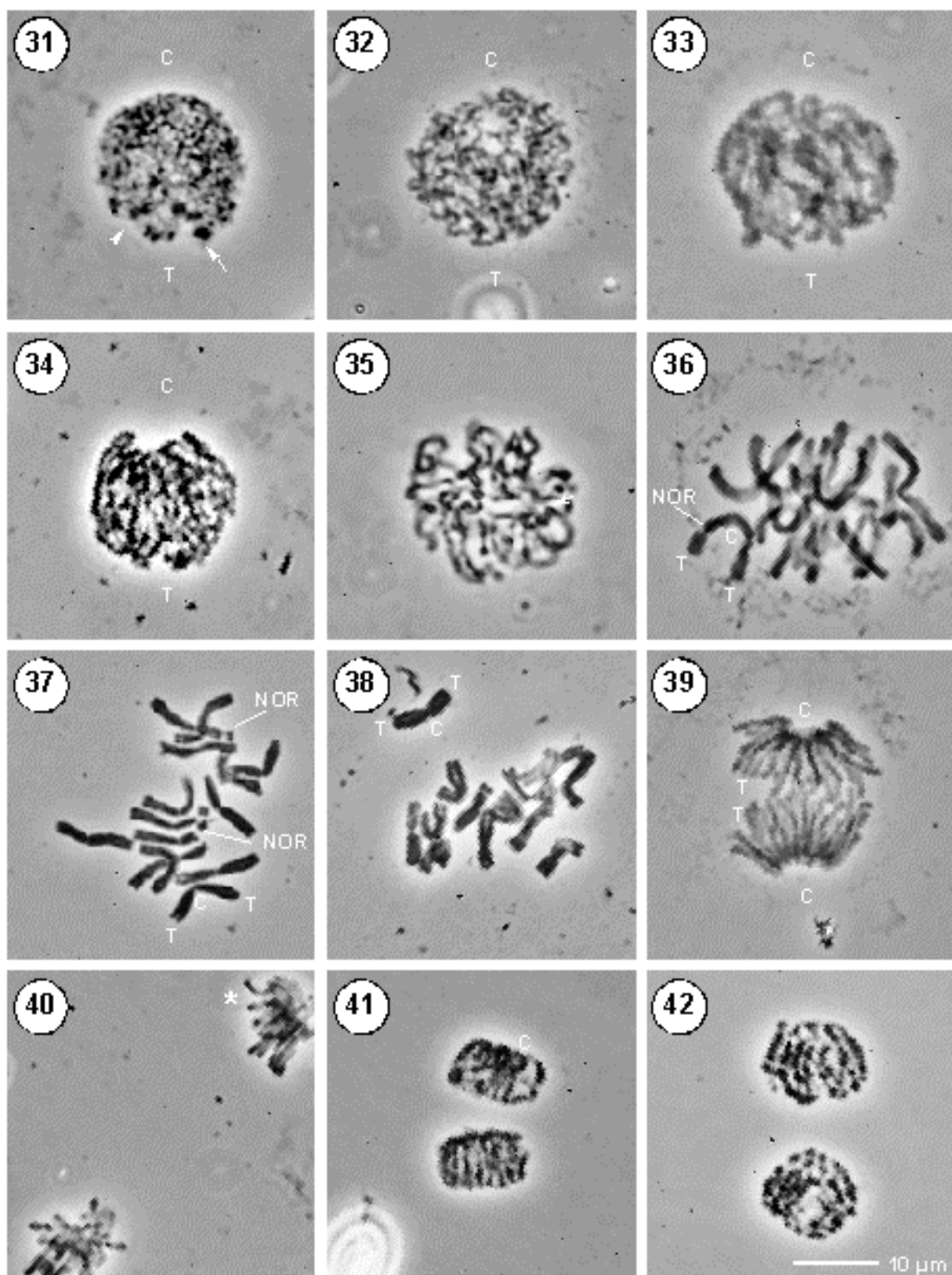
**Abbildung 37:** Späte Metaphase: Individuelle Chromatiden werden insbesondere im Telomerbereich sichtbar. C = Centromer, T = Telomer, NOR = Nukleolus organisierende Region.

**Abbildung 38:** Anaphase: Die getrennten Chromatiden liegen im Centromerbereich gebündelt und sind polwärts orientiert. C = Centromer, T = Telomer. (LM-Übersicht zu REM-Abbildung 49)

**Abbildung 39:** Telophase: Die Chromatidenbündel liegen an den Polen. Telomerbereiche bleiben sichtbar. (LM-Übersicht zu REM-Abbildung 50)

**Abbildung 40:** Späte Telophase: Die Dekondensation wird durch die Aupprägung von eu- und heterochromatische Domänen sichtbar. Individuelle Chromatiden sind noch erkennbar. C = Centromer, T = Telomer. (LM-Übersicht zu REM-Abbildung 51)

**Abbildung 41:** Interphase (G<sub>1</sub>-Phase): Die Chromosomen sind über weite Bereiche dekondensiert. Individuelle Chromatiden sind kaum noch erkennbar.



Orientierung bezeichnet wird. Mit Zunahme der Kondensation können relativ dünnfädige Chromosomen über kurze Bereiche unterschieden werden (Abb. 34). In der späten Prophase, wenn die *Rabl*-Orientierung aufgehoben wird, zeigen die Chromosomen ein deutlich verbessertes Spreitungsverhalten (Abb. 35).

### ***Metaphase***

Mit Beginn der Prometaphase, wenn der Chromosomenfaden zu einem mehr oder weniger gleichmäßigen Stäbchen kondensiert, werden primäre und sekundäre Konstriktionen am Centromer und an der Nukleolus-organisierenden Region (NOR) erstmals sichtbar (Abb. 36). In der Metaphase sind die Chromosomen verstärkt kondensiert. Die charakteristischen Einschnürungen in den Centromer- und den NOR-Regionen sind nach der Vorbehandlung der Chromosomen mit HU, APM, bzw. nach einer Eiswasserbehandlung stark (Abb. 37 und 38), bei unbehandelten Chromosomen dagegen schwach ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). In der späten Metaphase werden Chromatiden im distalen Bereich erkennbar (Abb. 38).

### ***Ana- und Telophase***

In der Anaphase sind die Chromosomen im Centromerbereich V-förmig geknickt, wobei die Centromere individueller Chromatiden eng benachbart liegen (Abb. 39). In der darauf folgenden Telophase liegen die Chromosomen gebündelt an den Polen, wobei individuelle Chromosomen nicht mehr unterschieden werden können (Abb. 40). Der Übergang von der Telophase zur Interphase ist durch eine leichte Streckung der Chromosomen und einer erneuten Differenzierung von eu- und heterochromatischen Bereichen gekennzeichnet (Abb. 41). Die Chromosomen bilden im Verbund eine globuläre Kernstruktur, wobei die parallele Ausrichtung der Chromosomenarme beim Übergang zur Interphase noch deutlich erkennbar ist (Abb. 42).

## ***3.4.2. Mitose-Zyklus des Roggens bei geringer Vergrößerung im REM***

### ***Interphase***

Mitotische Interphasekerne zeigen ab einer 1000-fachen Vergrößerung im REM eine granuläre Strukturierung des Chromatins. Einige polar angeordnete, globuläre Chromatinverdichtungen von etwa 500 nm Durchmesser können an der Kernperipherie beobachtet werden (Abb. 43; Pfeile), die mit den heterochromatischen Domänen im LM korrelieren (siehe Abb. 31; Pfeile). Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Beobachtung können euchromatische Bereiche im REM nicht eindeutig unterschieden werden (Abb. 43; Pfeilspitze).

### ***Prophase***

Mit Beginn der Prophase sind die Chromosomen als gewellte Fäden mit granulärer Strukturierung nachweisbar (Abb. 44). In diesen frühen Stadien zeigen die Chromosomen eine Tendenz zum Abflachen auf dem Objektträger. Die polare Orientierung der Centromer- (C) und Telomerbereiche (T) in *Rabl*-Konfiguration ist deutlich sichtbar. Im Verlauf des frühen

Prophasestadiums verdichtet sich das Chromatin zu fädigen Chromosomen mit grobkörniger Struktur. Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Betrachtung können eu- und heterochromatische Bereiche nicht unterschieden werden (Abb. 45). Individuelle Chromosomen, die nur wenige Mikrometer voneinander entfernt liegen, sind über zahlreiche Fibrillen miteinander verbunden. Die Kondensation der Roggen-Chromosomen erfolgt gleichmäßig über alle chromosomalen Bereiche. Die Chromatiden sind im distalen Bereich vollständig gepaart.

---

**Abbildungen 43 – 54: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Mitose-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*) bei geringer Vergrößerung. (C = Centromer, T = Telomer, NOR = Nukleolus organisierende Region)**

**Abbildung 43:** Interphase (G<sub>2</sub>-Phase): Mitotische Interphasekerne zeigen bei 100-facher Vergrößerung im REM eine grobe Strukturierung des Chromatins. Polare globuläre Verdichtungen treten dominant an der Kernperipherie hervor (Pfeile). Euchromatische Bereiche können nicht eindeutig unterschieden werden (Pfeilspitze). (REM-Übersicht zur LM-Abb. 29)

**Abbildung 44:** Beginnende Prophase: Die Chromosomen können als gewellte und feingranulierte Fäden nachgewiesen werden. Centromer- (C) und Telomerbereiche (T) liegen in *Rabl*-Konfiguration.

**Abbildung 45:** Frühe Prophase: Die Chromosomen sind gleichmäßig kondensiert und können unterschieden werden. Telomer- (T) und Centromerbereiche (C) der Chromosomen liegen in *Rabl*-Konfiguration. An den Telomeren treten vereinzelt Verdickungen auf.

**Abbildung 46:** Prophase: Das Chromatin verdichtet sich und die Chromosomenmorphologie ist unregelmäßig. Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Betrachtung können Eu- und Heterochromatin nicht unterschieden werden. Die Chromosomenkondensation erfolgt gleichmäßig über alle Bereiche, wobei die Chromatiden im distalen Bereich vollständig gepaart sind. Zahlreiche Fibrillen verbinden die benachbarten, individuellen Chromosomen. C = Centromer, T = Telomer. (REM-Übersicht zur LM-Abb. 32)

**Abbildung 47:** Späte Prophase: Die Chromosomenoberfläche erscheint gleichmäßig strukturiert und zeigt nur geringe Variationen im Durchmesser. Mit zunehmender Kondensation nehmen periphere Fibrillen zwischen den benachbarten Chromosomen ab und die Chromosomen beginnen sich zu einem zylindrischen Körper abzurunden. Die Polarisierung von Centromer und Telomer wird aufgehoben. (REM-Übersicht zur LM-Abb. 33)

**Abbildung 48:** Metaphase (unbehandelte Zellen): Die Chromosomenoberfläche ist gleichmäßig strukturiert. Primäre und sekundäre Konstriktionen sind nur schwach sichtbar. Fibrillen zwischen benachbarten Chromosomen können im Vergleich zu Prophasestadien nicht mehr beobachtet werden.

**Abbildung 49:** Metaphase (synchronisiert): Die Chromosomenoberfläche erscheint regelmäßig strukturiert. Die Chromosomen sind verstärkt kondensiert. Konstriktionsbereiche von Centromer und NOR sind deutlich ausgeprägt. Die Separation der Chromatiden in distalen Bereichen wird sichtbar.

**Abbildung 50:** Späte Metaphase: Individuelle Chromatiden sind einschließlich des Centromerbereiches separiert und liegen eng benachbart. Ct = Chromatid.

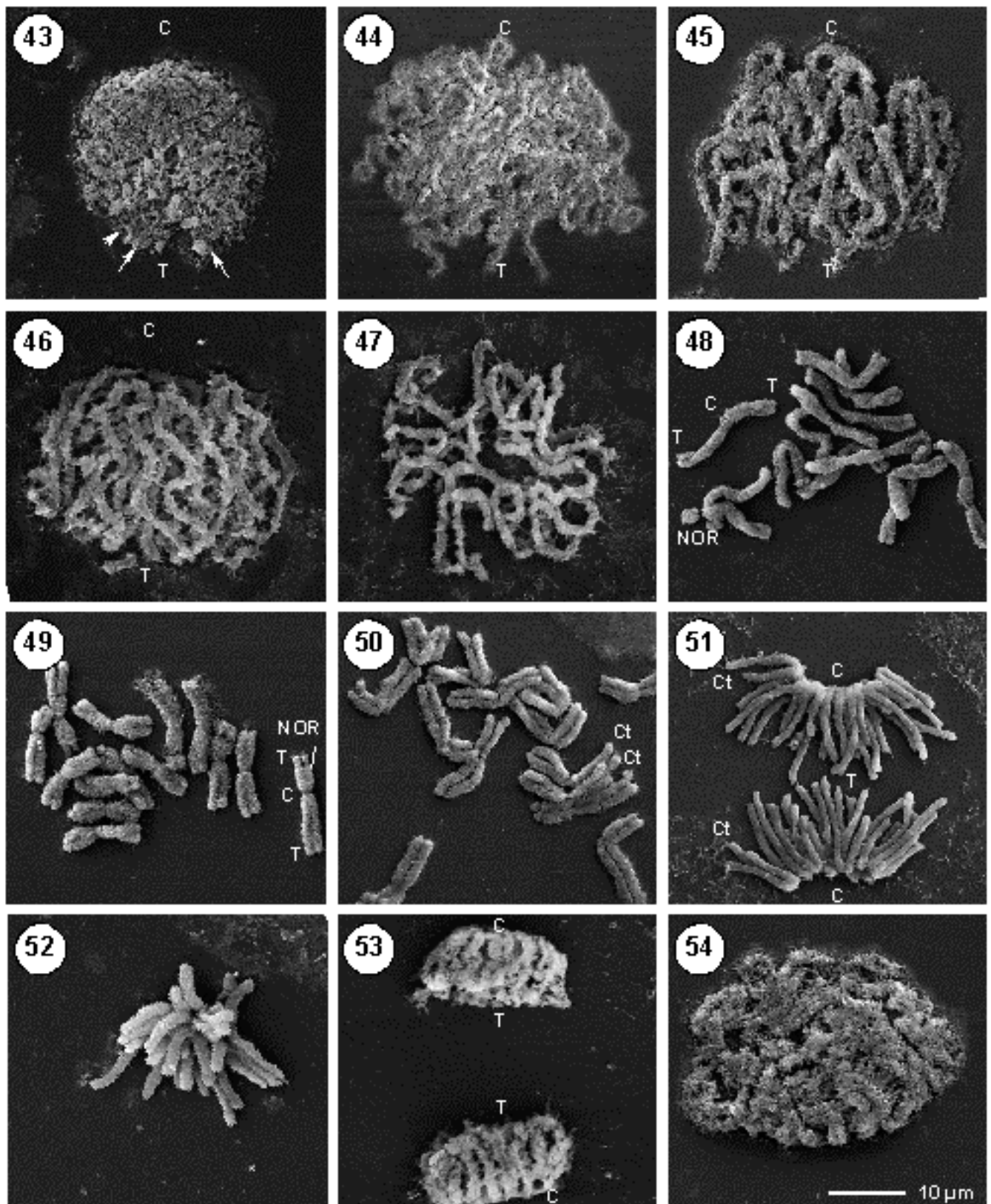
**Abbildung 51:** Anaphase: In der Anaphase sind die Chromatiden gebündelt, wobei die Centromere eng benachbart liegen. Die Konstriktionen von Centromer und NOR sind kaum noch zu erkennen. Ct = Chromatid. (REM-Übersicht zur LM-Abb. 37)

**Abbildung 52:** Telophase: Die Chromosomen sind an den Centromeren gebündelt. Die Oberfläche der zylindrischen Chromosomen ist gleichmäßig strukturiert. (REM-Übersicht zur LM-Abb. 38)

**Abbildung 53:** Späte Telophase: Die Dekondensation ist deutlich an der aufgelockerten und unregelmäßigen, fibrillären Chromatinstruktur der Chromosomen zu erkennen. Zwischen individuellen Chromosomen treten Verbindungen auf. (REM-Übersicht zur LM-Abb. 39)

**Abbildung 54:** Interphase (G<sub>1</sub>-Phase): Die Chromosomen sind nur noch andeutungsweise zu erkennen. Das Chromatin erscheint feinstrukturiert. Zahlreiche fibrilläre Verbindungen maskieren die Chromosomenkonturen.





Ein polarisierter Kondensationsmodus (mit verstärkter Kondensation im proximalen Bereich und Dekondensation in distalen Regionen), welcher für pflanzliche Chromosomen beschrieben wurde (MARTIN *et al.*, 1994), wurde im Roggen nicht beobachtet. Mit Zunahme des Kondensationsstatus erscheint die Chromosomenoberfläche gleichmäßig strukturiert. Individuelle Chromosomen stehen über Fibrillen miteinander in Verbindung (Abb. 46). In der späten Prophase nehmen periphere Fibrillen zwischen den Chromosomen ab, wobei sich das Spreitungsverhalten der Chromosomen deutlich verbessert. Die Chromosomen weisen eine unregelmäßige, leicht segmentierte Struktur auf (Abb. 47).

### ***Metaphase***

Mit Beginn der Prometaphase werden primäre (C) und sekundäre Konstriktionen (NOR) sichtbar (Abb. 48). Mit dem Ende der Polarisierung von Centromer- und Telomerregionen können keine Fibrillen zwischen den benachbarten Chromosomen mehr nachgewiesen werden. Die Oberflächenstruktur der Chromosomen erscheint feinkörnig granuliert. Der Chromosomenkörper ist zylindrisch abgeflacht. In der Metaphase sind die Chromosomen maximal kondensiert und die Konstriktionen ausgeprägt (Abb. 49). Die Chromatiden sind mit Ausnahme des perizentrischen Bereiches deutlich erkennbar. In der späten Metaphase sind die Schwesterchromatiden fast vollständig getrennt und liegen eng benachbart (Abb. 50).

### ***Ana- und Telophase***

Nach der Trennung der Chromatiden in der Anaphase können individuelle Chromosomen, die im proximalen Bereich miteinander in engem Kontakt stehen, gut unterschieden werden (Abb. 51). Konstriktionsbereiche sind nur noch andeutungsweise sichtbar. Die Chromosomenoberfläche ist glatt und regelmäßig zylindrisch. In der Telophase sind die Chromosomen an den Centromeren als dichtes Büschel gebündelt (Abb. 52). Konstriktionen der NOR können nicht mehr wahrgenommen werden. In der späten Telophase wird eine unregelmäßige Dekondensation der Chromosomenarme sichtbar. Während Telomere und proximale Bereiche noch verstärkt kondensiert sind, zeigt sich in den interstitiellen Bereichen eine aufgelockerte Chromosomenstruktur (Abb. 53). Im Verlauf der weiteren Dekondensation zur Interphase erfolgt eine gleichmäßige Streckung der Chromosomenarme (Daten nicht gezeigt). Der Beginn der Interphase wird anhand der Abflachung der Chromosomen und der beginnenden, erneuten „Vernetzung“ der Chromosomen deutlich (Abb. 54). Individuelle Chromosomen sind dann nur noch andeutungsweise erkennbar.

### 3.4.3. Hochauflösende Ultrastrukturanalyse mitotischer Chromosomen des Roggens im REM

#### **Interphase**

In der Interphase wird bei der hochauflösenden REM-Analyse eine komplexe Kernarchitektur des Chromatins mit unterschiedlich großen Verdichtungsbereichen sichtbar (Abb. 55). Einige dieser polar orientierten, heterochromatischen Domänen von etwa 200 – 600 nm im Durchmesser treten nach einer DAPI-Kontrastierung dominant hervor. *In situ*-Hybridisierungen mit den Telomer-spezifischen Sequenzen aus *Arabidopsis* (TTTAGGG)<sub>n</sub>, mit der Sonde pSc119.2 oder mit cGISH.Ara können diese Bereiche anhand prominenter Signalbanden als Telomerregionen identifizieren (Daten nicht gezeigt). Abbildung 56 zeigt einen potentiellen Telomerbereich in Hochauflösung, der über einzelne Fibrillen mit anderen heterochromatischen Domänen in Verbindung steht.

#### **Prophase**

Prophase-Chromosomen zeigen im REM bei geringer Vergrößerung eine grobe Strukturierung der Oberfläche (Abb. 57). Telomere sind verstärkt kondensiert. In Hochauflösung wird eine alternierende Anordnung von geknäuelten Fibrillen (= Chromomere) und parallelen Fibrillen sichtbar, welche die Chromosomen in Längsrichtung segmentieren (Abb. 58). Individuelle Chromatiden können nur über kurze Distanzen von wenigen 100 nm in Bereichen mit längsorientierten Fibrillen unterschieden werden. Die weitere Chromosomenkondensation erfolgt gleichmäßig über das gesamte Chromosom (Abb. 59). Geknäuelte Fibrillen und Chromomere unterschiedlicher Größe prägen die Chromosomenoberfläche von späten Pro- und Prometaphasen (Abb. 60). Nur noch vereinzelt sind kurze Segmente mit längsorientierten Fibrillen erkennbar. In den Prophasestadien sind die Telomerbereiche nach einer Eiswasserbehandlung deutlich verstärkt. Im Gegensatz zur Gerste bleiben die Chromatiden im Verlauf des Kondensationszyklus interstitiell und distal eng gepaart. Eine zopf- oder dachziegelartige Chromatinorganisation, wie sie für Prophase-Chromosomen von MARTIN *et al.* (1995) beschrieben wurde, ist nicht nachweisbar.

#### **Metaphase**

Im Metaphasestadium können zahlreiche, unterschiedlich große Chromomere auf der Chromosomenperipherie nachgewiesen werden, die teils in engem Kontakt zueinander stehen (Abb. 61 und 62). Während in der frühen Metaphase noch Fibrillenstrukturen an der Chromosomenoberfläche erkennbar sind, zeigen spätere Stadien wie Ana- und Telophase eine einheitlich glatte Oberfläche (Abbildung nicht gezeigt).

Die Abbildungen 63 und 64 geben die Strukturwandlung des Telomerbereiches in der Pro- und Prometaphase in Hochauflösung wieder. Die Telomerbereiche der frühen Prophasen sind aus einheitlich geknäuelten Fibrillen aufgebaut, die insbesondere nach einer Eiswasserbehandlung die Chromosomenenden kappenartig verstärken (Abb. 63). Diese Differenzierung verschwindet

mit Zunahme der Kondensation, wobei die Telomerbereiche strukturell nicht mehr vom restlichen Chromosomenkörper unterschieden werden können (Abb. 64). Chromomere treten in allen Stadien in unterschiedlicher Größe als mehr oder weniger kugelförmige Strukturen auf und prägen mit Ausnahme der Konstriktionsbereiche die Chromosomenoberfläche der späten Prophasen im Wesentlichen. In Hochauflösung werden fibrilläre Verbindungen zwischen benachbarten Chromomeren sichtbar, welche diese miteinander verbinden (Abb. 66; Pfeilspitzen). Im Centromerbereich (C), in dem überwiegend längsorientierte Fibrillen nachgewiesen werden, treten Chromomere nie auf.

---

**Abbildungen 55 – 66: Hochauflösende Ultrastrukturanalyse mitotischer Chromosomen des Roggen (*Secale cereale*) im REM.**

**Abbildungen 55 – 56:** Interphase: Die Kernarchitektur ist durch Chromatinverdichtungen charakterisiert. Einige größere, polar orientierte heterochromatische Semente fallen an der Peripherie auf (Abb. 53; Sterne). Bei hoher Vergrößerung wird eine fibrilläre Vernetzung eines heterochromatischen Bereiches (Stern) mit anderen Domänen sichtbar (Abb. 54).

**Abbildungen 57 – 58:** Prophase: Polare Chromatinverdichtungen im Bereich der Telomere von etwa 500 – 800 nm im Durchmesser treten nach einer Behandlung des Wurzelspitzengewebes in Eiswasser auf (Abb. 55). Im Detail wird die Segmentierung der Chromosomen in Chromomere (Sterne) und längsorientierte Fibrillen (Pfeile) sichtbar. In Bereichen mit längsorientierten Fibrillen ist eine Unterscheidung individueller Chromatiden teilweise möglich (Abb. 56).

**Abbildungen 59 – 60:** Prometaphase: Im Verlauf der Kondensation nehmen die Chromosomen zunehmend eine zylindrische Gestalt an. Konstriktionen können in einigen wenigen Bereichen nachgewiesen werden (Abb. 57). Bei hoher Vergrößerung wird die dichte Packung von Fibrillen deutlich (Abb. 58). Während Chromomere (Sterne) deutlich ausgeprägt werden, können längsorientierte Fibrillen nur noch vereinzelt wahrgenommen werden (Pfeil). Individuelle Chromatiden können nicht unterschieden werden.

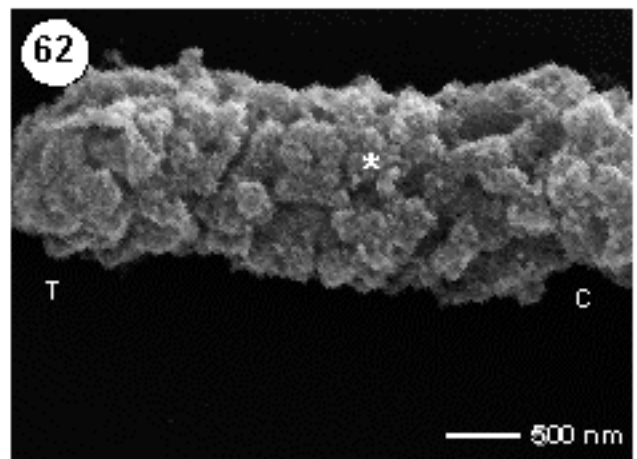
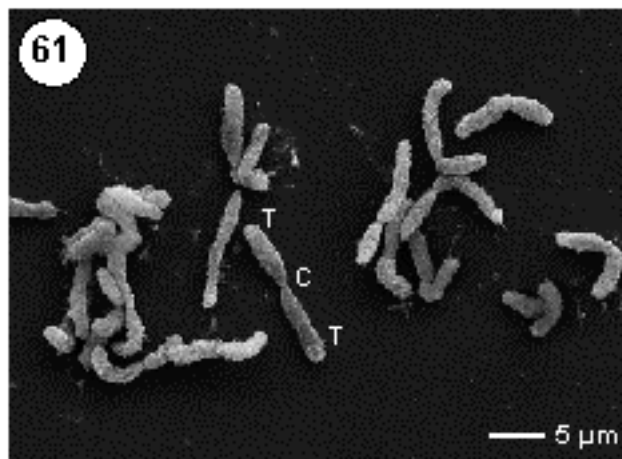
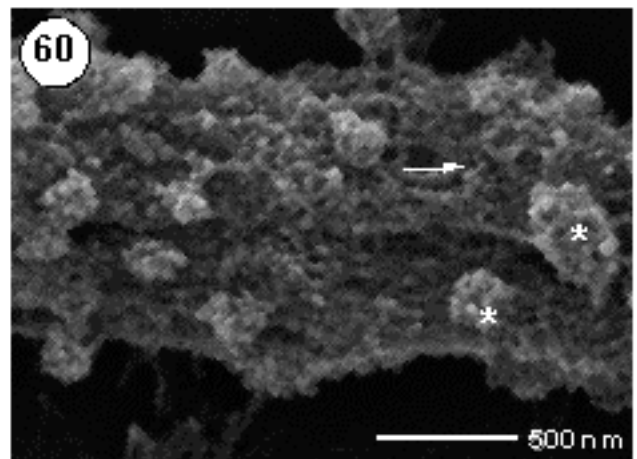
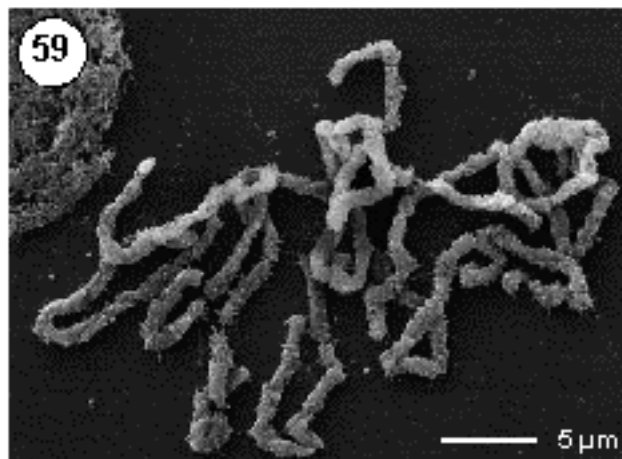
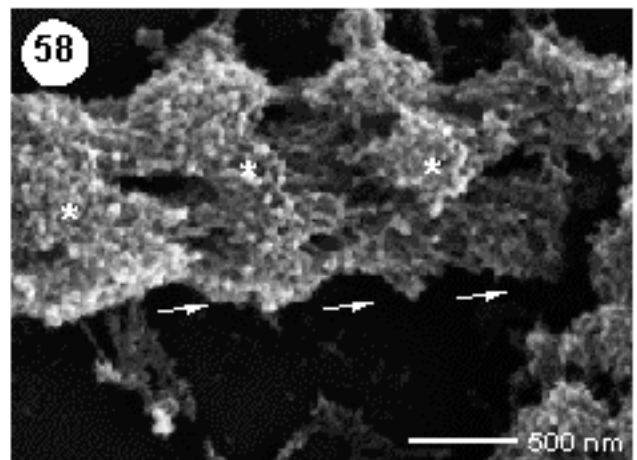
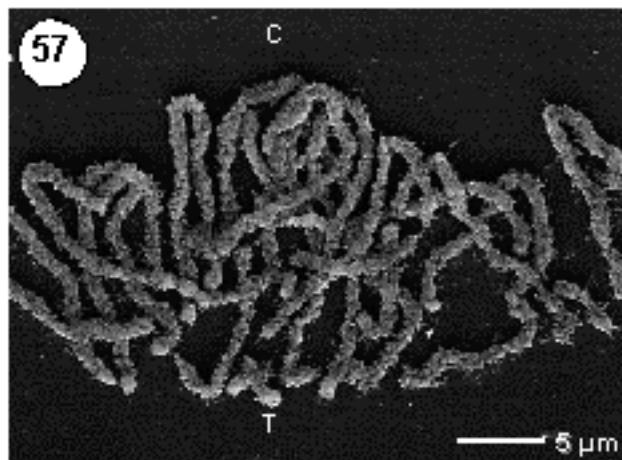
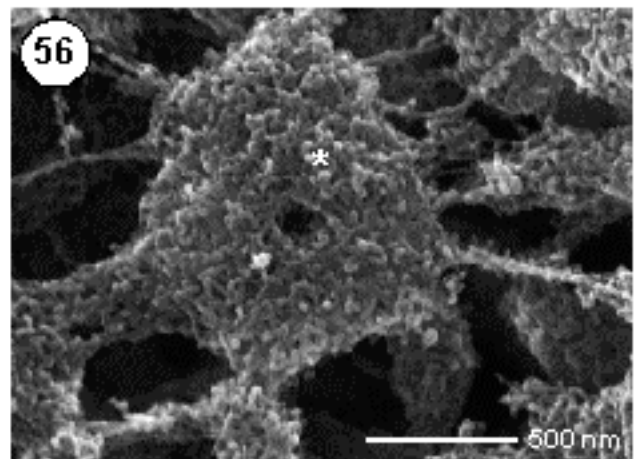
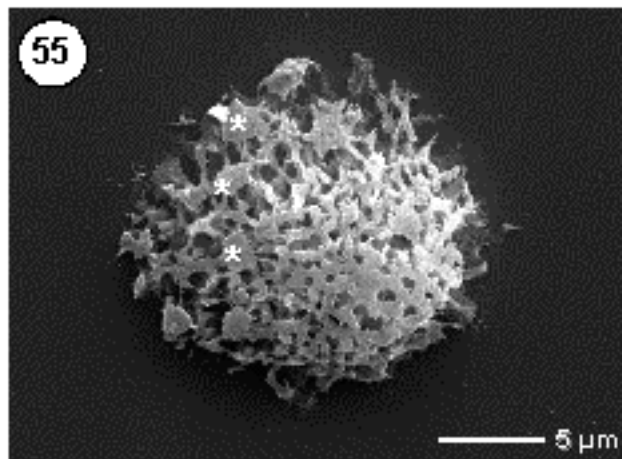
**Abbildungen 61 – 62:** Metaphase: Die Chromosomenkondensation erfolgt gleichmäßig über alle chromosomalen Bereiche. Konstriktionen sind deutlich ausgeprägt. Bei hoher Vergrößerung zeigt sich eine kompakte Oberflächenstruktur aus unregelmäßigen Chromomere. (Abb. 60; Stern)

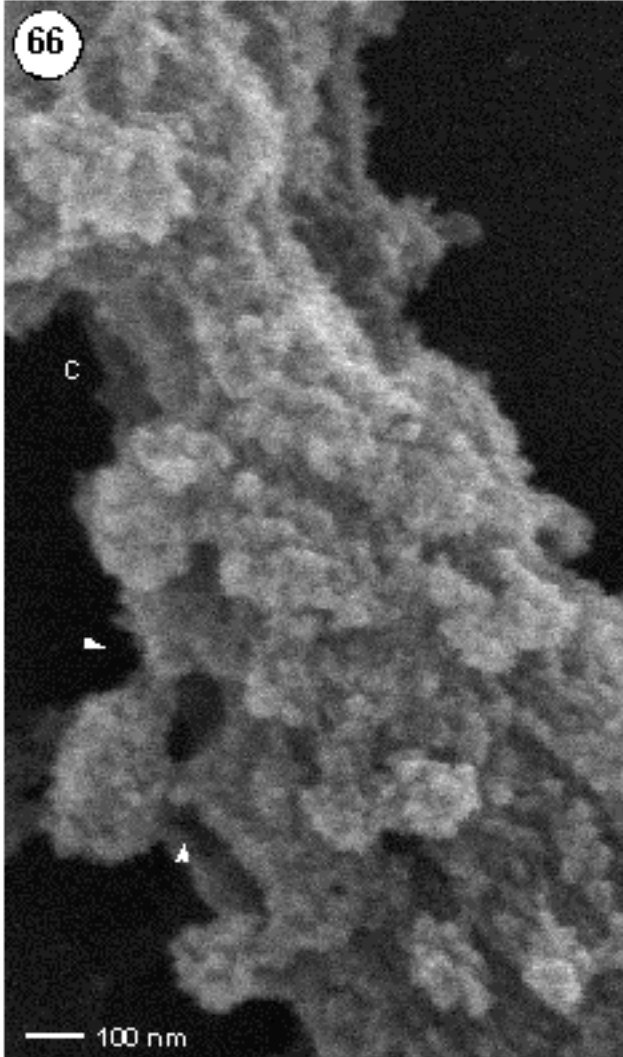
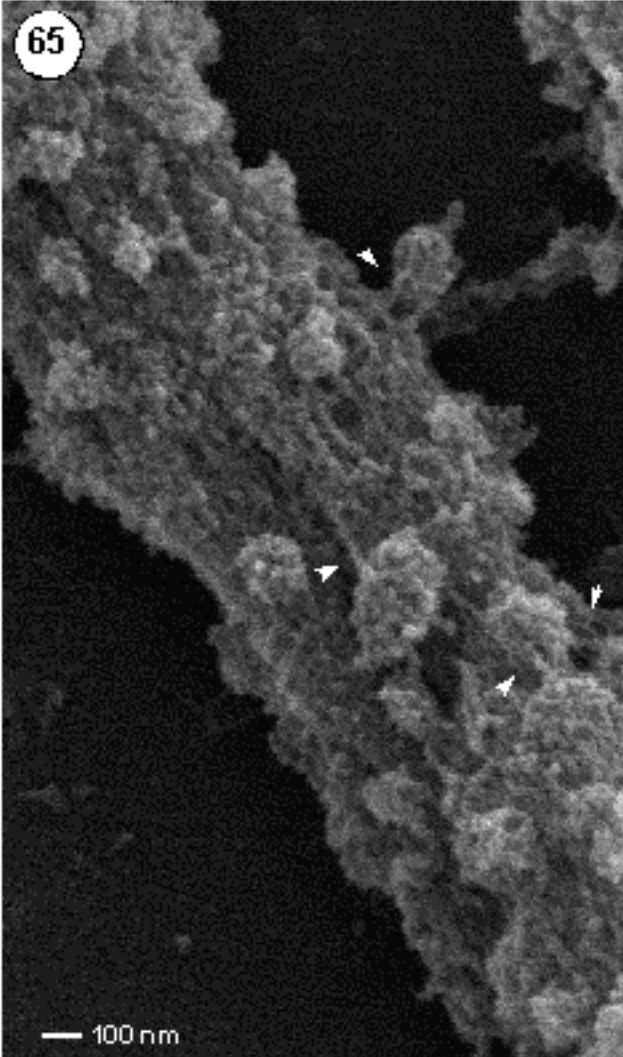
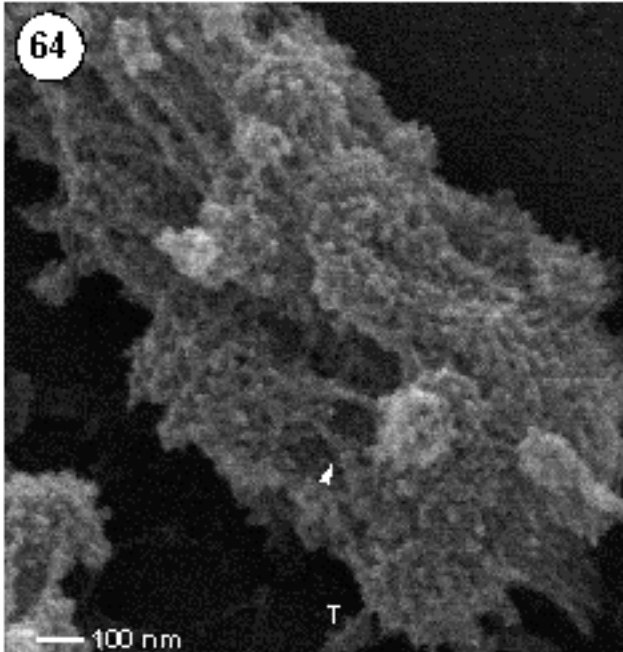
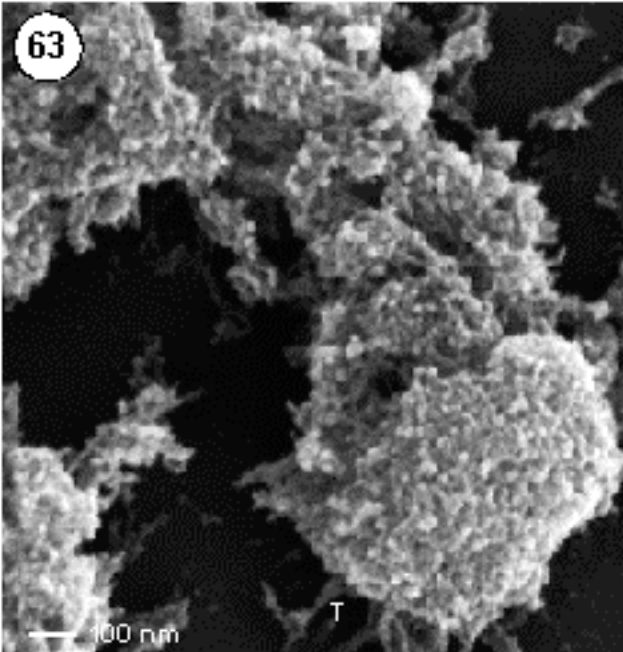
**Abbildung 63:** Telomerregion in der Prophase: Das Chromatin im Telomerbereich ist verdichtet, ohne daß charakteristische Chromomerstrukturen nachweisbar sind.

**Abbildung 64:** Telomerregion in der Prometaphase: Der Telomerbereich ist gleichmäßig zum Chromosomenkörper kondensiert. Individuelle Chromomere sind über Fibrillen mit dem Telomerbereich verbunden (Pfeilspitze).

**Abbildung 65:** Centromerbereich in der Prometaphase: Chromomere prägen die Chromosomenoberfläche, Nur kurze Abschnitte mit längsorientierten Fibrillen sind sichtbar. Individuelle Chromomere sind über Fibrillen miteinander verbunden (Pfeilspitzen).

**Abbildung 66:** Bei hoher Vergrößerung werden verknäuelte 30 nm-Fibrillen sichtbar, die die Chromomerstrukturen ausprägen oder als verbindende Elemente zwischen individuellen Chromomeren auftreten (Pfeilspitzen).





### 3.5. Hochauflösende Ultrastrukturanalyse mitotischer Chromosomen der Gerste im REM

Strukturanalysen mitotischer Gersten-Chromosomen (*Hordeum vulgare*:  $2n = 14$ ) zeigen eine Chromatinorganisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen, Chromomere und parallele Anordnungen, wie sie auch im Roggen auftreten. Dennoch können im Verlauf des Zellzyklus mehrere Unterschiede, insbesondere beim Kondensationsmodus und der Chromatidenassoziation im Vergleich zum Roggen beobachtet werden.

#### *Interphase*

Der Interphasekern zeigt eine feine granuläre Fibrillenstruktur, ohne daß signifikante heterochromatische Domänen ausgeprägt werden (Abb. 67). Erst in Hochauflösung wird die netzartige Organisation der 30 nm-Fibrillen sichtbar, die kleinere Hohlräume freiläßt (Abb. 68).

#### *Prophase*

Im Prophasestadium wird eine verstärkte Kondensation im Centromerbereich deutlich. Die Telomere sind dekondensiert, wobei dort gleichzeitig die Schwesterchromatiden nicht miteinander assoziiert sind (Abb. 69). Vergleichbar mit mitotischen Prophase-Chromosomen des Roggens können zahlreiche verbindende Fibrillen zwischen den unterschiedlichen Chromosomen nachgewiesen werden. Die Chromosomen zeigen gleichfalls eine alternierende Anordnung von Chromomeren und parallelen Längsfibrillen (Abb. 70).

---

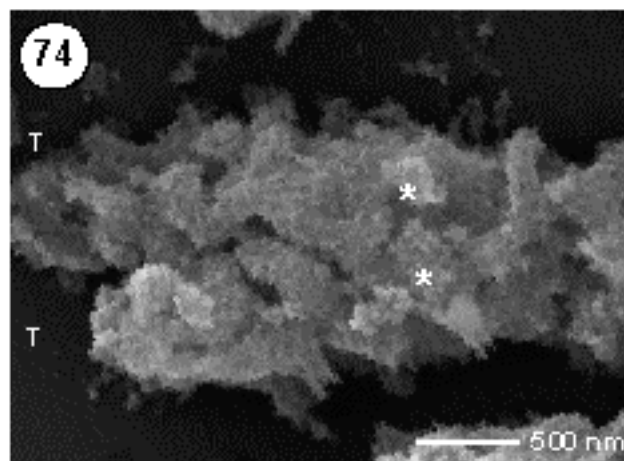
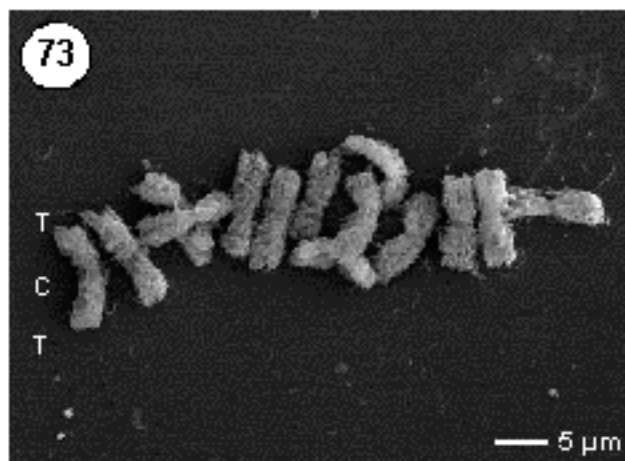
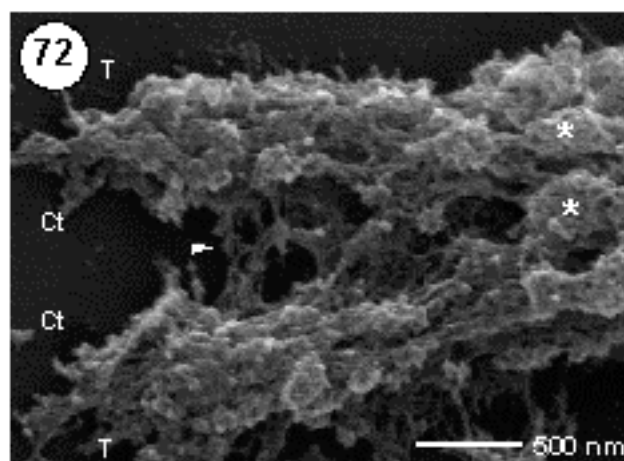
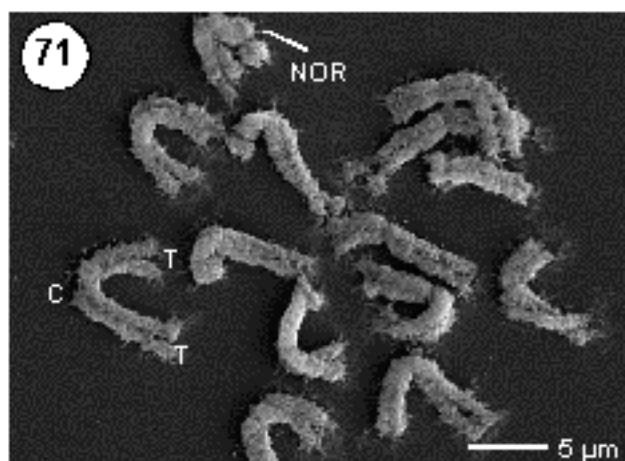
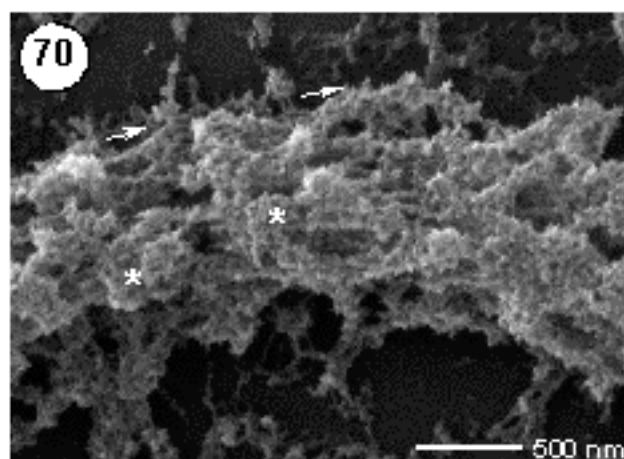
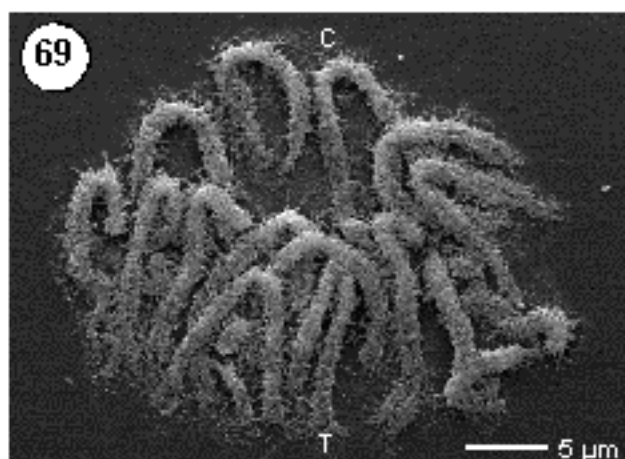
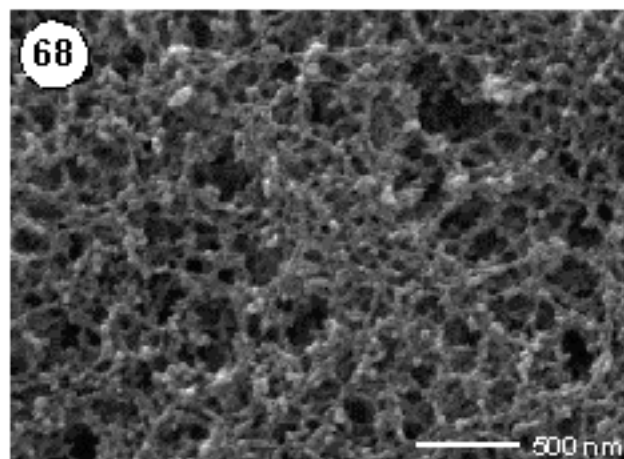
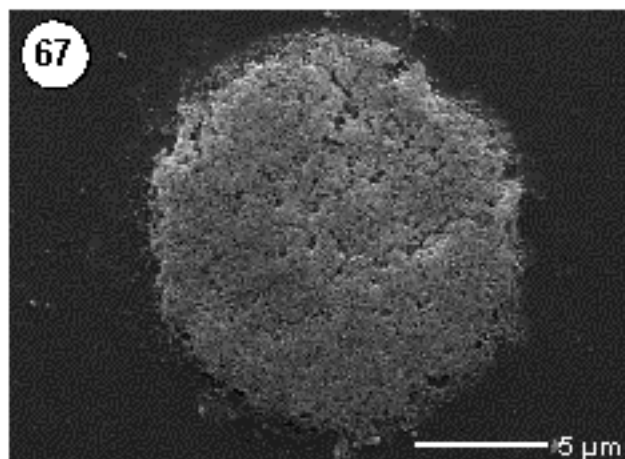
#### **Abbildungen 67 – 74: Hochauflösende Ultrastrukturanalyse mitotischer Chromosomen der Gerste (*Hordeum vulgare*) im REM.**

**Abbildungen 67 – 68:** Interphase: Das Chromatin der Interphase ist feingranulär, ohne daß charakteristische heterochromatische Domänen auffallen (Abb. 67). Bei hoher Vergrößerung wird die fibrilläre Organisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen sichtbar (Abb. 68).

**Abbildungen 69 – 70:** Prophase: Bei geringer Vergrößerung sind kondensierte Centromer-nahe Bereiche und gering kondensierte Telomere sichtbar (Abb. 69; T = Telomer, C = Centromer). Individuelle Chromatiden können im Bereich der Telomere ansatzweise erkannt werden. Bei hoher Vergrößerung wird die Segmentierung in Chromomere (Sterne) und kurze parallele Fibrillen (Abb. 70; Pfeile) sichtbar.

**Abbildungen 71 – 72:** Prometaphase: Im Verlauf der Kondensation nehmen die Chromosomen zunehmend eine abgeflachte zylindrische Gestalt an. Konstriktionen im Centromer und NOR sind deutlich sichtbar (Abb. 71; T = Telomer, C = Centromer). Individuelle Chromatiden können in den distalen Bereichen deutlich unterschieden werden. Im Detail eines Telomerbereiches werden fibrilläre Verbindungen (Pfeilspitze) zwischen den getrennten, individuellen Chromatiden (Ct) sichtbar (Abb. 72). Chromomere treten im Telomerbereich und in interstitiellen Bereichen gleichermaßen auf.

**Abbildungen 73 – 74:** Metaphase: Die Chromosomen sind gleichmäßig kondensiert ohne daß Konstriktionen deutlich ausgeprägt werden (Abb. 73). Bei hoher Vergrößerung werden große Chromomere an der Oberfläche sichtbar, die miteinander in Kontakt stehen und scheinbar verschmelzen (Abb. 74)





### ***Prophase***

Im Prophasestadium wird eine verstärkte Kondensation im Centromerbereich deutlich. Die Telomere sind dekontensiert, wobei dort gleichzeitig die Schwesterchromatiden nicht miteinander assoziiert sind (Abb. 69). Vergleichbar mit mitotischen Prophase-Chromosomen des Roggens können zahlreiche verbindende Fibrillen zwischen den unterschiedlichen Chromosomen nachgewiesen werden. Die Chromosomen zeigen gleichfalls eine alternierende Anordnung von Chromomeren und parallelen Längsfibrillen (Abb. 70).

### ***Metaphase***

In der Prometaphase sind die Chromosomen gleichmäßig kondensiert, wobei primäre (Centromer) und sekundäre Konstriktionsbereiche (NOR-Regionen) gut ausgeprägt sind (Abb. 71). Die Chromosomenmorphologie ist zylindrisch bis leicht abgeflacht, wobei im distalen Bereich die Schwesterchromatiden deutlich auseinander weichen (Abb. 72). Zwischen den Schwesterchromatiden wird ein fibrilläres Netzwerk aus 30 nm-Fibrillen sichtbar. Die Chromomere sind verdichtet, wobei nur noch vereinzelt Segmente mit parallelen Fibrillen beobachtet werden. In der Metaphase sind die Chromosomen stäbchenförmig kondensiert, wobei die primären Konstriktionen gut, die sekundären Konstriktionen dagegen nicht mehr nachweisbar sind (Abb. 73). Beide Chromatiden sind jetzt auch im Telomerbereich miteinander assoziiert (Abb. 74).

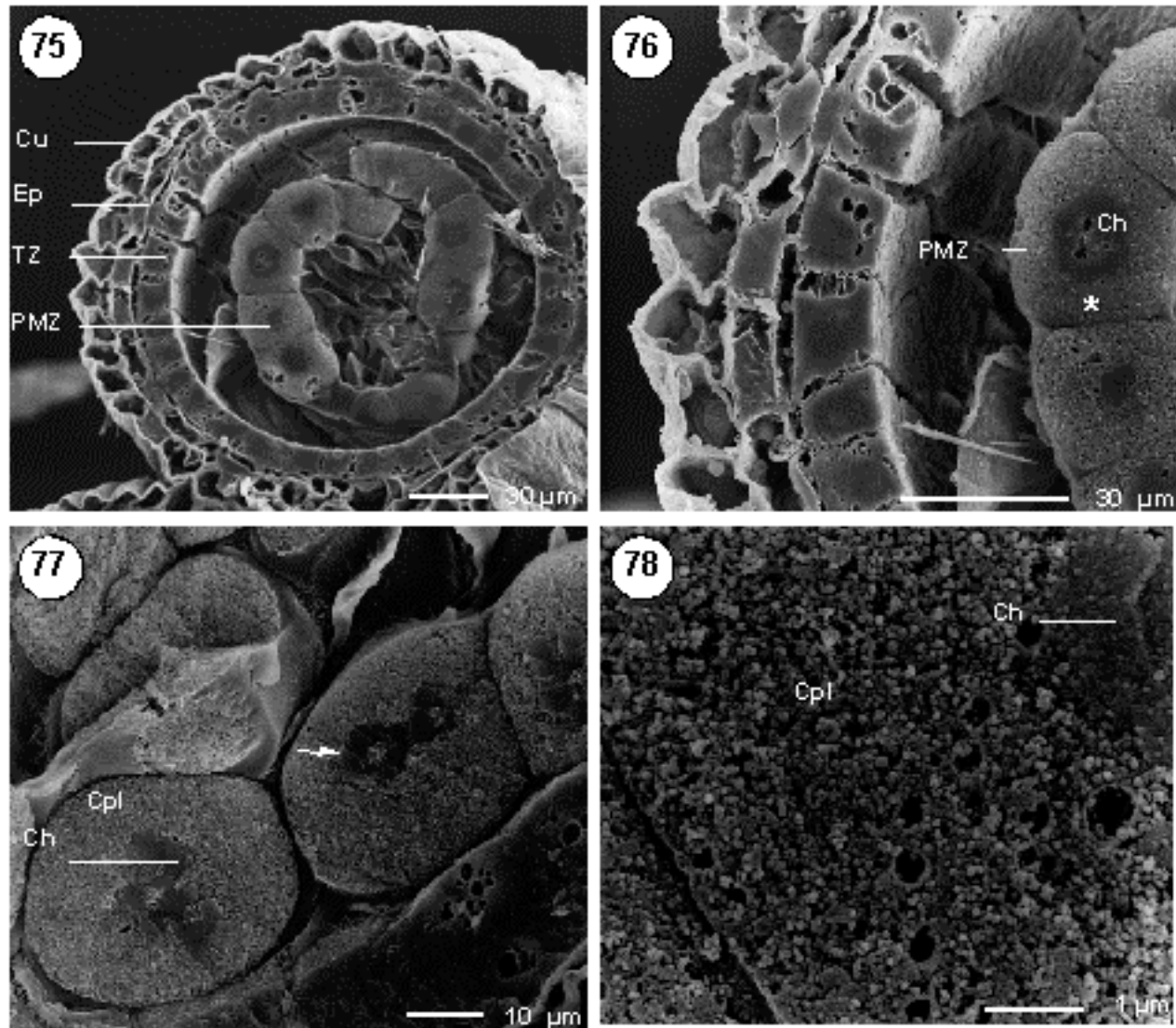
## **3.6. Meiose-Zyklus des Roggen im Licht- (LM) und Rasterelektronenmikroskop (REM)**

### ***3.6.1. Tanaka-Bruchverfahren***

An einer radialen Bruchstelle wird (anhand eines Teilbereiches) der Aufbau einer Roggenanthere sichtbar (Abb. 75 und 76), der sich von innen nach aussen wie folgt gliedert in

- runde Pollenmutterzellen (PMZ), die sich durch ihre Zellgröße von den angrenzenden Zellen unterscheiden;
- Tapetumzellen (TZ);
- Epidermiszellen (EPZ), die von einer
- Cuticula (Cu) geschützt werden.

Die Präparationsmethode ermöglicht eine gute Strukturhaltung, wobei jedoch kleinere Risse aufgrund von Schrumpfungen bei der Dehydrierung des Gewebes auftreten. Die Pollenzellwand (PZW) ist nur andeutungsweise erkennbar. Nach einer Fixierung in Glutaraldehyd sind die zytoplasmatischen Zellbestandteile als granuläre Strukturen erkennbar, die mit den Chromosomen assoziiert sind. Die Chromosomen grenzen sich als gleichmäßig homogene Strukturen vom umgebenden Cytoplasma ab. In der Metaphase I können Ringstrukturen einzelner Bivalente nachgewiesen werden (Abb. 77). Individuelle Chromatinfibrillen sind selbst bei hoher Vergrößerung nicht erkennbar (Abb. 78), so daß sich diese Methode für Ultrastrukturuntersuchungen meiotischer Chromosomen als ungeeignet erweist.



**Abbildungen 75 – 78: Querschnitt durch eine Anthere des Roggens (*Secale cereale*) nach dem Tanaka-Bruchverfahren.**

**Abbildung 75:** Teilbereich einer Anthere: Der Aufbau gliedert sich von innen nach aussen in Pollermutterzellen (PMZ), Tapetum (TZ), Epidermiszelle (Ep) und Cuticula (Cu).

**Abbildung 76:** Bei hoher Vergrößerung können Chromatin (Ch) und Cytoplasma (Cpl) unterschieden werden.

**Abbildung 77:** Im Metaphase I-Stadium werden Ringstrukturen der Bivalenten (Pfeil) sichtbar. Das Chromatin (Ch) weist eine homogene Struktur auf und kann vom umgebenden Cytoplasma (Cpl) unterschieden werden.

**Abbildung 78:** In Hochauflösung sind keine fibrillären Chromatinstrukturen (Ch) nachweisbar. Das Cytoplasma (Cpl) ist feingranulär und zeigt kleine Vesikel.

### 3.6.2. Meiose–Zyklus des Roggens im Lichtmikroskop

#### *Interphase*

Der Durchmesser prämeiotischer Interphasekerne ist mit 16 µm im Vergleich zu dem in der Mitose (10 µm) deutlich vergrößert. Im Gegensatz zu mitotischen Interphasen zeigt das Chromatin eine feine granuläre Strukturierung, wobei vereinzelt kleinere, heterochromatische Bereiche nachweisbar sind. Polar orientierte, heterochromatische Domänen, wie sie für die Mitose charakteristisch sind, wurden nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

#### *Leptotän*

Im Leptotän, wenn die erste Annäherung der homologen Chromosomen beginnt, sind die Chromosomen im LM nur andeutungsweise in kurzen Segmenten als dünne Fäden erkennbar (Abb. 79). Im Vergleich zur Interphase werden eu- und heterochromatische Segmente deutlich geringer ausgeprägt. (Abb. 79).

---

#### **Abbildungen 79 – 90: Lichtmikroskopische Darstellung (LM) des Meiose I– und II– Zyklus des Roggen (*Secale cereale*)**

**Abbildung 79:** Frühes Leptotän: Das Chromatin ist granulär organisiert und zeigt heterochromatische (Pfeile) und euchromatische Regionen. Kurze Abschnitte dünner Chromosomenfäden werden sichtbar (Pfeilspitze).

**Abbildung 80:** Zygotän: Verknäulte Chromosomenfäden zeigen heterochromatische Domänen. Abschnitte gepaarter (Pfeilspitze) und ungepaarter homologer Chromosomen (Pfeil) können unterschieden werden.

**Abbildung 81:** Pachytän: Homologe Chromosomen sind vollständig gepaart. Vereinzelt können Telomere (T) nachgewiesen werden.

**Abbildung 82:** Diplotän: Die Chromosomen sind eng gepaart und weisen eine unregelmäßige Form und deutliche Segmentierungen (Pfeile) auf.

**Abbildung 83:** Diakinese: Chiasmata (Pfeil), sichtbare Strukturen von „crossing-over“-Ereignissen werden am Telomerbereich (T) sichtbar, wenn die homologen Chromosomen auseinander weichen. C = Centromerbereich

**Abbildung 84:** Metaphase I: Bivalent gepaarte Chromosomen weisen dünne Spitzen im Centromerbereich (C) auf. Die Telomere (T) der Homologen sind paarweise fusioniert. Ein Chromosom liegt in einer geöffneten Ringkonformation mit fusionierten Telomeren in der Mitte und zwei freie Telomeren an den Enden.

**Abbildung 85:** Anaphase I: Die homologen Chromosomen werden individuell getrennt. An den Telomeren (T) werden individuelle Chromatiden sichtbar (Pfeilköpfe). (C = Centromerbereich)

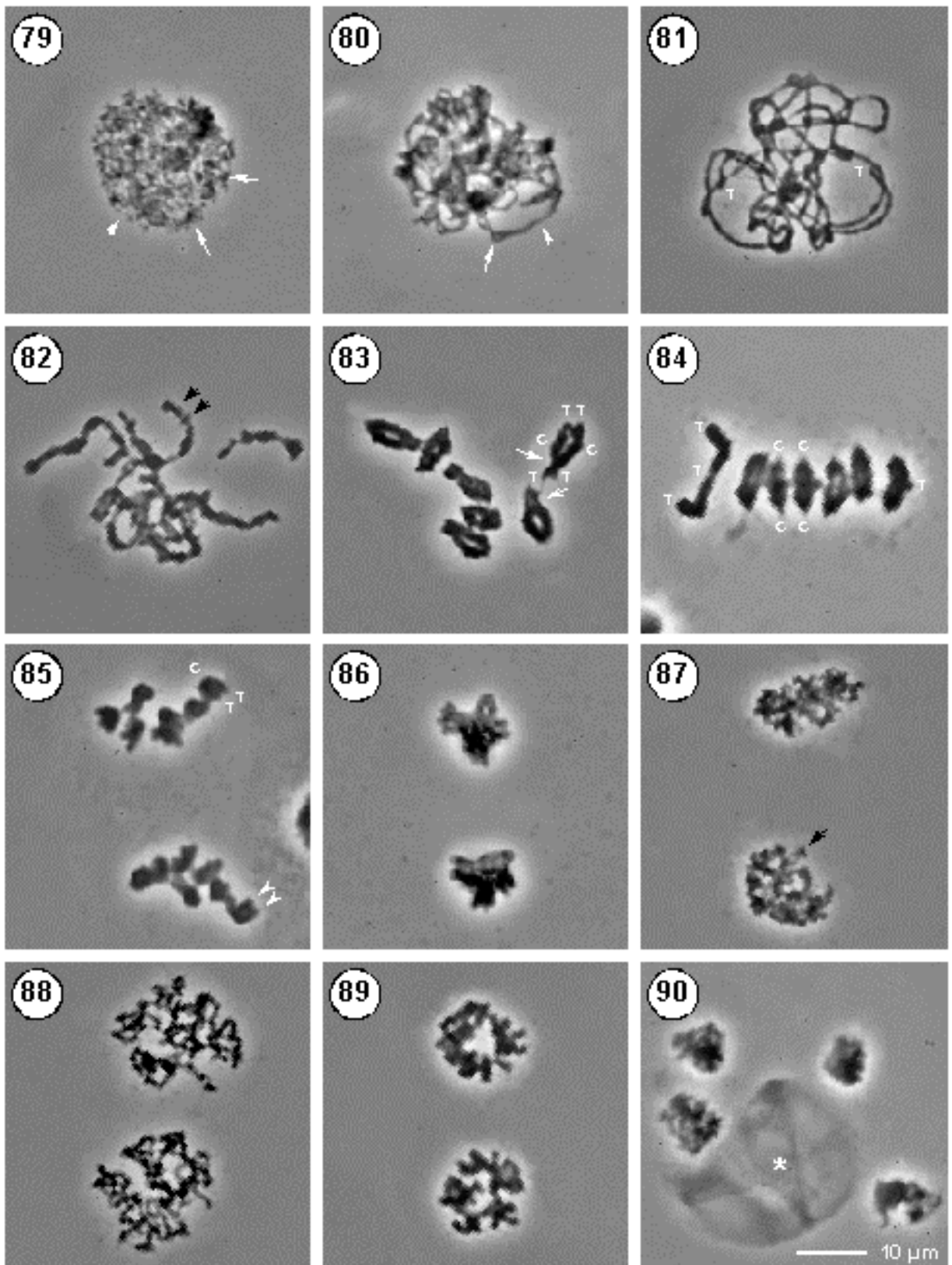
**Abbildung 86:** Telophase I: Die Chromosomen segregieren zu den entgegengesetzten Polen. Individuelle Chromosomen können in den Chromosomenbündel nicht mehr unterschieden werden.

**Abbildung 87:** Interkinese: Die Chromosomen sind unvollständig dekondestriert wobei erneut heterochromatische Domänen (schwarzer Pfeil) sichtbar werden.

**Abbildung 88:** Prophase II: Die Chromosomen liegen verknäult, ohne daß eine polare Ausrichtung der Centromer– und Telomerbereiche sichtbar ist. Die Chromosomenarme sind leicht geknickt.

**Abbildung 89:** Metaphase II: Die Chromosomen sind x-förmig, wobei individuelle Chromatiden mit Ausnahme des Centromerbereiches getrennt sind.

**Abbildung 90:** Interphase II: Vier haploide, Chromosomensätze wurden aus der Pollenmutterzelle (Stern) freigesetzt. Das Chromatin ist vollständig dekondestriert.



Im Verlauf der Kondensation liegen die Chromosomen ungeordnet. Eine parallele Ausrichtung der Chromosomenarme oder eine polare Orientierung der Centromer und Telomerbereiche, entsprechend der *Rabl*-Konfiguration, ist nicht sichtbar (Abb. 80, 81 und 82).

### ***Zygotän***

Im Zygotän sind die Chromosomen stark verknäuel und zeigen keine klare Differenzierung von Eu- und Heterochromatin. Die Aneinanderlagerung homologer Chromosomen ist von einer kontinuierlichen Chromosomenkondensation begleitet. Abschnitte gepaarter (Abb. 80) und ungepaarter Chromosomen (Abb. 80) werden deutlich. Eine Zusammenlagerung der Telomere, bzw. freier Telomere, die auf ihre *Bouquet*-Anordnung hinweisen, ist nicht erkennbar.

### ***Pachytän***

Im Pachytän, wenn der synaptonemale Komplex (SC) ausgebildet ist und die genetische Rekombination stattfindet, liegen die homologen Chromosomen so eng gepaart vor, daß nur noch ein haploider Chromosomensatz erkennbar ist. Die gepaarten Homologen bilden dabei ein lockeres Chromosomenknäuel. Chromodomänen treten nur noch vereinzelt auf (Abb. 81). Die Telomere bleiben bis auf 1 – 3 frei liegende Chromosomenenden meist verborgen.

### ***Diplotän***

Das frühe Diplotän, wenn die Trennung der Homologen beginnt, ähnelt dem des Zygotäns, wengleich die Chromosomen stärker kondensiert sind. Im späten Diplotän werden die Chromosomen verstärkt kondensiert und nehmen eine unregelmäßige, stäbchenförmige Morphologie an (Abb. 82). Die gepaarten Homologen liegen deutlich „Seite an Seite“.

### ***Diakinese***

In der Diakinese wird die Trennung der Homologen an interstitiellen Bereichen eingeleitet. Chiasmata, sichtbare Ereignisse des homologen reziproken Austausches, werden an den terminalisierten Rekombinationsstellen des „crossing-overs“ sichtbar (Abb. 83).

### ***Metaphase I***

In der Metaphase I, wenn die Telomere der Homologen noch miteinander verbunden sind, zeigen die bivalent gepaarten Homologen eine charakteristische O-Konformation. Im Gegensatz zur Mitose sind die Chromosomen stark verkürzt und lassen keine Konstriktionen im Centromer oder NOR erkennen (Abb. 84). Die Centromerbereiche können in der späten Metaphase anhand kurzer Ausstülpungen in der Kinetochorregion identifiziert werden. In der späten Metaphase tritt häufig ein t-förmiges Chromosom auf.

### ***Anaphase I***

Im Gegensatz zum analogen Stadium in der Mitose werden in der Anaphase I parentale Chromosomen einzeln zu den Polen transportiert (Abb. 85), ohne daß sie miteinander in Kontakt stehen. Vereinzelt werden individuelle Chromatiden im Telomerbereich sichtbar.

### ***Telophase I***

In der Telophase liegen die Chromosomen gebündelt an den Polen. Individuelle Chromosomen können nicht unterschieden werden (Abb. 86).

### ***Interkinese***

Im darauffolgenden Interkinesestadium erscheinen die Chromosomen dekondensiert und zeigen eine deutliche Segmentierung in Eu- und Heterochomatin (Abb. 87). Nukleoli können nicht beobachtet werden.

### ***Prophase II***

Im Prophase II Stadium sind die individuellen Chromatiden bis auf die Centromerregion getrennt. Die einzelnen Chromatidenarme sind sehr flexibel angeordnet und liegen bei den Spreitungspräparaten meist „geknickt“ (Abb. 88). Eine polare Ausrichtung von Telomer- und Centromerregion in *Rabl*-Konfiguration kann nicht beobachtet werden.

### ***Metaphase II***

In der Metaphase II sind die Chromosomen im Vergleich zur Prophase II deutlich verkürzt und zeigen aufgrund der bis auf die Centromerregion getrennten Chromatiden ein X-förmiges Erscheinungsbild. Konstriktionen in Centromer und NOR können nicht beobachtet werden (Abb. 89).

### ***Ana- und Telophase II***

Der Übergang von der Anaphase II zur Telophase II wird in den Präparationen nur selten beobachtet, so daß nur wenig Information über dieses Stadium zur Verfügung steht. In den untersuchten Stadien sind die Chromosomen jedoch meist früh dekondensiert. In der Telophase II, die mit der Freisetzung von Pollenkörnern aus der gemeinsamen Pollenmutterzellwand beendet wird, sind die Chromosomen innerhalb der Pollenmutterzelle vollständig dekondensiert. Das Chromatin zeigt, vergleichbar zur Interphase, eine charakteristische Ausprägung von eu- und heterochromatischen Segmenten (Abb. 90).

**3.6.3. Meiose-Zyklus des Roggens bei geringer Vergrößerung im REM**

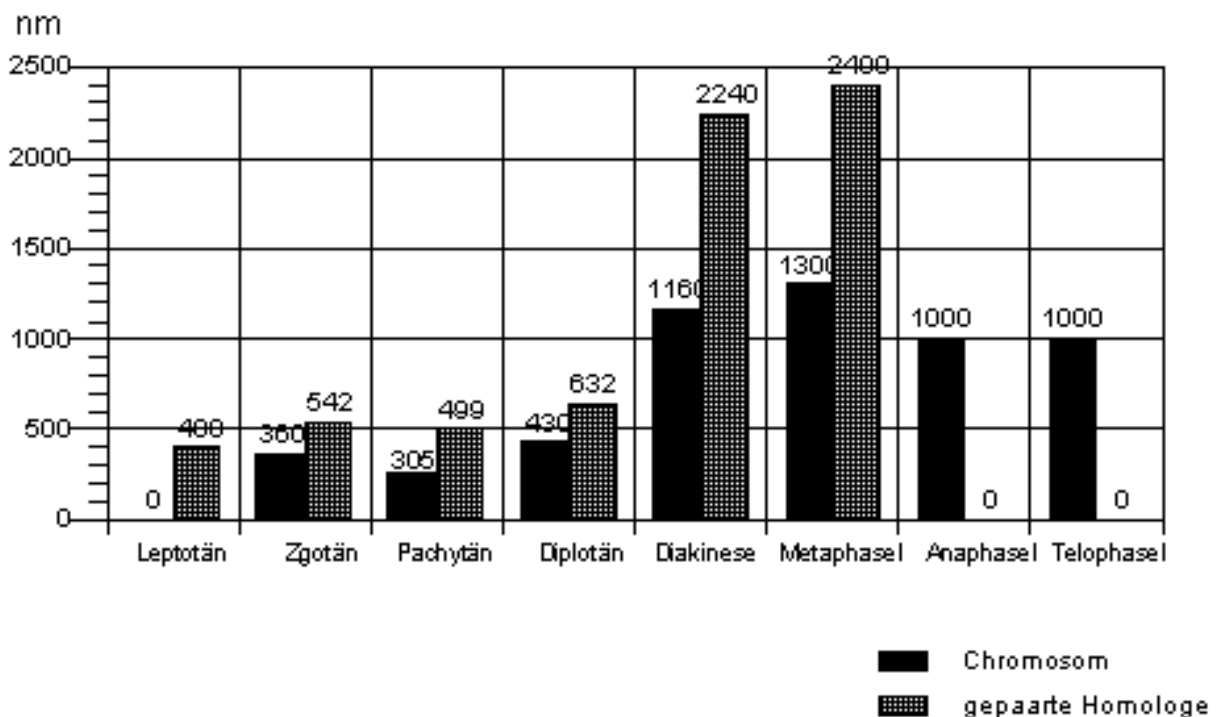
**Leptotän**

Der Übergang zum Leptotän ähnelt der Interphase, wenngleich über kurze Abschnitte dünne Chromosomenfäden sichtbar werden. Die Kernorganisation erscheint im Vergleich zur Mitose aufgelockert. Aufgrund der netzartigen Struktur, in welche die Chromosomen eingebunden sind, kann der Verlauf individueller Chromosomen oder gepaarter Chromosomen nicht eindeutig erkannt werden (Abb. 91).

**Zygotän**

Im Zygotän können im REM deutlich Abschnitte von gepaarten (Abb. 92) und ungepaarten homologen Chromosomen (Abb. 92) nachgewiesen und von Überlagerungen nicht-homologer Chromosomen unterschieden werden. Die Chromosomen liegen ungeordnet, wobei nie freie Telomere auftreten. Eine polare Ausrichtung von Telomer- und Centromerregionen in *Bouquet*- oder *Rabl*-Orientierung ist nicht zu erkennen. Im Vergleich zu lichtmikroskopischen Untersuchungen variieren die Durchmesser der eu- und heterochromatischen Segmente im REM deutlich geringer.

**Diagramm 1:** Durchmesser individueller und gepaarter Homologer im Verlauf der Kondensation im Meiose I-Zyklus.



**Pachytän**

Im Pachytän erscheinen die homologen Chromosomen bei geringer Vergrößerung vollständig gepaart. Individuelle Chromosomen können nicht unterschieden werden. Der Durchmesser gepaarter Homologe ist mit 570 nm im Vergleich zu den individuellen ungepaarten Chromosomen mit je 305 nm deutlich reduziert (Diagramm 1). Die 2 bis 3 freien Telomerbereiche zeigen

häufig eine keulenförmige Verstärkung. Im Gegensatz zu LM-Darstellungen können im REM zahlreiche fibrilläre Verbindungen zwischen den nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 93).

### ***Diplotän***

Im Diplotän werden im Verlauf der Kondensation gepaarte und ungepaarte Abschnitte homologer Chromosomen sichtbar (Abb. 94). Die Kondensation der Chromosomen erfolgt dabei ungleich über deren Länge, so daß der Durchmesser um einen Faktor von 2 – 3 variieren kann. Zahlreiche, kleinere Fibrillen sind an der Chromosomenperipherie und zwischen nicht-homologen Chromosomen nachweisbar (Abb. 94).

### ***Diakinese***

Im Diakinesestadium ist eine unregelmäßige, stäbchenförmige Struktur der gepaarten Homologen erkennbar, wobei im distalen Bereich terminalisierte Chiasmata nachweisbar sind.

---

## **Abbildungen 91 – 102: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Meiose I- und II-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*) bei geringer Vergrößerung**

**Abbildung 91:** Interphase bis Leptotän: Das Chromatin ist mehr oder weniger netzartig verdichtet. Vereinzelt werden dünne Chromosomenfäden sichtbar (Pfeile).

**Abbildung 92:** Zygotän: Der Verlauf gepaarter und ungepaarter Chromosomen ist deutlich erkennbar und kann von Überlagerung benachbarter Chromosomen unterschieden werden.

**Abbildung 93:** Pachytän: Homologe Chromosomen erscheinen vollständig gepaart. Einige freie Telomere (T) sind keulenförmig verdickt. Fragile Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen werden sichtbar (Rechtecke).

**Abbildung 94:** Diplotän: Im späten Diplotän sind die Homologen noch eng benachbart. Individuelle Chromosomen sind umeinander verdreht. Fibrilläre Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen sind sichtbar (Pfeile).

**Abbildung 95:** Diakinese: Homologe Chromosomen sind im distalen Bereich über Chiasmata miteinander verbunden. Nicht-homologe Chromosomen stehen über dünne Fibrillen miteinander in Verbindung (Pfeile). C = Centromerbereich; T = Telomer.

**Abbildung 96:** Metaphase I: Bivalente weisen keine Konstriktionen auf (C = Centromerbereich). An den Telomeren (T) sind die Homologen fest miteinander verbunden. Häufig liegt ein Homologenpaar in einer geöffneten Ringkonformation (linkes Chromosomenpaar), wobei in der Mitte der Konfiguration ein Telomerpaar fusioniert ist und an den Enden zwei freie Telomere sichtbar werden.

**Abbildung 97:** Anaphase I: U-förmige Chromosomen zeigen keinerlei Konstriktionen und segregieren einzeln.

**Abbildung 98:** Telophase I: Die Chromosomen aggregieren als Bündel an den Polen.

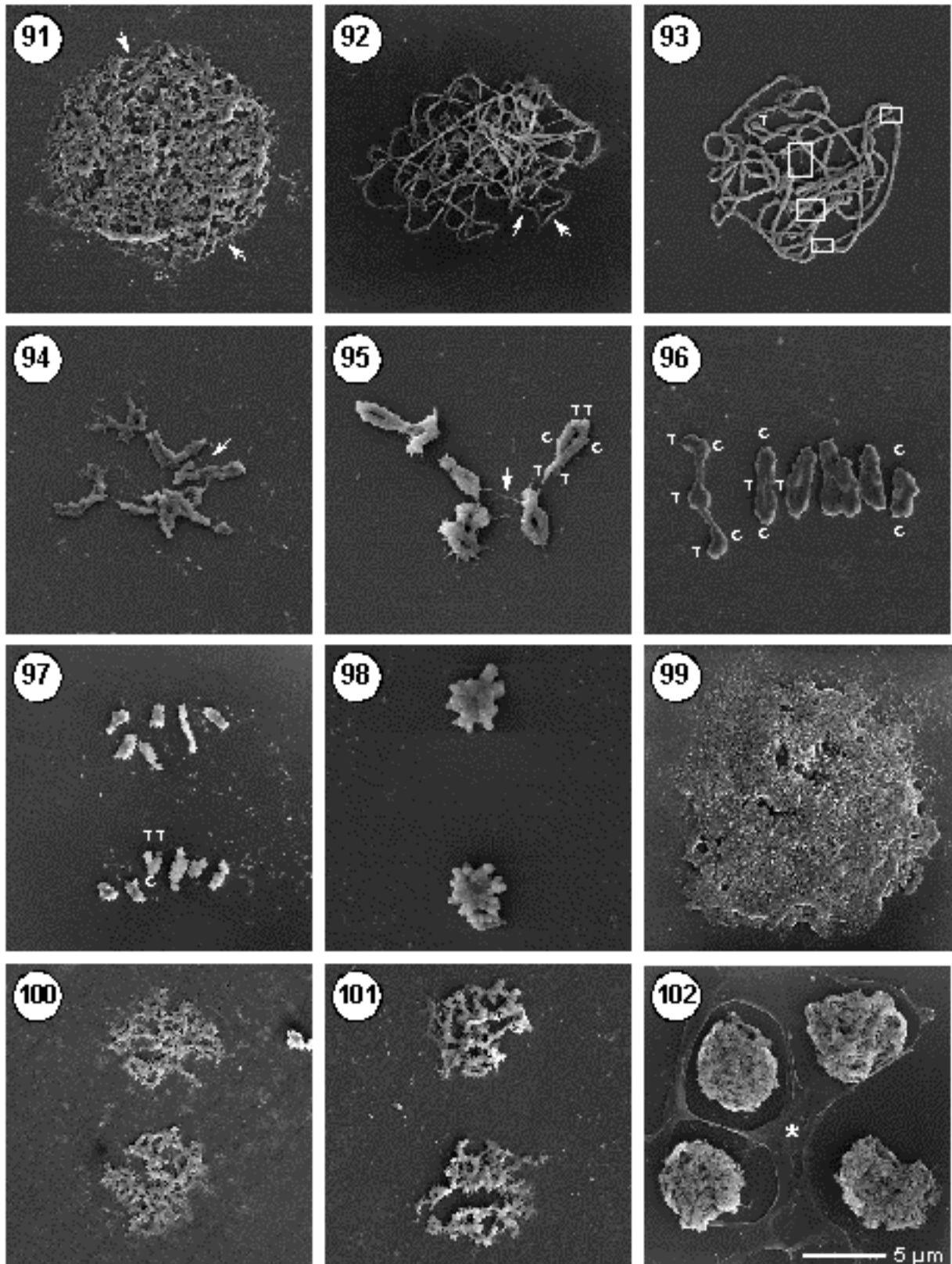
**Abbildung 99:** Interkinese: Die Dekondensation ist unvollständig. Chromosomenfäden sind deutlich abgeflacht.

**Abbildung 100:** Prophase II: Die Chromatiden sind mit Ausnahme des Centromerbereiches getrennt und die individuellen Chromosomenarme geknickt.

**Abbildung 101:** Metaphase II: Die Chromosomen sind x-förmig, wobei die Chromatiden nur noch im Centromerbereich miteinander verbunden sind.

**Abbildung 102:** Interphase II: Im Tetradenstadium sind die Chromosomen vollständig dekondensiert. Die Zellwand der Pollenmutterzelle (Stern) gibt nach der Präparation das Chromatin frei.





Konstriktionsbereiche im Centromer oder NOR können nicht beobachtet werden (Abb. 95). Verbindende Fibrillen können dabei sowohl zwischen den nicht-homologen Chromosomen (Abb. 95; Pfeil), als auch an terminalen und interstitiellen Bereichen zwischen den sich trennenden homologen Chromosomen nachgewiesen werden.

### ***Metaphase I***

In der Metaphase I verändert sich die Chromosomenmorphologie beachtlich: Die Centromerbereiche der beiden Homologen liegen polwärts, während die Telomerbereiche „fusioniert“ bleiben (Abb. 96). Ein Homologenpaar ist häufig nur noch an einem Telomer miteinander verbunden, was zu einer t-Konformation mit drei charakteristischen Verdickungen führt: Zwei Verdickungen der freien Telomere und einer Verdickung, die aus den zwei fusionierten, zentrisch gelegenen Telomeren besteht. Weder primäre (Centromer) noch sekundäre Konstriktionen (NOR), wie sie für mitotische Metaphasen charakteristisch sind, können nachgewiesen werden. Die Chromosomen sind im Bereich der Centromere meist vergrößert (2  $\mu\text{m}$ ) und an den Chromosomenarmen mit durchschnittlich 1,2 bis 1,3  $\mu\text{m}$  im Vergleich zur Mitose reduziert (Tabelle 3).

### ***Anaphase I***

In der Anaphase I segregieren die parentalen Chromosomen getrennt voneinander und zeigen (im Gegensatz zu den V-förmigen mitotischen Chromosomen) ein U-förmiges Erscheinungsbild (Abb. 97).

### ***Telophase I***

In der Telophase sind die Chromosomen büschelförmig aggregiert. Eine beginnende Trennung der Chromatiden zeichnet sich im Telomerbereich ab (Abb. 98).

### ***Interkinese***

In der Interkinese werden nur vereinzelt Chromosomenfäden sichtbar, die deutlich dekondensiert sind. Die Chromosomen zeigen, vergleichbar zum Interphasezustand, eine verstärkte Tendenz zur Abflachung auf dem Objektträger (Abb. 99).

### ***Prophase II***

In der Prophase II sind die Schwesterchromatiden bis auf den zentrischen Bereich getrennt. Im Gegensatz zu mitotischen Stadien liegen die Chromatidenarme meist „geknickt“ und abgeflacht auf dem Objektträger (Abb. 100).

### ***Metaphase II***

In der Metaphase II sind die Chromosomen mit einer Länge von 6  $\mu\text{m}$  – 8  $\mu\text{m}$  (im Vergleich zu mitotischen Metaphasestadien mit einer Länge von 12 – 13  $\mu\text{m}$  und Meiose I Stadien mit 7  $\mu\text{m}$  –

8 µm (Tabelle 3) verstärkt kondensiert. Vergleichbar mit den Meiose I–Metaphasestadium können keine Konstriktionen im Centromer oder NOR beobachtet werden (Abb. 101).

**Anaphase II und Telophase II**

Beim Übergang zur Anaphase II ist eine Verlängerung der Chromosomenarme sichtbar, die auf die beginnende Dekondensation der Chromosomen hindeutet (Daten nicht gezeigt). Im Tetradenstadium ist das Chromatin dekondensiert und zeigt deutlich Interphase-ähnliche Charakteristiken (Abb. 102).

**3.6.4. Chromosomenmessungen**

Durch Zuhilfenahme eines analogen Kurvenmessgerätes wurden anhand von Photoausdrucken der REM-Aufnahmen Messungen der Chromosomenlängen und -durchmesser durchgeführt. Mehr als 500 Messwerte von meiotischen Pro-, Meta-, Ana- und Telophasen des Roggens wurden ermittelt und mit korrelierenden mitotischen Stadien verglichen (Tabelle 3). Dabei zeigt sich, daß der Durchmesser in der Mitose von 0,9 auf 1,2 µm nur geringfügig, bei der Wandlung von der Prophase zur Metaphase auf 1,4 µm – 1,5 µm bei unbehandelten und 1,8 µm bei behandelten Chromosomen stark zunimmt. In diesem Stadium ist er mit einer Standardabweichung von 0,53 im Vergleich zur Prophase relativ konstant. Da individuelle Chromosomen nicht unterschieden werden können, wurde die Längenbestimmung aus der Länge aller Chromosomen ermittelt (Gesamtlänge aller Chromosomen : Anzahl individueller Chromosomen). Im Verlauf der Kondensation wird die Chromosomenlänge bei unbehandelten Chromosomen um den Faktor 4 von 35,6 µm in der Prophase auf 15 µm in der Metaphase reduziert. Eine maximale Verkürzung auf 9 µm kann bei Metaphase-Chromosomen nur nach Vorbehandlung des meristematischen Wurzelspitzen Gewebes mit Eiswasser für mindestens 10 Stunden, oder nach Synchronisation des Zellzyklus mit APM und HU beobachtet werden.

**Tabelle 3: Chromosomendurchmesser und -längen im Verlauf des Zellzyklus beim Roggen (*Secale cereale*)**

Mitose/MeioseII	Frühe Prophase		Prophase		Metaphase		Anaphase	
Meiose I	Leptotän Pachytän		Diplotän		Diakinese Metaphase I		Anaphase I	
Chromosomen	Länge µm ± s	Durch- messer nm ± s	Länge µm ± s	Durch- messer nm ± s	Länge µm ± s	Durch- messer nm ± s	Länge µm ± s	Durch- messer nm ± s
Mitose*	35,6	1000±50	22,1	870±300	12,4	1450±300	11,4	550±47
Meiose I*	74,0	305±83	24,2	734±288	7,12	1250±360	5,58	1000± 90
Meiose II*	-	-	7,9	872	6,75	915	-	-

\* = nicht-synchronisierter Zellzyklus (ohne Eiswasserbehandlung, HU und APM)

s = Standardabweichung

### ***3.6.5. Hochauflösende Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen des Roggens im REM***

Bei Hochauflösung zeigen mitotische und meiotische Chromosomen im REM übereinstimmend eine komplexe Organisation der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen, wobei der Durchmesser der individuellen Fibrillenklassen von 10 nm – 20 nm bzw. 30 nm – 43 nm variiert. In allen Stadien kommt die 30 nm-Fibrille dominant vor. Die 10 nm-Fibrille korreliert mit dem Durchmesser der Elementarfibrille (= Nukleosomenkette) und dem von „Matrixfibrillen“ (WANNER und FORMANEK, 2000), während die 30 nm-Fibrille der nächst höheren Kondensationsform, dem Solenoid, entspricht. Die Oberfläche der 30 nm-Fibrille weist zahlreiche Strukturvarianten auf, die bei einer 30 000-fachen Vergrößerung in Interphasen deutlich sichtbar werden, wie

- glatte Oberflächenstruktur,
- Verdickungen (15 nm – 20 nm), die meist in regelmäßigen Abständen von 45 nm wiederkehren,
- etwa 36 nm große, knöpfchenartige Strukturen, die häufig mit der 30 nm-Fibrille assoziiert sind,
- kleine Schlaufen einzelner 30 nm-Fibrillen,
- Verknäuelungen, die zu kleineren Knötchen von etwa 50 nm – 100 nm im Durchmesser führen,
- Verdrillungen zweier Fibrillen umeinander und
- Fusionen zweier Fibrillen, die eine neue Fibrille mit 45 nm im Durchmesser bilden.

Geknäuelte Einheiten der 30 nm-Fibrille, die Chromomere, stellen die nächst höhere Kondensationsform der 30 nm-Fibrillen dar. Im Gegensatz zur Mitose bilden diese meist abgeflachte und langgestreckte Chromatinverdichtungen von 100 nm – 400 nm im Durchmesser aus, die als charakteristische Elemente die Oberflächen aller frühen Prophasen der Meiose I prägen. In allen Prophasen zeigen meiotische Chromosomen eine zur Mitose vergleichbare, alternierende Organisation von Chromomeren und kurzen, parallel orientierten Längsfibrillen. Im weiteren Verlauf der Kondensation unterscheidet sich die Chromatinorganisation mitotischer und meiotischer Chromosomen. Während in der Mitose im Verlauf der Kondensation bis zur Metaphase Chromomere ausgeprägt werden, findet in der Meiose I und II eine Verdichtung des Chromatins ohne sichtbare Beteiligung bzw. Ausprägung von Chromomeren statt. Parallele Fibrillen oder Konstriktionen im Centromer und NOR können weder in der Meiose I noch in der Meiose II beobachtet werden (Tabelle 4, Seite 100).

#### ***Interphase***

Prämeiotische Interphasekerne zeigen ein komplexes Netzwerk von 10 nm- und 30 nm-Fibrillen (Abbildung nicht gezeigt). Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Analyse ist keine eindeutige Unterscheidung der eu- und heterochromatischen Bereichen möglich. Chromomer-ähnliche Strukturen aus überwiegend geknäuelten Fibrillen mit einem Durchmesser von 0,36 – 1,3  $\mu\text{m}$

waren durch gebündelte, parallele 30 nm-Fibrillen (Abb. 103) und andere Strukturelemente miteinander verbunden. Vereinzelt können Chromatinschlaufen mit einem Durchmesser von 200 nm – 580 nm beobachtet werden. Interstitiell werden chromatinfreie Zwischenräume sichtbar, deren Durchmesser von 200 nm – 600 nm variiert. Im frühen Leptotän sind kurze Abschnitte fädiger Chromosomenstrukturen mit einem Durchmesser von 360 nm erkennbar (Abb. 104). Auf Grund der komplexen, Interphase-ähnlichen Organisation kann keine Differenzierung getroffen werden, ob es sich dabei um Chromosomen, gepaarte Homologe oder individuelle Chromatiden handelt. Die Fibrillen sind überwiegend geknäuelte und werden durch kurze parallele Segmente unterbrochen.

### ***Leptotän***

Im weiteren Verlauf der Kondensation von Leptotän bis Pachytän treten Chromomere auf, wie sie auch für mitotische Prophasen charakteristisch sind. Die Chromosomendurchmesser der frühen Prophasestadien nimmt dabei von 300 nm auf 500 nm zu, bleibt jedoch insgesamt gegenüber korrelierenden mitotischen Stadien mit 900 nm – 1000 nm deutlich reduziert. Gleichfalls ist das Chromatin in Prophasen der Meiose I dichter gepackt als in der Mitose.

### ***Zygotän***

Bei höherer Vergrößerung können im Zygotän charakteristische gepaarte und ungepaarte homologe Chromosomen (Abb. 105) aber auch eine Vielzahl an Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen beobachtet werden (Abb. 105). Eine knotige Strukturierung der Chromosomen, in denen die Chromatinfibrillen bevorzugt schlaufenförmig oder geknäuelte organisiert sind, kann insbesondere in Bereichen mit größerem Chromosomendurchmesser beobachtet werden (Abb. 106). In Bereichen mit geringerem Durchmesser kann dagegen eine longitudinale Ausrichtung der Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 106). An einigen wenigen Stellen sind Chromatinstränge von 50 nm – 150 nm Durchmesser sichtbar, die mit dem homologen Chromosom interagieren (Abb. 104). Im Paarungsbereich ist zwischen den beiden Homologen ein fibrilläres Netzwerk aus 10 nm- und 30 nm-Fibrillen erkennbar. An einer Bruchstelle wird der strukturelle Aufbau eines Chromatids aus vier parallelen 30 nm-Fibrillen sichtbar.

### ***Pachytän***

Im Pachytän sind die parental Chromosomen so eng gepaart, daß sie eine „chromosomale Einheit“ bilden und kaum noch unterschieden werden können (Abb. 107). Im Gegensatz zu LM- und zu REM-Analysen bei geringer Vergrößerung werden bei höherer Auflösung erstmals kurze Abschnitte (wenige 100 nm) unvollständig gepaarter Homologen sichtbar (Abb. 108). Diese Bereiche weisen meist eine parallele Fibrillenorganisation auf. Vereinzelt können wie im Zygotän beim Übergang zum Paarungsbereich ein Netzwerk aus 10 nm- und 30 nm-Fibrillen zwischen den homologen Chromosomen nachgewiesen werden. In Bereichen vollständig gepaarter homologer Chromosomen ist kein Einblick in den synaptonemalen Komplex (SC) möglich. Der

Durchmesser gepaarter Chromosomen, der mit 500 nm relativ konstant ist, bleibt im Vergleich zu ungepaarten Chromosomen mit 360 nm um mehr als 10% reduziert. Dies deutet auf eine enge Verknüpfung der gepaarten Homologen hin. Neben der Konjugation homologer Chromosomen (Abb. 109) können auch mehrere Interaktionen zwischen nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 109). Diese bestehen aus Strängen von zwei oder mehreren 30 nm-Fibrillen. Das Chromatin des Pachytäns erscheint im Vergleich zu dem des Zygotäns verdichtet, wobei die Chromomere meist abflachen. Einzelne Telomere, die aus dicht geknäuelten Fibrillen bestehen, sind charakteristisch keulenförmig verdickt (Abb. 110). Eine kappenförmige Organisation vergleichbar mit mitotischen Prophasen kann nicht beobachtet werden.

**Tabelle 4: Strukturelle Organisation in Mitose und Meiose des Roggens (*Secale cereale*) im REM**

Elemente	Centromer/NOR sichtbar				Telomere sichtbar				Chromomere sichtbar				30 nm-Fibrille parallel (p), geknäuelte (c) glatt (g)			
	pro	meta	ana	telo	pro	meta	ana	telo	pro	meta	ana	telo	pro	meta	ana	telo
Mitose	-	+	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+	+/-	-	p/c	p/c	c	g
Meiose I	-	-	-	-	(+)/-	(+)	+	+	+/-	-	-	-	p/c	g	g	g
Meiose II	-	-	-	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-	p/c	c	c	p/c

Pro = Prophase; meta = Metaphase; ana = Anaphase, telo = Telophase; + = vorhanden; +/- nur teilweise sichtbar; - = nicht sichtbar;

**Diplotän**

Das Chromatin des frühen Diplotän ist mit dem des Pachytän vergleichbar und besteht aus überwiegend geknäuelten bis knötchenförmig organisierten Fibrillen. Chromomere (100 nm – 300 nm im Durchmesser) und längsorientierte Fibrillen können nur im frühen Diplotän beobachtet werden (Abb. 111 und 112). Ähnlich wie im Zygotän können gepaarte und ungepaarte Homologe nachgewiesen werden. Der Durchmesser ist mit durchschnittlich 460 nm im frühen Diplotän und bis zu 630 nm im späten Diplotän deutlich erhöht. Bei Hochauflösung werden, wie auch schon im Pachytän, zahlreiche Verbindungen von 30 nm-Fibrillen sichtbar zwischen den

- homologen Chromosomen a und a' (Abb. 109)
- nicht-homologen Chromosomen (a + a') und (b + b'), wenn sie nah benachbart liegen (Abb. 109 sowie Abb. 112);
- innerhalb eines homologen Chromosoms an „nicht-homologen“ Stellen, wenn ein homologes Chromosomenpaar zurückgefaltet ist (Abb. 109)

Im späten Diplotän sind die homologen Chromosomen meist leicht umeinander verdrillt, was zu einem unregelmäßigen Erscheinungsbild führt (Abb. 113). An der Peripherie treten Chromatinbrücken und Chromatinspitzen zwischen den nicht-homologen Chromosomenpaaren ([a + a'] und [b + b']) auf, die aufgrund ihrer Morphologie nicht mit den fibrillären Verbindungen mitotischer Chromosomen korrelieren. Die Chromosomenoberfläche ist

gleichförmig strukturiert, ohne daß Chromomere oder Längsfibrillen auftreten. Bei hoher Vergrößerung und guter Spreitung der Chromosomen sind zwischen den gepaarten homologen Chromosomen [ $a + a'$ ] einzelne 30 nm-Fibrillen sichtbar, die zum anderen Chromosom überwechseln (Abb. 114; Sterne).

### *Diakinese*

In der Diakinese nehmen meiotische Chromosomen mit einem Durchmesser von  $0,72 \mu\text{m} - 1,6 \mu\text{m}$  und einer Länge von  $8 \mu\text{m} - 13 \mu\text{m}$  eine eher unregelmäßige zylindrische Form an.

---

### **Abbildungen 103 – 116: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung (REM) des Meiose I- und II-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*) in Hochauflösung**

**Abbildungen 103 – 104:** Frühes Leptotän: Das Chromatin weist unterschiedlich starke Chromatinverdichtungen auf, die miteinander komplex vernetzt sind (Abb. 101). Bei hoher Vergrößerung werden in den kondensierten Bereichen geknäuelte 30 nm Fibrillen (Sterne) sichtbar. Verbindende Elemente sind häufig von gebündelten Fibrillen organisiert (Pfeile).

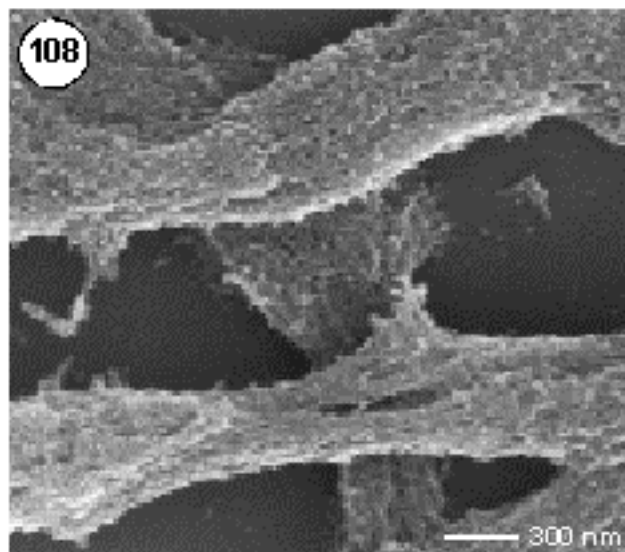
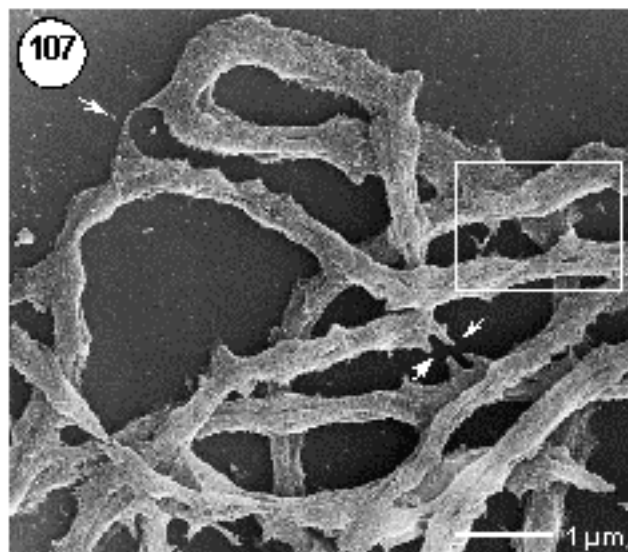
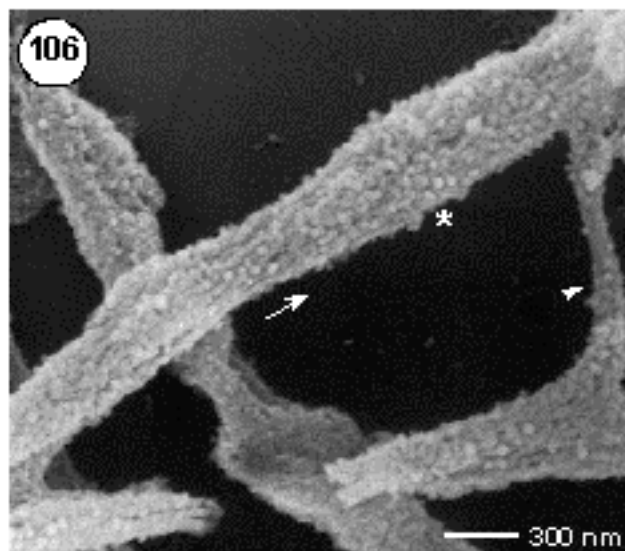
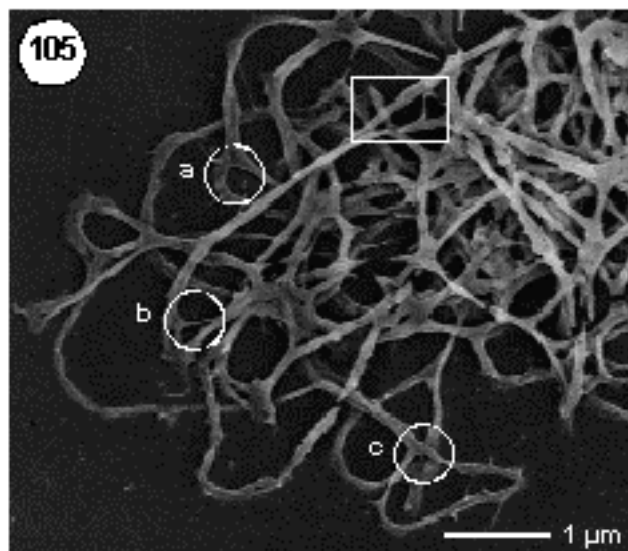
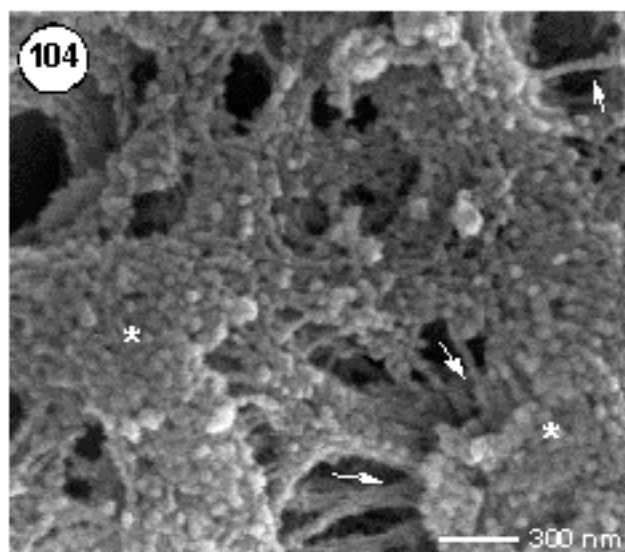
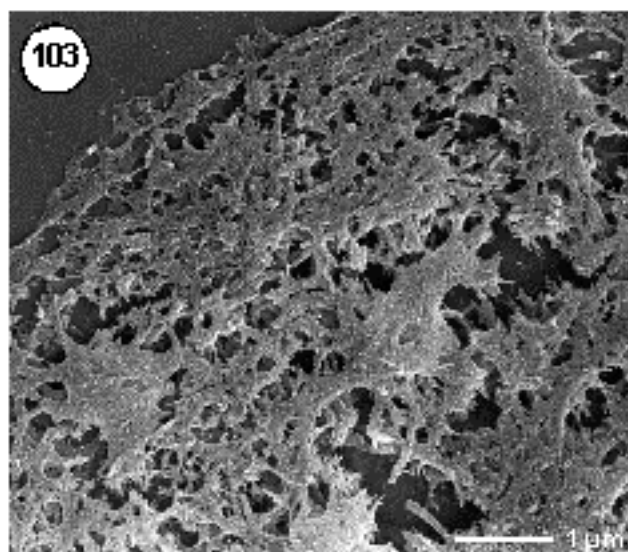
**Abbildungen 105 – 106:** Zygotän: Gepaarte und nicht-gepaarte Homologe werden anhand verzweigter Chromosomen sichtbar (Abb. 105; Kreis a;) An einigen interstitiellen Positionen können Fibrillen zwischen nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 105; Kreis b). Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie können Überlagerungen (Abb. 105; Kreis c) deutlich von Paarungsstrukturen unterschieden. Abbildung 106 (Detail aus Abb. 105) zeigt die Assoziation eines Homologenpaares, wobei eine Chromatide mit dem Homologen interagiert. Bereiche mit geknäuelten (Stern) und längsorientierten Fibrillen (Pfeile) werden sichtbar. An einer Bruchstelle eines Chromosoms wird der Aufbau aus vier 30 nm-Fibrillen sichtbar.

**Abbildungen 107 – 110:** Pachytän: Die Paarung der homologen Chromosomen ist so eng, daß beide Homologen einen einheitlichen Strang bilden. An einigen Stellen werden ungepaarte Bereiche sichtbar (Abb. 107; Rechteck). Mehrfach können (fragile) fibrilläre Verbindungen zwischen den nicht-homologen Chromosomen beobachtet werden (Abb. 107; Pfeile). In Hochauflösung zeigt sich eine dichte Chromatinorganisation. Chromomere können nur selten beobachtet werden. In ungepaarten Abschnitten sind parallele Fibrillen nachweisbar (Abb. 108). Verbindende Fibrillen (Abb. 109; Pfeil) können sowohl innerhalb eines gepaarten Chromosoms auftreten, die zur Schlaufenbildung des gepaarten Homologenpaares ( $a + a'$ ) und ( $a + a'$ ) führen, als auch zwischen nicht-homologen Chromosomen ( $b + b'$ ) und ( $a + a'$ ) nachgewiesen werden (Abb. 109; Pfeil). Frei liegende Telomerbereiche sind keulenförmig verstärkt (Abb. 110).

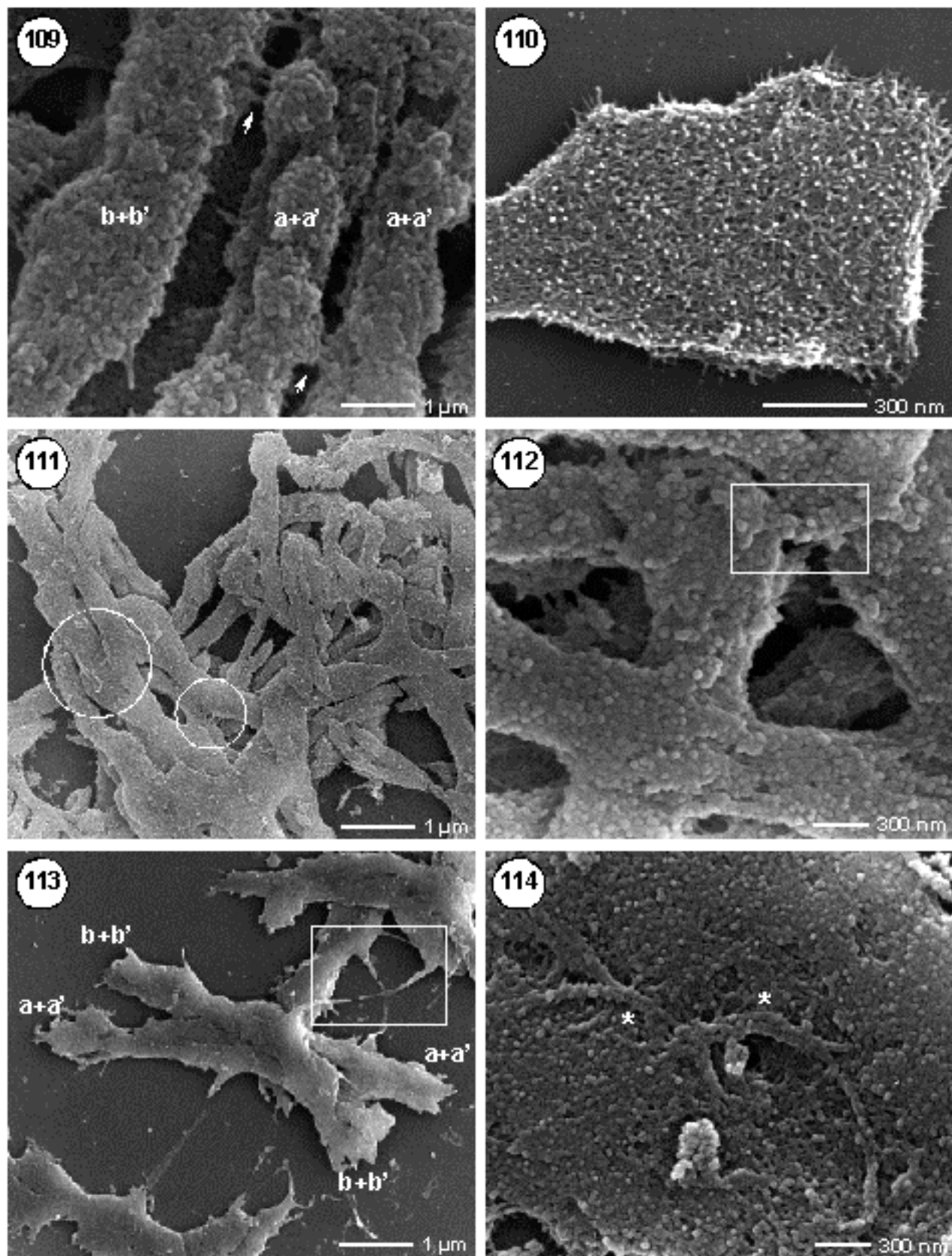
**Abbildungen 111 – 112:** Frühes Diplotän: Die Chromosomen spreiten aufgrund zahlreicher Verbindungen zwischen Homologen und nicht-homologen Chromosomen schlecht (Abb. 111; Kreise). Das Chromatin ist kompakt verdichtet. Parallele Fibrillen können vereinzelt beobachtet werden. Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen von  $50 - 100 \text{ nm}$  im Durchmesser werden sichtbar (Abb. 112; Rechteck).

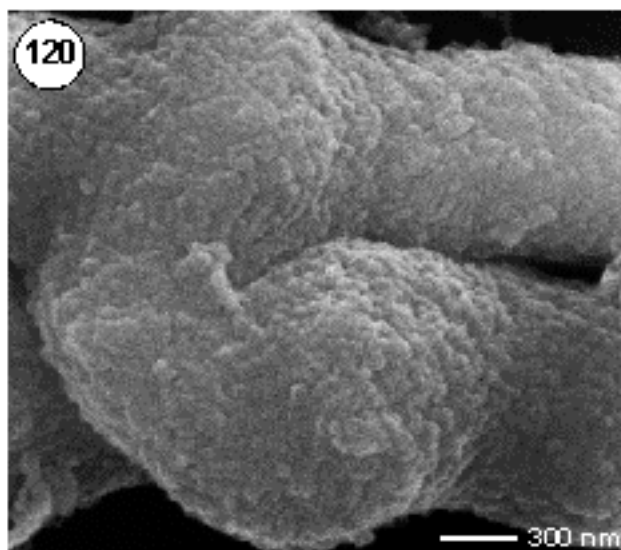
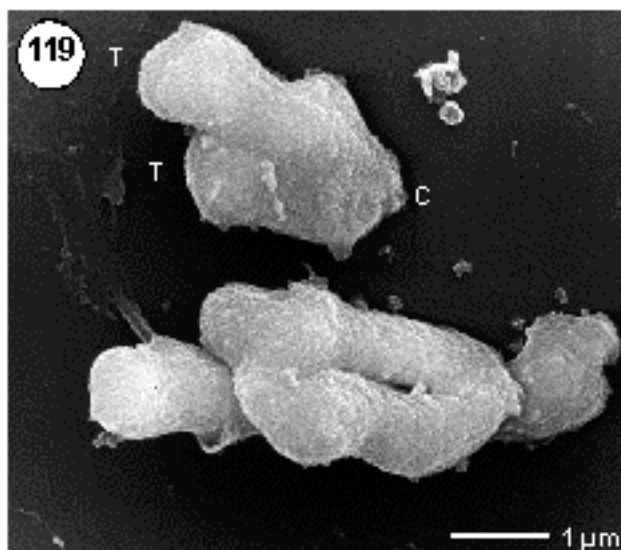
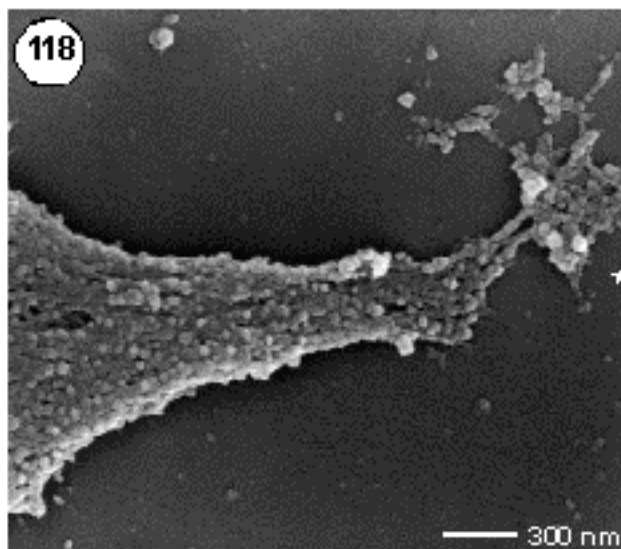
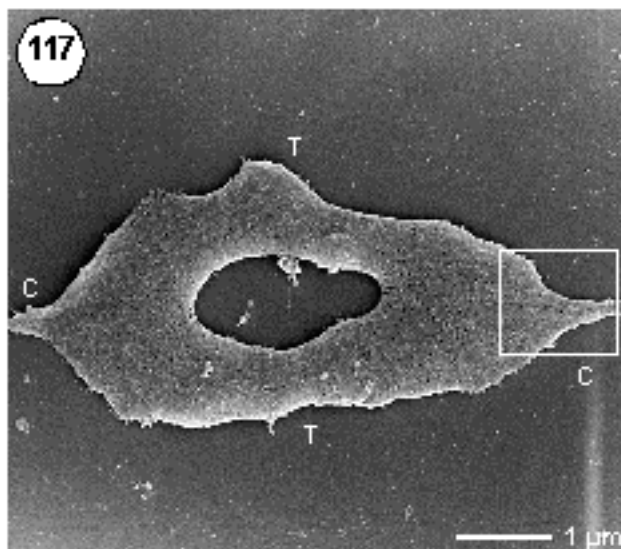
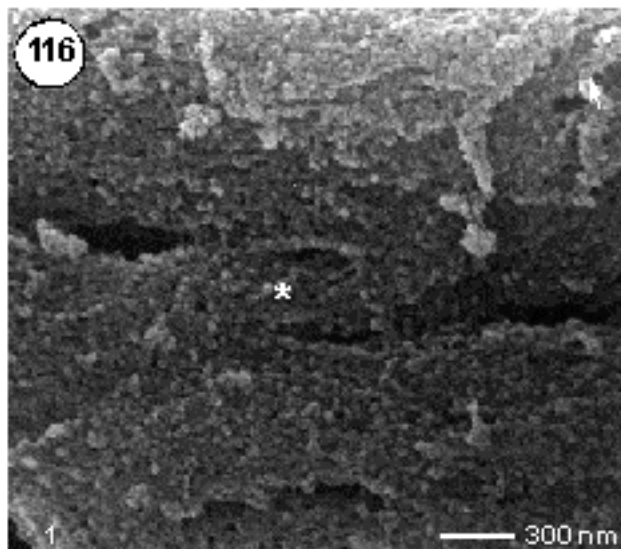
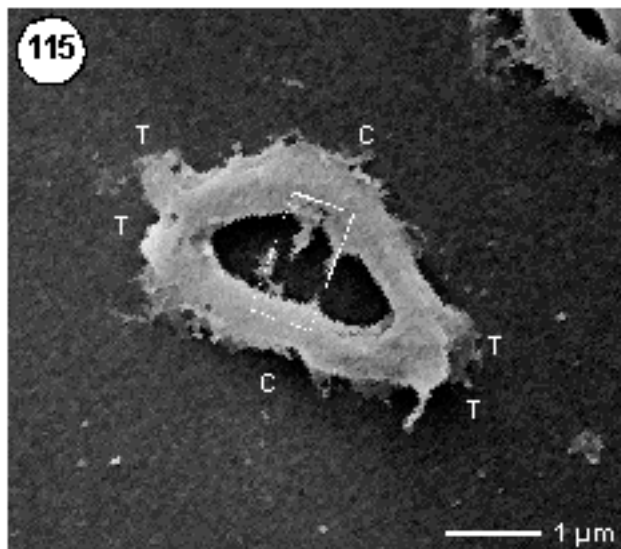
**Abbildungen 113 – 114:** Spätes Diplotän: Die Homologen ( $a + a'$ ) und ( $b + b'$ ) stehen in engem Kontakt zueinander und liegen häufig verdreht (Abb. 113). Individuelle Telomere (T) können nur schlecht unterschieden werden. Zwischen nicht-homologen Chromosomen treten charakteristische fibrilläre Verbindungen auf (Abb. 111; Rechteck). Bei höherer Vergrößerung können verbindende Chromatinstränge von 30 nm Durchmesser zwischen den individuellen Homologen nachgewiesen werden (Abb. 114; Sterne).

**Abbildungen 115 – 116:** Diakinese: Die Separation der Chromosomen erfolgt interstitiell während Telomerbereich gepaart bleiben. Verbindende Fibrillen können zwischen den segregierenden Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 115, Rechteck). Bei hoher Vergrößerung wird ein Chromatinstrang sichtbar, der im Bereich eines Chiasma von einem Homologen zu dem anderen Homologen übergeht (Abb. 116; Stern).









Im Gegensatz zu Chromosomen der mitotischen Prometaphase sind bei meiotischen Chromosomen keine Konstriktionen im Centromer oder NOR vorhanden. Längsorientierte Fibrillen, wie sie für Konstriktionsbereiche charakteristisch sind, können nicht beobachtet werden (Abb. 115). An der Chromosomenoberfläche sind noch bestehende Chromatinbrücken zu benachbarten, nicht-homologen Chromosomen, sowie Relikte solcher Verbindungen als Chromatinfäden an der Peripherie sichtbar. Das Chromatin ist stark verdichtet. In terminalen Bereichen werden verbindende Chromatinstränge zwischen den sich trennenden Homologen sichtbar, deren Durchmesser deutlich kleiner ist als der eines Chromatids (Abb. 116).

### ***Metaphase I***

In der Metaphase I verändert sich die Struktur der Chromosomenoberfläche beträchtlich. Die Chromatinfibrillen sind so eng gepackt, daß die Chromosomenoberfläche glatt erscheint und keine signifikanten Details mehr zeigt (Abb. 117). Im Gegensatz zu mitotischen Chromosomen der Gerste und des Roggens können weder Konstriktionsbereiche noch Chromomere bzw.

---

### **Abbildungen 117 – 128: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung (REM) des Meiose I- und II-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*) in Hochauflösung**

**Abbildungen 117 – 118:** Metaphase I: Bivalent gepaarte Chromosomen sind im Telomerbereich miteinander verbunden (T). Im Centromerbereich (C) sind dünne herausgezogene Fibrillen sichtbar (Abb. 117). Konstriktionen sind nicht nachweisbar. Die Chromosomenoberfläche ist weitgehend glatt. Die Kinetochorregion ist anhand herausgezogener Fibrillen erkennbar (Abb. 118 = Detail aus Abb. 117). Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen werden deutlich.

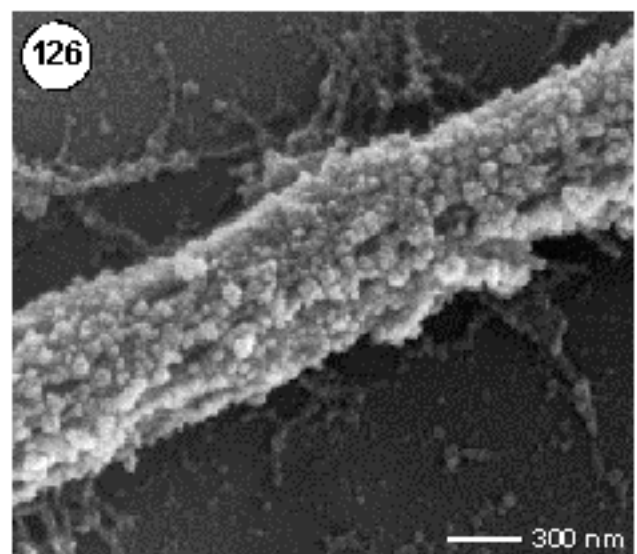
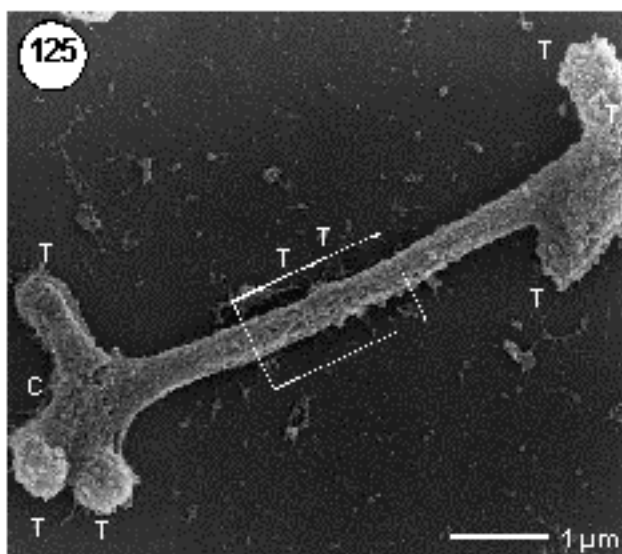
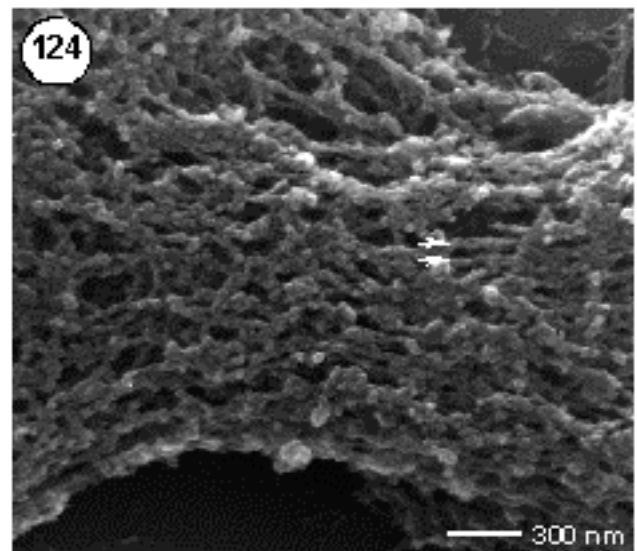
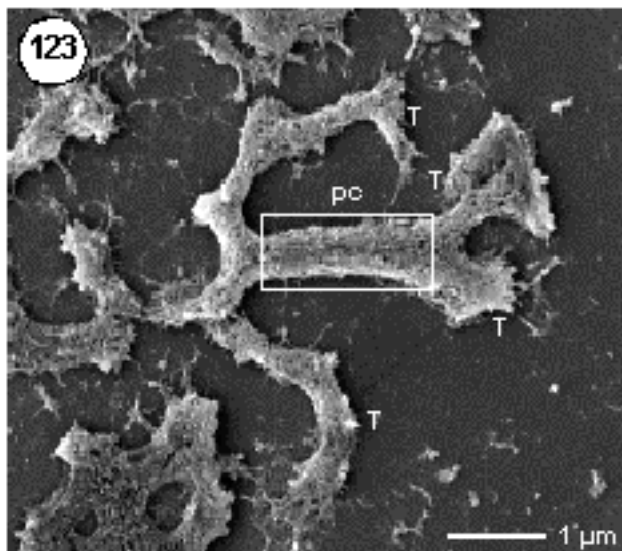
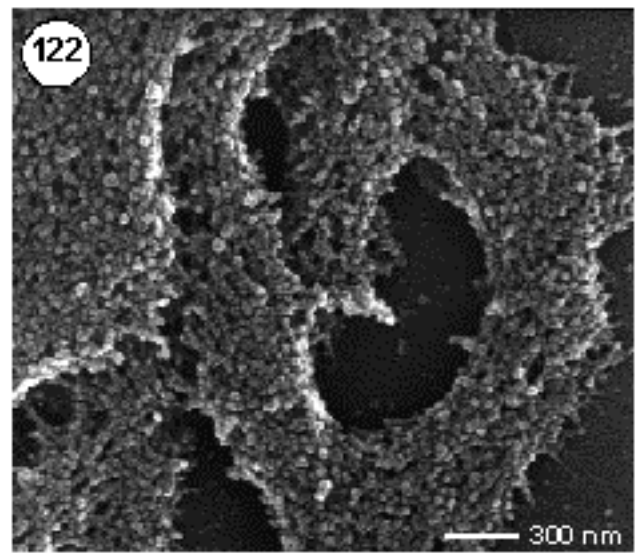
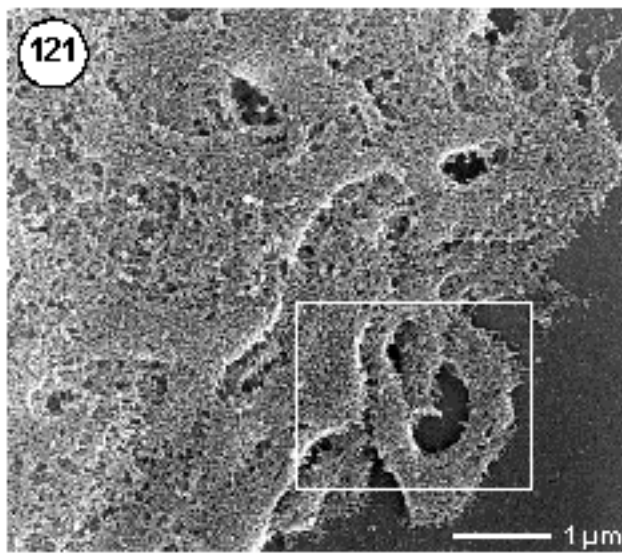
**Abbildungen 119 – 120:** Anaphase I: Die Chromosomen sind stark verkürzt und u-förmig (Abb. 119; T = Telomer, C = Centromerbereich). Die Chromosomenoberfläche ist gleichmäßig glatt und gibt keine Details wieder (Abb. 120 = Detail aus Abb. 119).

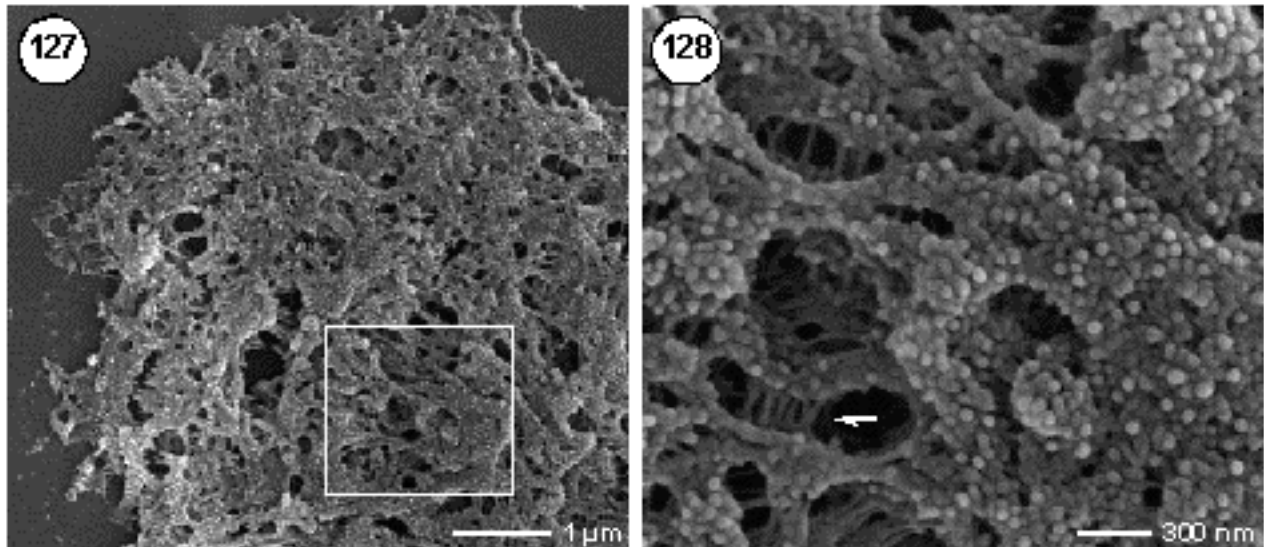
**Abbildungen 121 – 122:** Interkinese: Die Chromosomen sind vollständig dekondensiert und stark abgeflacht (Abb. 119). Nur vereinzelt werden Chromosomenfäden sichtbar. Die 30 nm-Fibrillen sind überwiegend geknäuel (Abb. 122 = Detail aus Abb. 121).

**Abbildungen 123 – 124:** Prophase II: Die Chromatiden sind mit Ausnahme des perizentrischen Bereiches (PC) getrennt. Individuellen Chromatidenarme sind geknickt und sind abgeflacht (Abb. 123; T = Telomer einer individuellen Chromatide). Die Chromatinfibrillen sind geknäuel, wobei nur kurze Segmente mit parallelen Fibrillen sichtbar werden (Abb. 124; Pfeile).

**Abbildungen 125 – 126:** Metaphase II: Die Chromosomen sind maximal kondensiert und zeigen eine x-förmige Struktur (Abb. 125; C = Centromerbereich; T = Telomer). Ein fusioniertes Telomer weist auf ein Translokationsereignis zwischen den distalen Bereichen nicht-homologer Chromosomen hin (Abbildung 124; Rechteck). Bei höherer Vergrößerung wird die strukturelle Kontinuität im Bereich der Fusionsichtbar, die keine Unterscheidung individueller Telomere ermöglicht (Abb. 126).

**Abbildungen 127 – 128:** Interphase (Detail einer Tetrade): Die Chromosomen sind vollständig dekondensiert und bilden ein lockeres Netzwerk (Abb. 127; Rechteck). Bei hoher Vergrößerung werden Bereiche mit geknäuelten Fibrillen sichtbar (Abb. 128). Zahlreiche 10 nm- und 30 nm-Fibrillen sind parallel organisiert (Pfeil) und verbinden Chromomere-ähnliche Strukturen.





parallel angeordnete Fibrillen nachgewiesen werden. Im Telomerbereich sind die homologen Chromosomen so vollständig konjugiert, daß individuelle Chromosomen nicht mehr unterschieden werden können. Der Chromosomendurchmesser schwankt von 1,3 µm bis zu 2 µm, wobei insbesondere im Centromerbereich und im Paarungsbereich der Telomere ein vergrößerter Durchmesser auftritt. Obwohl der Spindelfaserapparat während der Fixierung zerstört wurde, geben die herausgezogenen Fibrillen im möglichen Centromerbereich einen ultrastrukturellen Hinweis auf die Kinetochorregion (Abb. 118). Die herausgezogenen 30 nm-Fibrillen zeigen dabei charakteristische Sekundärstrukturen. Bei guter Spreitung lassen sich Details der Fibrillen erkennen, wie z.B. knotige Sekundärstrukturen, kleinere Schlaufen oder Fusionen zweier 30 nm-Fibrillen zu einer Fibrille mit 45 nm Durchmesser, wie sie auch in weniger kondensierten Prophasen nachweisbar sind.

### *Anaphase I und Telophase I*

In der Ana- und Telophase I ist die Chromosomenoberfläche ebenfalls glatt und zeigt keinerlei Strukturdetails (Abb. 119 und 120). Konstriktionen können nicht nachgewiesen werden. In der Telophase I wird häufig am distalen Ende eine frühe Trennung der individuellen Chromatiden deutlich (siehe auch Abb. 169 und 170).

### *Interkinese*

In der Interkinese sind die Chromosomen unvollständig dekonduziert, so daß kürzere Abschnitte von Chromosomenfäden von 0,6 µm – 1,17 µm Durchmesser nachweisbar sind (Abb. 121). Die Chromosomen bestehen aus überwiegend geknäuelten Fibrillen, ohne daß Chromomere auftreten. Parallel angeordnete Fibrillen können nur vereinzelt nachgewiesen werden (Abb. 122).

### ***Prophase II***

In der Prophase II zeigt sich deutlich, daß die individuellen Chromatiden bis auf einen breiten, perizentrischen Bereich getrennt sind (Abb. 123). Die Chromosomenstruktur ist im Vergleich zu meiotischen Prophase I-Stadien deutlich aufgelockert. Chromomere wie sie in den Prophasen von Meiose I und der Mitose auftreten, können nicht beobachtet werden. Längsfibrillen sind nur als kurze, eingestreute Segmente in der komplexen, netzartigen Fibrillenorganisation sichtbar (Abb. 124).

### ***Metaphase II***

In der Metaphase II sind die Chromatiden verstärkt kondensiert (Abb. 125). Konstriktionen oder parallele Fibrillen können weder im Centromer noch im NOR nachgewiesen werden. Die Chromosomenoberfläche besteht aus einer kompakten Organisation meist geknäuelter 30 nm-Fibrillen (Abb. 125 und 126). Abbildung 126 gibt den Bereich eines Chromatids wieder, an dem ein Translokationsereignis stattgefunden hat. Die Konjugation ist hier so vollständig, daß individuelle Chromatiden nicht mehr nachgewiesen werden können.

### ***Telophase II***

In der Telophase II sind die Chromosomen fast vollständig decondensiert, so daß individuelle Chromosomenfäden nicht unterschieden werden können. Das Chromatin zeigt eine Interphase-ähnliche Organisation (Abb. 127). In Hochauflösung werden erneut parallel angeordnete Fibrillen sichtbar, welche Bereiche mit Chromatinverdichtungen verbinden (Abb. 128). Strukturvarianten der 30 nm-Fibrillen, wie Fusionen, Verdrillungen und knötchenförmige Strukturen werden erneut sichtbar.

### ***3.6.6. DNA-Nachweis meiotischer Chromosomen des Roggens mit Platinblau im REM***

Die Platinblau-Färbung, die zum spezifischen DNA-Nachweis mitotischer Chromosomen im REM entwickelt wurde (FORMANEK und WANNER, 1997; WANNER und FORMANEK, 2000), ermöglicht in allen meiotischen Stadien des Roggens (*Secale cereale*) eine Unterscheidung von DNA- und Proteinfibrillen. In gering kondensierten Stadien ist so ein Einblick in den strukturellen Aufbau der Chromosomen (Abb. 129 – 156 und 171 – 174) möglich, während im kondensierten Zustand die Chromatinverteilung und die Verdichtungsgebiete innerhalb der Chromosomen dargestellt werden können (Abb. 159 – 170 und 175 – 178). Die Rückstreusignale (BSE-Signal) des DNA-gebundenen Platinblaus werden dem Sekundärelektronenbild (SE-Signal) der Oberflächenstrukturen (DNA und Proteine) der Chromosomen gegenübergestellt und miteinander verglichen. Durch eine Übereinanderlagerung der SE-Signale mit dem BSE-Bild ist bei hoher Vergrößerung eine Unterscheidung von Protein und DNA-Fibrillen in den Paarungsabschnitten möglich. Fibrillen, die kein Signal aufweisen, werden als Proteinfibrillen betrachtet und können von DNA-Fibrillen (Abb. 131, 134, 137 und 138; Pfeilspitze) unterschieden werden. Insgesamt erscheinen die Chromosomen im BSE-Bild weniger kompakt

als im SE-Bild. Regelmäßige helikale Verdichtungen, wie sie für das „radial loop“-Modell oder die supersolenoidalen Chromosomenmodelle postuliert werden, können weder in den gering kondensierten noch im kompakten Zustand der Metaphase beobachtet werden.

### ***Leptotän***

Im Leptotän kann nach der Platinblau-Kontrastierung im BSE-Bild, im Gegensatz zur SE-Darstellung, ein aufgelockertes Chromosomenknäuel dargestellt werden (Abb. 129 und 130). Bei hoher Vergrößerung werden kurze Abschnitte individueller Chromosomen sichtbar. Während im SE-Bild die 30 nm-Fibrillen geknäuel erscheinen, wird im BSE-Bild eine netzartige Organisation sichtbar (Abb. 131 und 132). In Hochauflösung zeigt sich die gute Korrelation der SE- und BSE-Signale. Einzelne kleinere Verdichtungsgebiete werden im BSE-Bild sichtbar, die in der SE-Darstellung verborgen bleiben (Abb. 133 und 134).

### ***Zygotän***

Im Zygotän können Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen deutlich als SE-Signal nachgewiesen werden, so daß diese Strukturen als Chromatinfibrillen interpretiert werden (Abb. 135 und 136). Die Homologen sind locker assoziiert, so daß noch individuelle homologe Chromosomen in SE- und BSE-Bild unterschieden werden können. Einige Bereiche mit geknäuelten Fibrillen (Chromomere) zeigen im BSE-Bild verstärkte Signale nach der Platinblau-Färbung. Verstärkte SE-Signale der Chromomerstrukturen lassen sich auf eine Verdichtung von Fibrillen in diesen Bereichen zurückführen (Abb. 135 und 136). Die Chromatinstruktur erscheint im BSE-Bild im Gegensatz zur SE-Darstellung deutlich aufgelockert. In Hochauflösung können DNA-haltige (Abb. 139 und 140) und nicht-DNA-haltige Fibrillen (Abb. 139 und 140) unterschieden werden.

### ***Pachytän***

Im Pachytän können ungepaarte Chromosomen als BSE-Signale besser dargestellt werden als im SE-Bild (Abb. 141 und 142). Nach Platinblau zeigen die gepaarten Homologen unterschiedliche Verdichtungsgebiete entlang der Chromosomen. In den Abbildungen 143 und 144 wird die Assoziation eines Telomerbereiches an interstitiellen Positionen eines nicht-homologen Chromosoms sichtbar, wobei die fibrillären Verbindungen mit Platinblau deutlich positive Signale zeigen. In Hochauflösung wird deutlich sichtbar, daß die enge Konjugation der Homologen überwiegend im Bereich der Chromomere besteht. Die starken SE-Signale der Chromomerstruktur weisen auf Chromatinverdichtungen in den Paarungsbereichen hin (Abb. 145 und 146). In Abschnitten mit längsorientierten Fibrillen sind die Homologen meist ungepaart. Der Verlauf einzelner homologer Chromosomen oder individueller Chromatiden in den Paarungsabschnitten ist nicht erkennbar. Ebenso können mit Platinblau keine SC-Strukturen dargestellt werden, die den Darstellungen der TEM-Analysen entsprechen.

### ***Diplotän***

Vom frühen bis zum späten Diplotän wird bei schwacher Vergrößerung eine unregelmäßige DNA-Verteilung innerhalb der Chromosomen sichtbar, die auf einen verstärkten Kondensationsprozess hindeutet (Abb. 147 und 148). Zwischen den Chromosomen können mit Platinblau Chromatinfibrillen (Abb. 149 — 152) nachgewiesen werden, die diese nicht-homologen Chromosomen miteinander verbinden. Individuelle homologe Chromosomen können auch bei hoher Vergrößerung kaum unterschieden werden (Abb. 151 – 152).

Im späten Diplotän ist die Chromosomenmorphologie sehr unregelmäßig. Im SE-Bild erscheinen kurze Segmente verstärkt kondensiert und zeigen im BSE-Bild mit Platinblau verstärkte Signale (Abb. 153 – 154). Mehrere freiliegende Telomere (T) werden sichtbar. Im Bereich eines gut gespreiteten Chromosomenabschnitts wird eine komplexe Fibrillentextur sichtbar, die keinen regelmäßigen Aufbau erkennen lässt (Abb. 155 und 156). Noch bestehende Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen weisen deutliche Platinblau-Signale auf (Abb. 157 und 158).

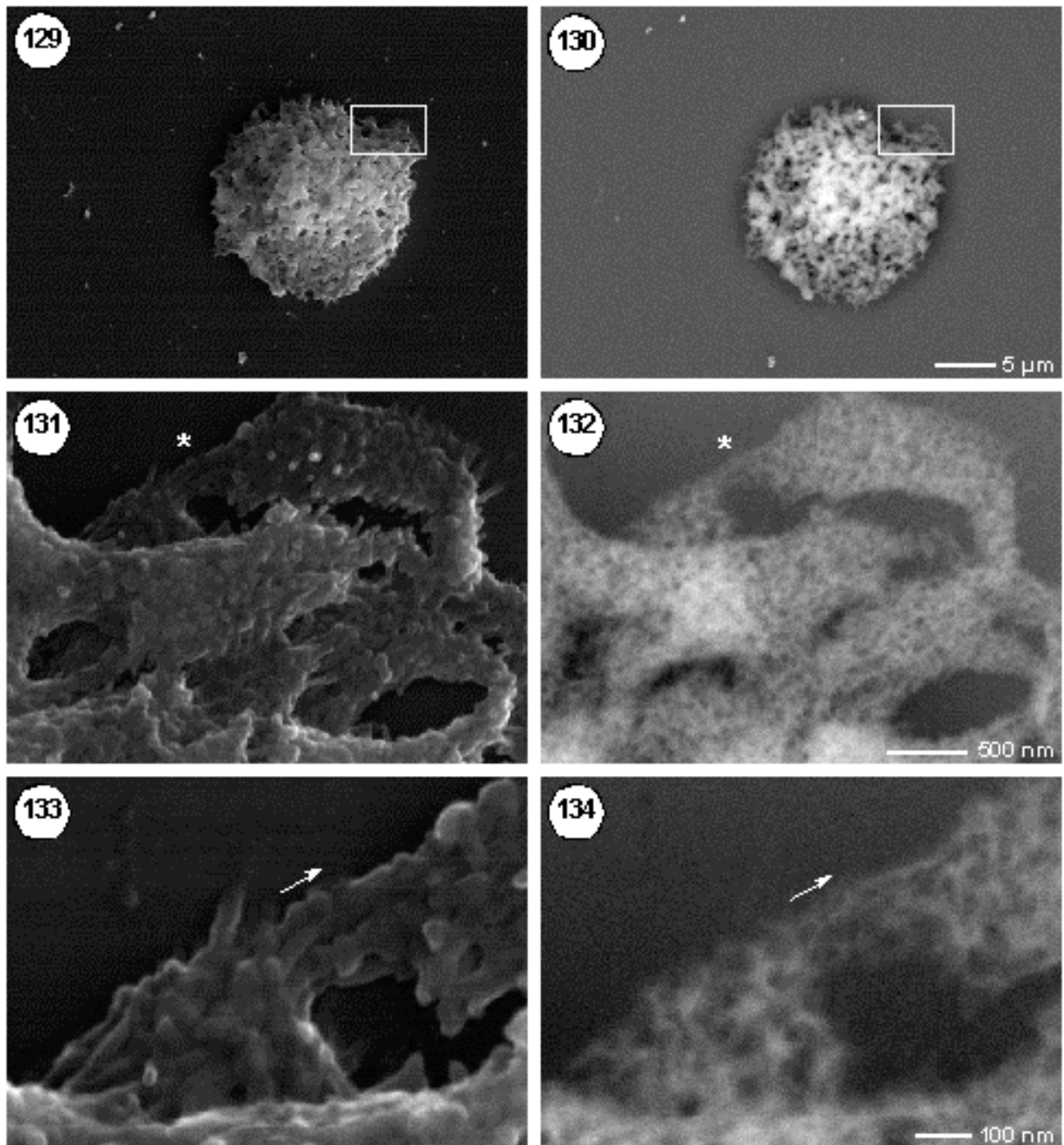
### ***Metaphase I***

In der Metaphase I werden die Chromosomen ungleichmäßig mit Platinblau markiert (Abb. 159 und 160). In terminalen Paarungsbereichen der Homologen treten auf Grund von Chromatinverdichtungen verstärkte Signale auf. Ausstülpungen in der Kinetochorregion (C) können ebenfalls mit Platinblau markiert werden (Abb. 161 und 162; Pfeil). Selbst bei hoher Vergrößerung ist keine parallele Ausrichtung der Fibrillen erkennbar, die einen Hinweis auf eine „Kinetochorplatte“ oder eine „ball and cup“-Organisation ergeben, die für pflanzliche Kinetochor-Regionen beschrieben werden. Im Bereich der terminalisierten „crossover“-Strukturen sind die Telomere miteinander „fusioniert“, so daß eine Unterscheidung individueller Telomerbereiche selbst bei guter Spreitung der Bivalenten nicht möglich ist (Abb. 163 und 164).

### ***Anaphase I***

Mit Beginn der Anaphase werden im Telomerbereich Chromatinfäden sichtbar, die mit Platinblau kontrastiert sind (Abb. 165 und 166; Stern). Im Gegensatz zur mitotischen Anaphase erfolgt die Trennung aller Homologen nicht vollständig synchron, so daß gepaarte und getrennte Homologe nebeneinander nachweisbar sind (Abb. 167 und 168). Auch die Trennung individueller Telomerbereiche erfolgt ungleich, wobei eines der Schwesterchromatiden gepaart, das andere schon getrennt ist und stark verkürzt erscheint (Abb. 169 und 170).



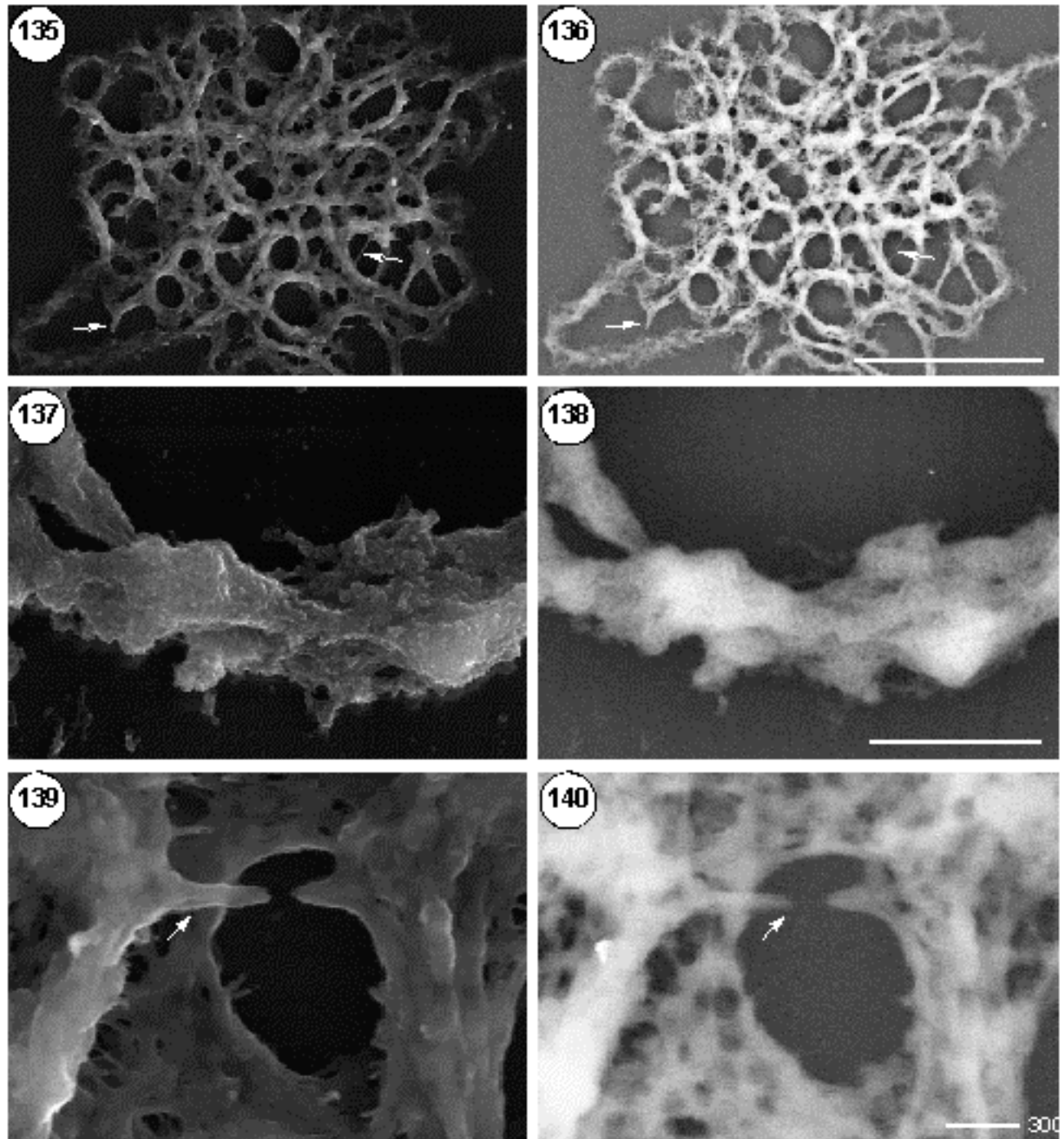


**Abbildungen 129 - 134: REM-Analyse im Leptotän von Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE - (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 129 - 130:** Die Chromosomen sind stark verknäuelst, wobei individuelle Chromosomen nur über kurze Distanzen erkennbar sind. Im SE-Signal erscheint das Chromatin locker gepackt, wobei auch chromatinfreie Zwischenräume sichtbar werden.

**Abbildungen 130 - 132:** Abbildung 130 (Detail aus Abb. 129; Rahmen) gibt den Verlauf individueller Chromosomen wieder, die miteinander in Verbindung stehen. Im BSE-Signal wird eine netzartige Organisation der DNA-Fibrillen sichtbar (Abb. 132).

**Abbildungen 133 - 134:** In Hochauflösung können geknäuelte und parallele Fibrillen unterschieden werden. Bereiche mit längsorientierten Fibrillen korrelieren mit geringerem Chromosomendurchmesser (Abb. 133; Pfeil). Im BSE-Bild wird eine Längsorientierung der Fibrillen (Pfeil) und die komplexe Netzstruktur der geknäuelten DNA-Fibrillen sichtbar (Abb. 134).

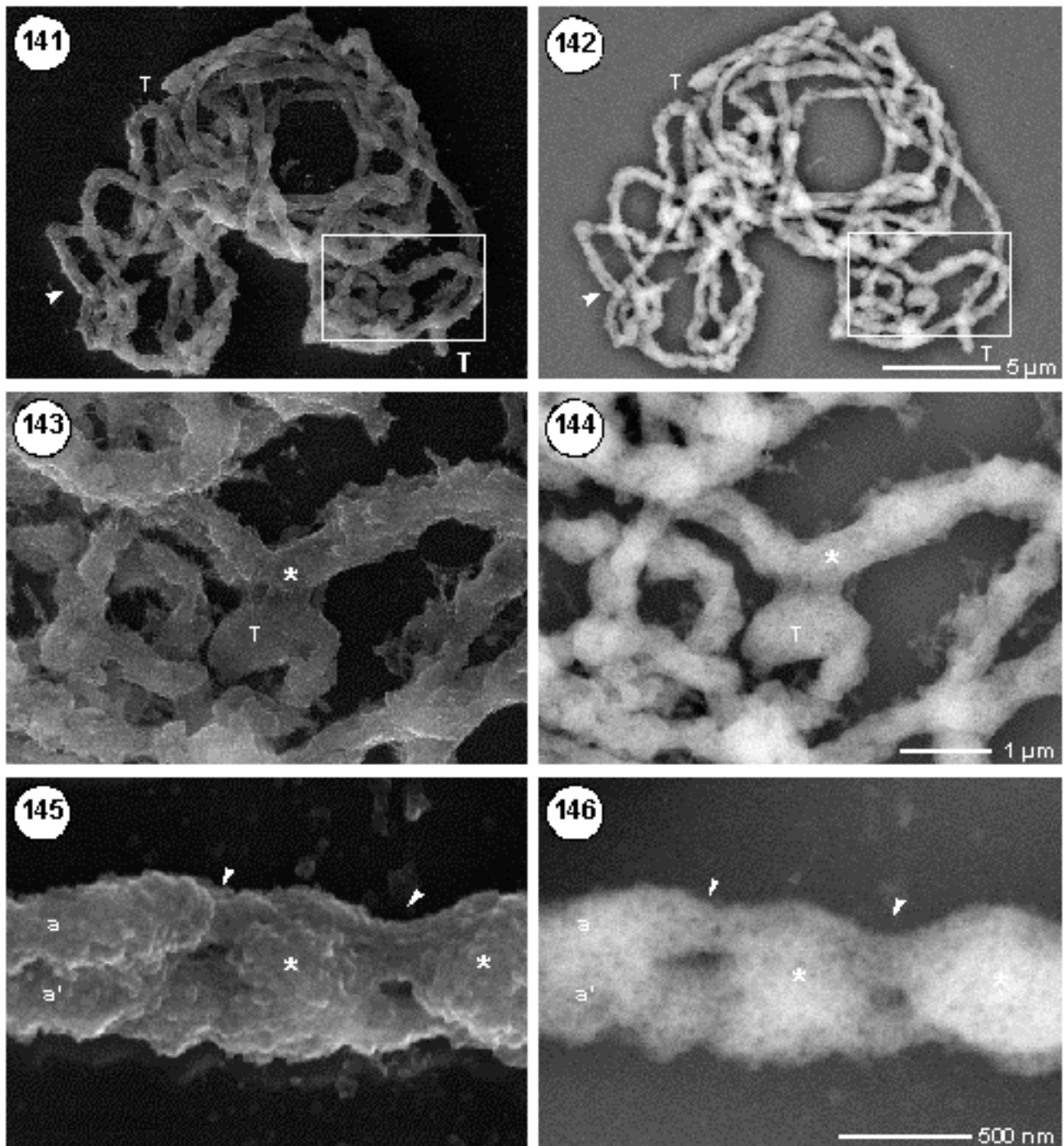


**Abbildungen 135 - 140: REM-Analyse des Zygotän des Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 135 - 136:** Gepaarte und ungepaarte Bereiche homologer Chromosomen sowie Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen (Pfeile) werden sichtbar (Abb. 135). Alle interchromosomalen Verbindungen zeigen deutliche Signale mit Platinblau (Abb. 136; Pfeile).

**Abbildungen 137 - 138:** Im Paarungsbereich sind individuelle homologe Chromosomen deutlich erkennbar (Abb. 137). Im BSE-Bild treten einige Chromosomen deutlich hervor (Abb. 138).

**Abbildungen 139 - 140:** Im SE-Bild (Abb. 139) erscheint das Chromatin dicht gepackt, während in der BSE-Darstellung die Struktur deutlich aufgelockert ist. Interchromosomale Verbindungen werden sichtbar (Pfeil), die im BSE Bild (Abb. 140) Signale tragen. Im Gegensatz zum SE-Bild wird im BSE-Bild der fibrilläre Charakter der Chromosomen deutlich.

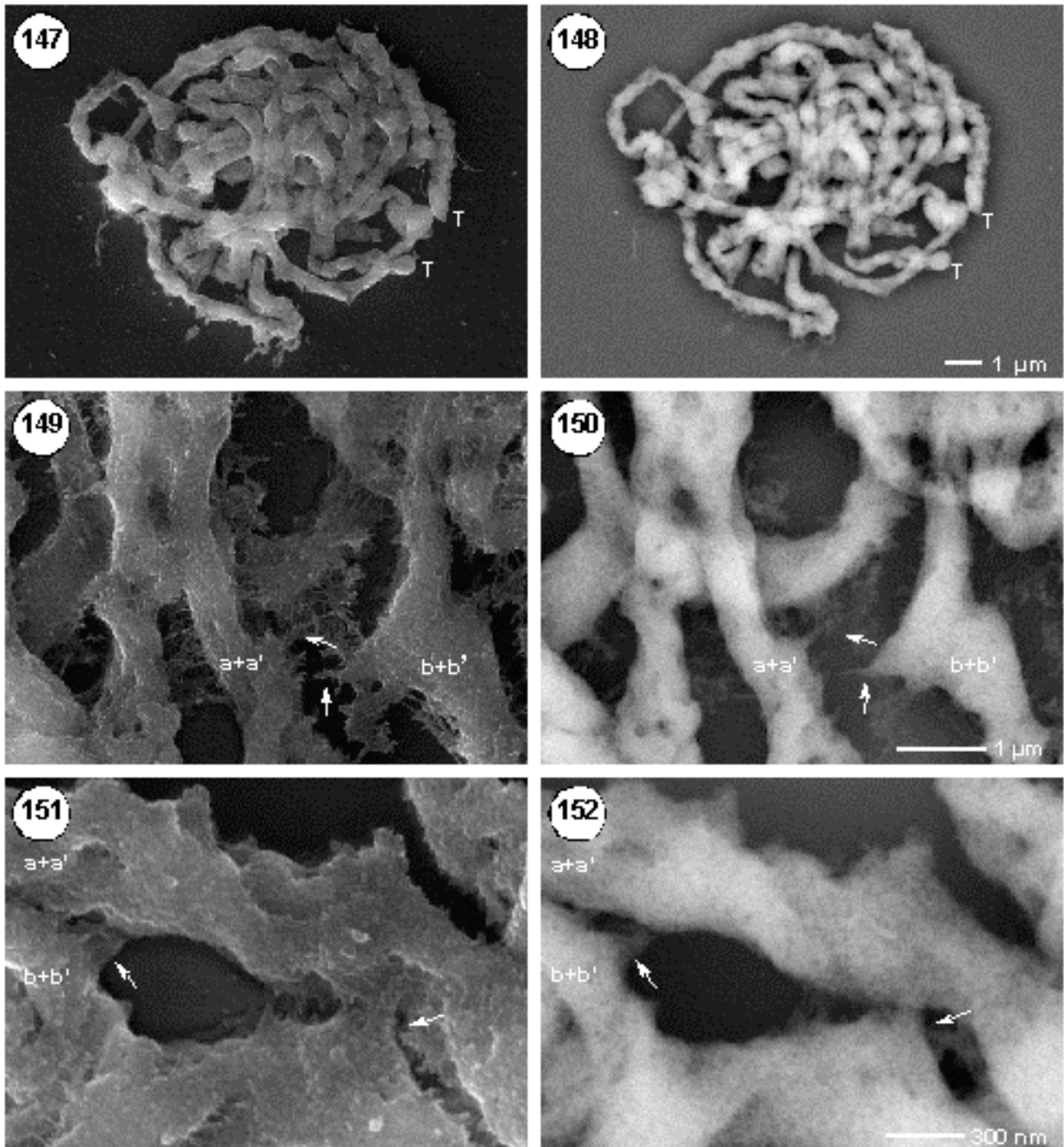


**Abbildungen 141 - 146: REM-Analyse im Pachytän des Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 141 - 142:** Im SE-Bild erscheinen die Chromosomen in der Übersicht vollständig gepaart (T = Telomer). Im BSE-Bild werden Abschnitte mit weniger eng gepaarten Homologen sichtbar (Abb. 142; Pfeil).

**Abbildungen 143 - 144:** Im Detail wird ein kondensierter Telomerbereich (T) sichtbar, der mit interstitiellen nicht-homologen Bereichen in Verbindung steht (Abb. 143; Stern). Die verbindenden Fibrillen zeigen deutliche Signale im BSE-Bild (Abb. 144).

**Abbildungen 145 - 146:** Bei höherer Vergrößerung können alternierend gepaarte und ungepaarte Bereiche homologer Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 145). Gepaarte Regionen korrelieren dabei mit geknäuelten, heterochromatischen Segmenten (Stern), während Regionen mit längsorientierten Fibrillen meist ungepaart (Pfeilspitzen) sind (Abb. 146). In Paarungsabschnitten ist die Assoziation der Homologen so vollständig, dass auch im BSE-Bild kein Einblick in den strukturellen Aufbau des SC möglich ist.

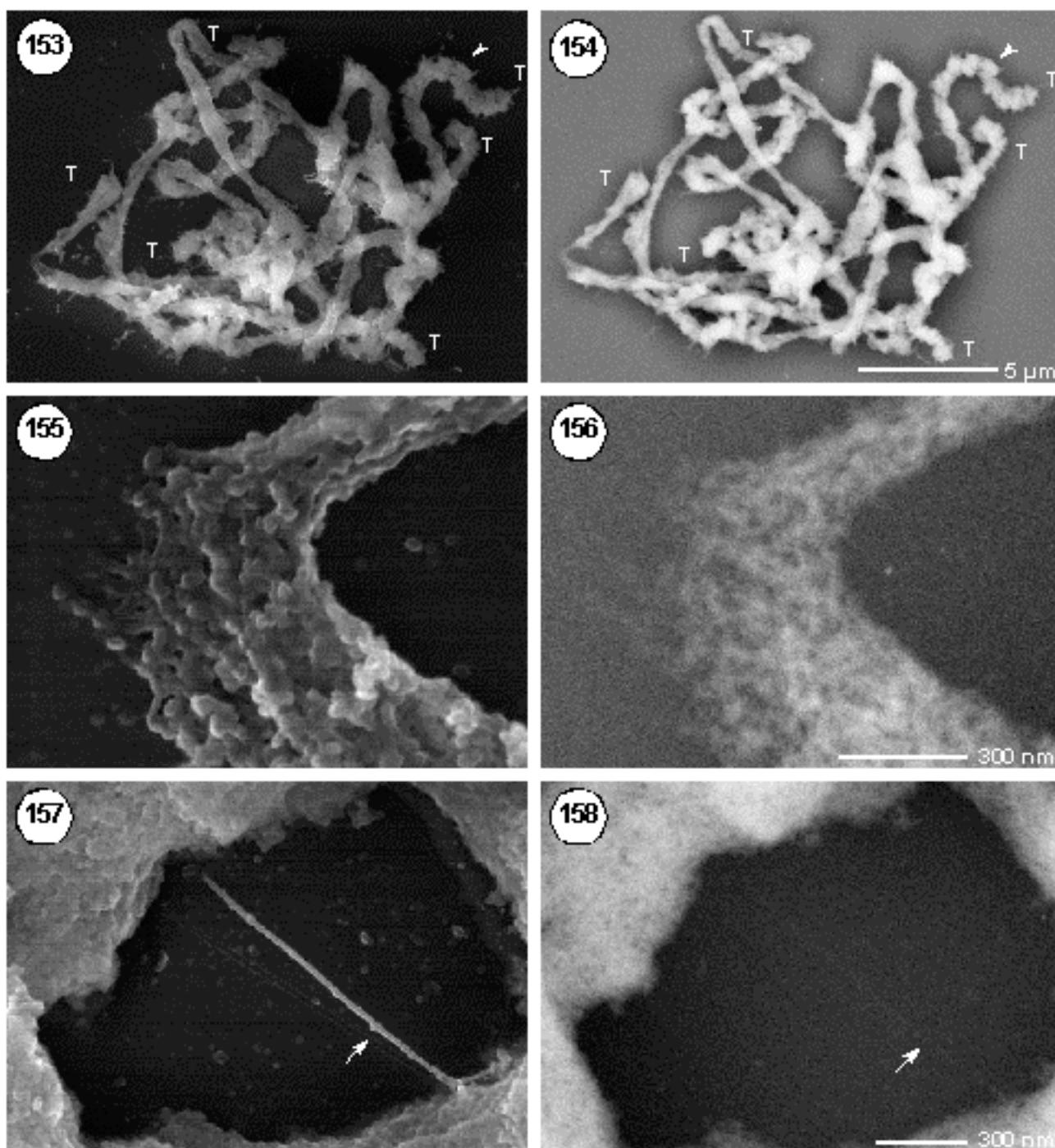


**Abbildungen 147 - 152: REM-Analyse im späten Pachyän des Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 147 - 148:** In der Übersicht werden im SE-Bild eng gepaarte Homologen sichtbar, die nicht unterschieden werden können. Im BSE-Signal wird eine schwache Segmentierung innerhalb der Chromosomendichte und weniger dichte Chromatinbereiche sichtbar (T = Telomere).

**Abbildungen 149 - 150:** Bei höherer Vergrößerung werden zahlreiche DNA-haltige Fibrillen zwischen den nicht-homologen Chromosomenpaaren (a+a') und (b+b') nachgewiesen werden.

**Abbildungen 151 - 152:** Die Homologen können im SE-Bild kaum unterschieden werden. Im BSE-Bild wird eine Verdrehung der gepaarten Homologen sichtbar. Zahlreiche Verbindungen zwischen den nicht-homologen Chromosomen können mit Platinblau im BSE-Bild markiert werden.

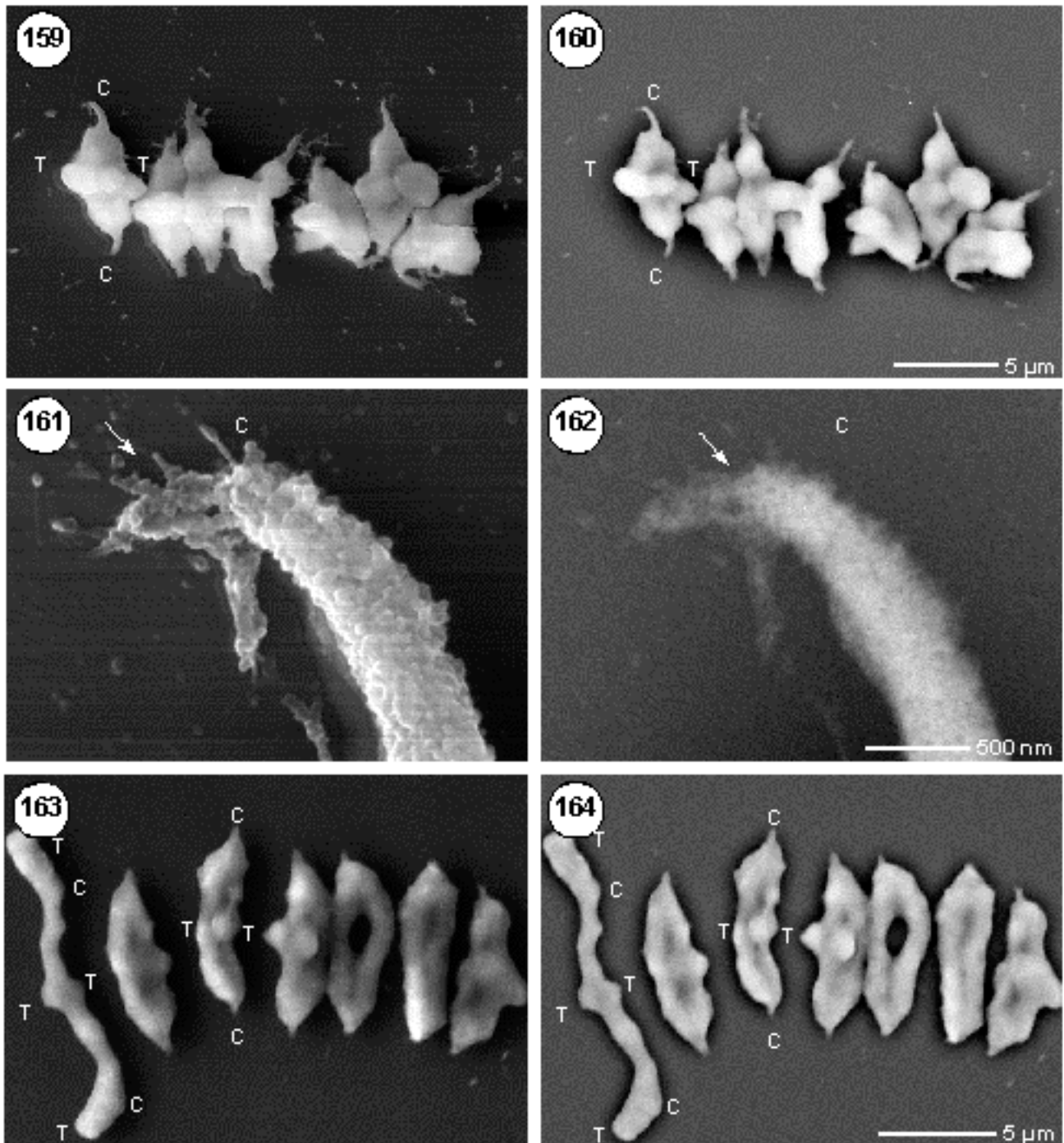


**Abbildungen 153 - 158: REM-Analyse im Diplofin des Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildung 153 - 154:** Die Chromosomen sind ungleichmäßig kondensiert (Abb. 153). Im BSE-Bild zeigt sich, dass Bereiche höherer DNA-Konzentration innerhalb der Chromosomen variabel angeordnet sind (Abb. 154; T = Telomer).

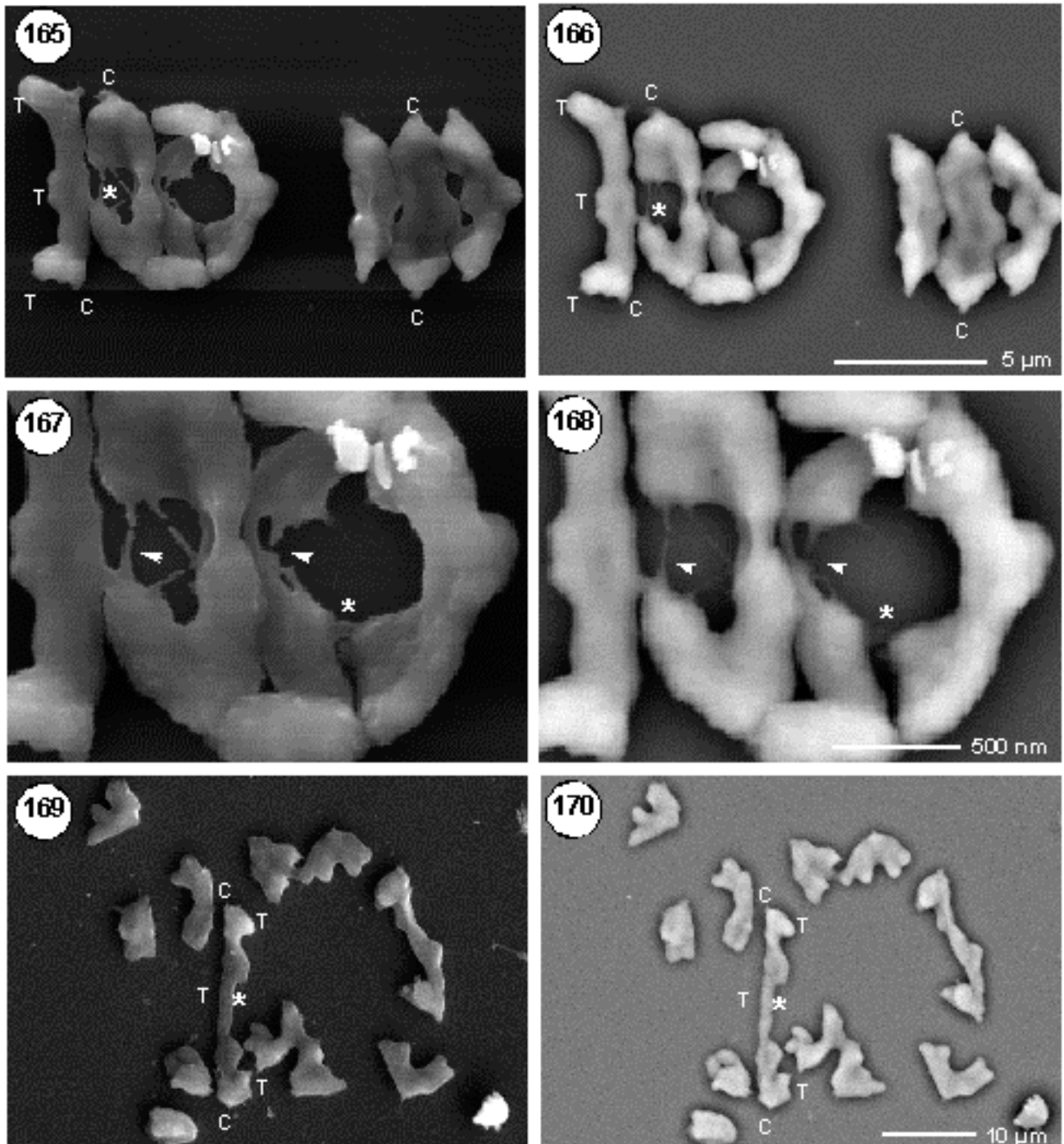
**Abbildungen 155 - 156:** In Abb. 155 (Detail aus Abb. 153) wird die geknäuelte Organisation der Fibrillen sichtbar, die nach Platinblaufärbung im BSE-Bild keine helikale Organisation erkennen lassen (Abb. 156).

**Abbildungen 157 - 158:** Zwischen den nicht-homologen Chromosomen treten einzelne Fibrillen auf, die mit Platinblau markiert sind (Abb. 157, 158; Pfeil).



**Abbildungen 159 - 164: REM-Analyse im Metaphase I-Stadium des Roggens (*Secale cereale*) nach Platirblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 159 - 160:** Bivalente weisen (Abb. 159) elongierte Fibrillen im Centromerbereich (C) auf, die mit Platirblau markiert werden (Abb. 160); Die Telomerbereiche der Homologen sind vollständig gepaart und treten häufig dominant hervor. Individuelle Telomere (T) können im Paarungsbereich weder im SE- noch BSE-Bild unterschieden werden. **Abbildungen 161 - 162:** In Hochauflösung trägt der elongierte Kinetochorbereich eine deutliche Markierung mit Platirblau. Eine parallele Ausrichtung der Fibrillen kann weder im SE- (Abb. 161) noch im BSE-Bild (Abb. 162) nachgewiesen werden. **Abbildungen 163 - 164:** In der späten Metaphase I befindet sich ein Bivalent häufig in einer geöffneten Ringkonformation mit einem gepaarten Telomer (Abb. 161; linkes Chromosom). Charakteristische Konstriktionen von Centromer und NOR können weder im SE- (Abb. 163) noch BSE-Bild (Abb. 164) nachgewiesen werden. Die Paarung der Homologen im distalen Bereich ist so vollständig, dass individuelle Telomere nicht unterschieden werden können (C = Centromerregion; T = Telomerbereich).

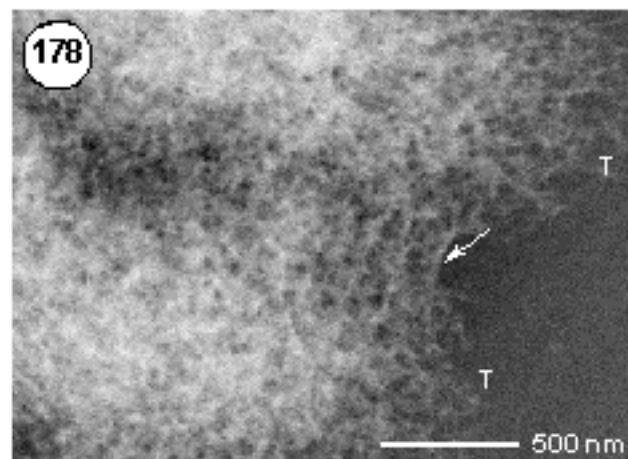
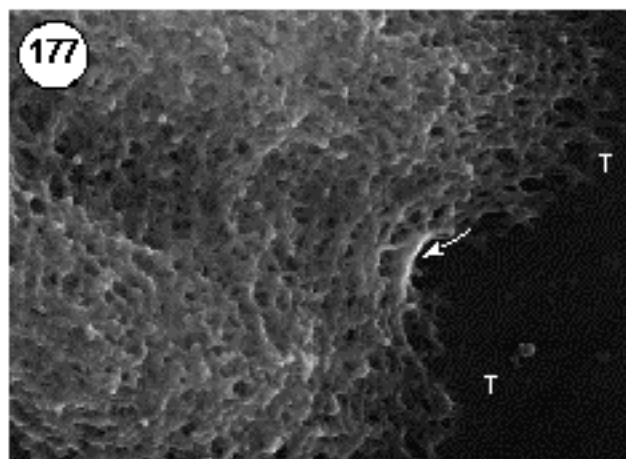
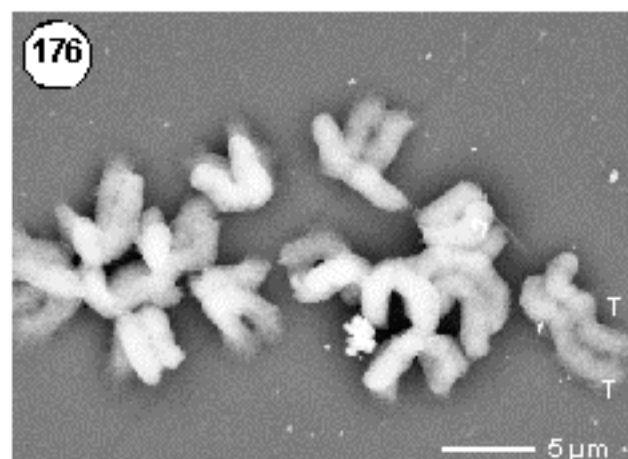
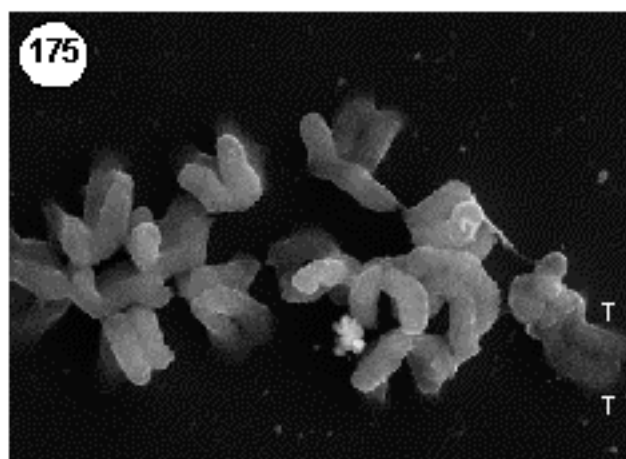
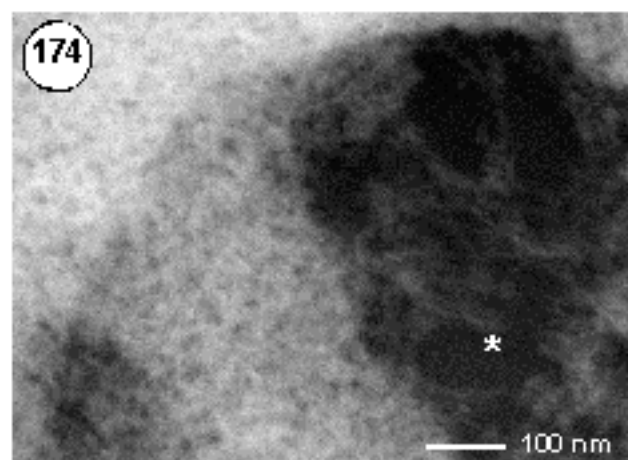
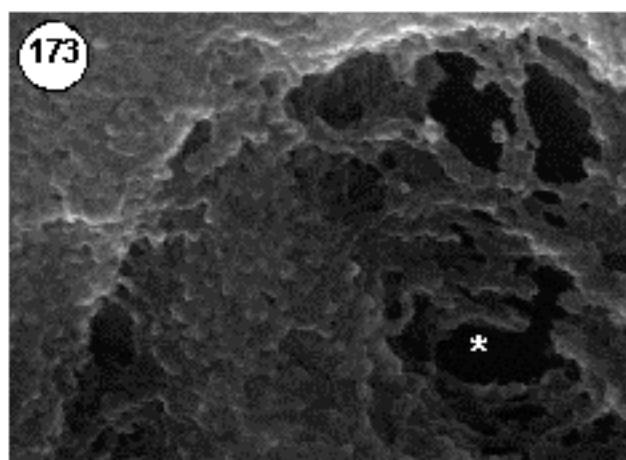
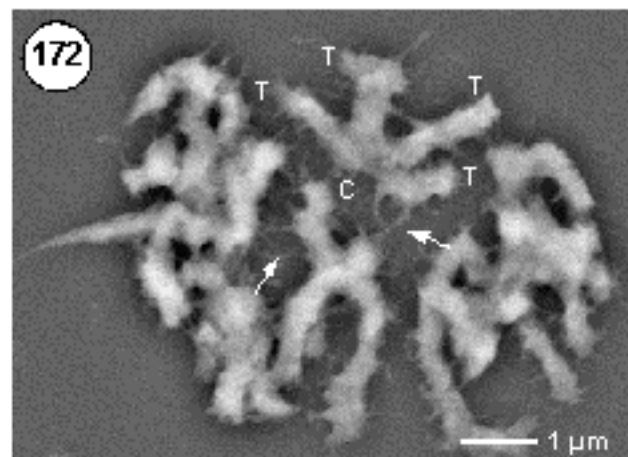
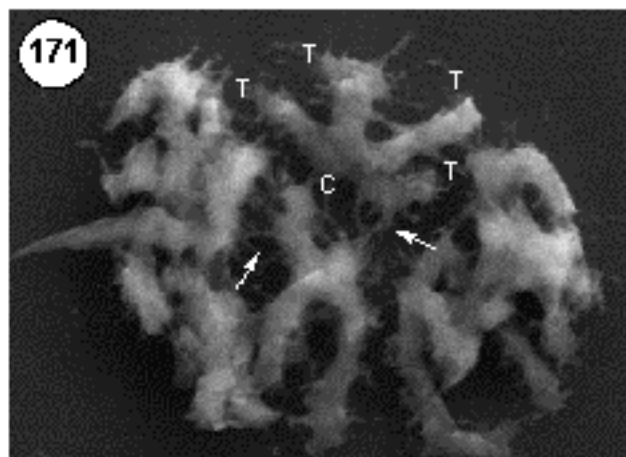


**Abbildungen 165 - 170: Späte Metaphase I und Anaphase I des Roggens (*Secale cereale*) nach Platinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

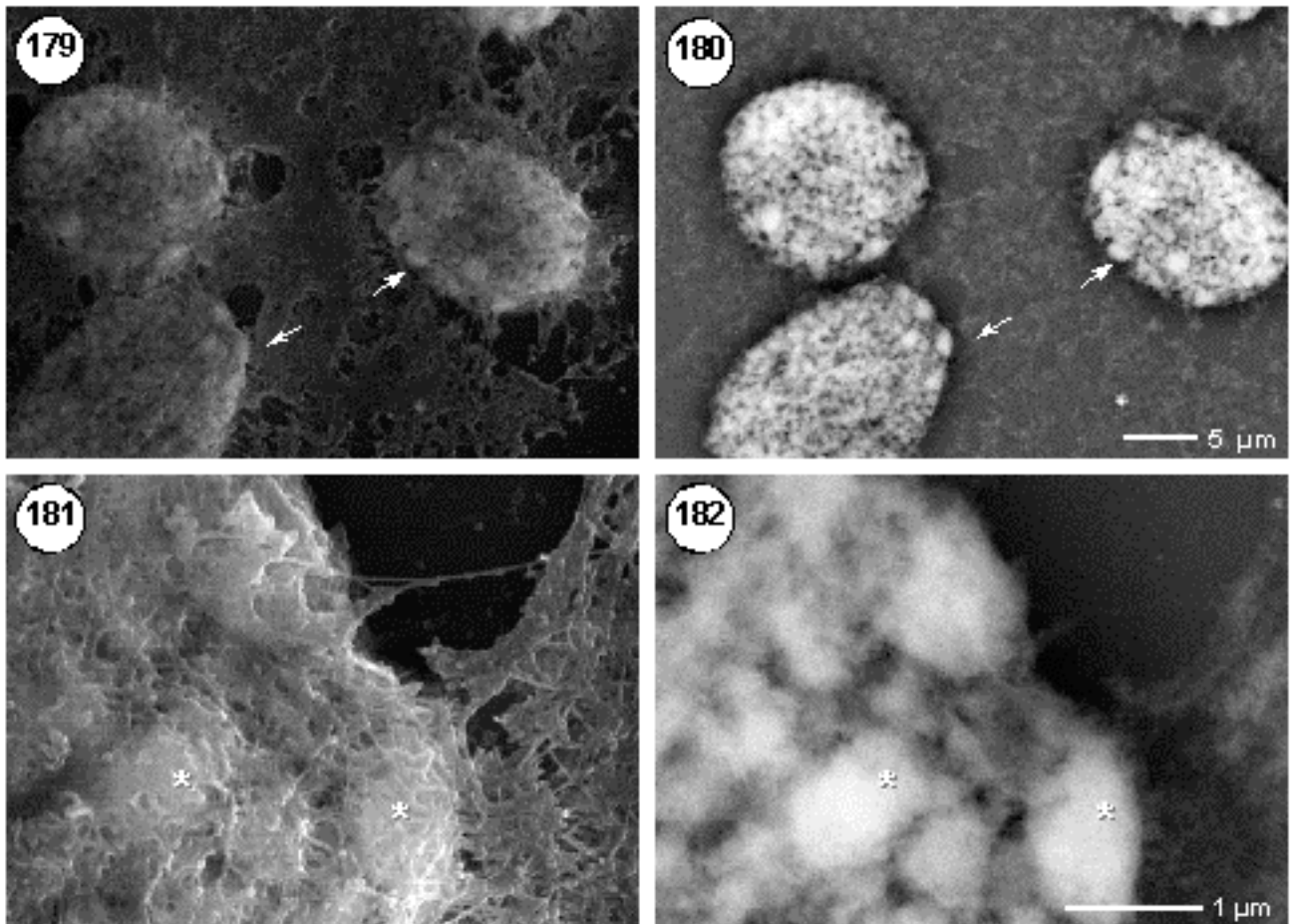
**Abbildungen 165 - 166:** Späte Metaphase I: Chromatidrücken werden zwischen den segregierenden, homologen Telomerbereichen (T) sichtbar (Stern). C = Centomer.

**Abbildungen 167 - 168:** Metaphase I: Individuelle Chromatiden der segregierenden Chromosomen können zum Teil im distalen Bereich unterschieden werden.

**Abbildungen 169 - 170:** Anaphase I: Fusionierte Chromatiden führen bei der Trennung der Chromosomen zu einer Streckung der Chromosomenarme (Stern).







**Abbildungen 171 - 182:** REM-Analyse des Meiose II-Zyklus des Roggens (*Secale cereale*) nach Plantinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).

**Abbildungen 171 - 172:** Prophase II: Die Chromatiden sind mit Ausnahme des Centromerbereiches getrennt und abgeflacht. Die Chromosomenarme sind geknickt und über zahlreiche Fibrillen, die mit Plantinblau im SE-Bild markiert sind, miteinander verbunden (C = Centromer, T = Telomer).

**Abbildungen 173 - 174:** In Hochauflösung wird ein komplexes Netzwerk von 30 nm-Fibrillen sichtbar. Chromomeren können weder im SE- noch BSE-Bild nachgewiesen werden. Fibrillen zwischen den individuellen Chromosomen zeigen deutliche Signale im BSE-Bild (Stern).

**Abbildungen 175 - 176:** In der Metaphase II sind die individuellen Chromatiden zylindrisch und bis auf die Centromerregion getrennt. Im Telomerbereich (T) setzt die Dekondensation ein (rechtes Chromosom).

**Abbildungen 177 - 178:** Im Detail wird die Assoziation der Chromatiden im Telomerbereich (T) sichtbar. Die Fibrillen zwischen den Chromatiden tragen deutliche Markierungen. Im Gegensatz zur SE-Darstellung können einige Fibrillen nachgewiesen werden, die ein deutlich reduziertes BSE-Signal aufweisen (Pfeile).

**Abbildungen 179 - 180:** Im Tetradenstadium sind die Chromosomen vollständig dekondensiert und weisen Charakteristiken der Interphase auf (Abb. 179). Im SE-Bild können größere heterochromatische Bereiche an der Kernperipherie nachgewiesen werden, die im BSE-Bild durch verstärkte Signale deutlich hervortreten (Abb. 180; Pfeile).

**Abbildungen 181 - 182:** In Hochauflösung werden heterochromatische Regionen sichtbar (Abb. 181; Sterne), die über zahlreiche Fibrillen miteinander in Verbindung stehen. Bereiche mit starken BSE-Signalen korrelieren deutlich mit heterochromatischen Domänen (Abb. 182; Sterne).

## ***Meiose II***

In Prophase II–Stadien werden im SE-Bild zahlreiche Fibrillen an der Chromosomenperipherie bzw. fibrilläre Vernetzungen zu anderen Chromosomen sichtbar, die mit Platinblau als Chromatinfibrillen nachgewiesen werden (Abb. 171 und 172; Pfeile). Das Chromatin erscheint lockerer gepackt, wobei periphere 30 nm-Fibrillen individueller Chromatiden mit Fibrillen anderer Chromatiden in Verbindung zu stehen (Abb. 173 und 174). Diese Fibrillen nehmen mit Zunahme der Kondensation ab. In der Metaphase II sind die Chromosomen gleichmäßig mit Platinblau markiert (Abb. 175 und 176). Im Telomerbereich zeichnet sich eine beginnende Dekondensation der Chromosomen ab, die an der Streckung der Chromatiden und partiellen Dekondensation in distalen Regionen sichtbar wird (Abb. 177 und 178). Im Tetradenstadium heben sich chromosomale Strukturen deutlich von der dichten cytoplasmatischen Matrix ab, die diese umgibt (Abb. 179 und 180). Die Chromatinfibrillen bilden ein lockeres Netzwerk, wobei einige größere Chromatinverdichtungen in den heterochromatischen Bereichen starke Signale zeigen. Im Gegensatz zu den früheren Stadien kann ein verstärkter unspezifischer Signalhintergrund in Verbindung mit der Cytoplasmaschicht beobachtet werden (Abb. 181 und 182).

### ***3.6.7. Proteinase K-Behandlung meiotischer Chromosomen des Roggens***

Eine Behandlung meiotischer Chromosomen mit Proteinase K reduziert störende Oberflächenschichten und führt zu einer deutlichen Auflockerung der Chromosomen, die so Einblicke in den strukturellen Aufbau ermöglichen. Im REM zeigt sich, daß trotz deutlicher Auflockerung die dreidimensionale Struktur weitgehend erhalten bleibt. Zu lange Inkubationszeiten von mehr als 1 Stunde bei 37°C verursachen jedoch Denaturierungserscheinungen, die zu einer Streckung der Chromosomenfäden und extremen Spreitungen von Chromatinfibrillen führen. Nach der Proteinase K-Behandlung sind in allen Stadien 10 nm– und 30 nm–Fibrillen, vergleichbar mit unbehandelten Chromosomen, nachweisbar, so daß dieser Fibrillentyp als Elementarfibrille bzw. Solenoid interpretiert wird. Sekundärstrukturen wie knotige Verdickungen, Fusionen, Verdrillungen und Schlaufenbildungen bleiben nach der Behandlung erhalten. Trotz aufgelockerter Chromosomenstruktur, die einen Einblick in die Organisation der Fibrillen innerhalb des Chromosoms ermöglichen, ergeben sich keine Hinweise auf eine hierarchische oder periodische Ordnung der Fibrillen in eine helikale oder schlaufenförmige Anordnung, wie sie für die „regelmäßigen“ Chromosomenmodelle („radial-loop“ oder „helical coiling“-Modell) postuliert werden.

## ***Interphase***

Im Interphasestadium ist das Chromatin nach Behandlung mit Proteinase K leicht aufgelockert. Interstitielle Zwischenräume sind deutlich ausgeprägt und lassen die charakteristischen Chromatinverdichtungen prägnant hervortreten (Abb. 183 und 184). Ein Detailausschnitt zeigt deutlich die komplexe Vernetzung von unterschiedlich großen, heterochromatischen Domänen

(Abb. 185). Chromomer-ähnliche Strukturen stehen mit anderen über unterschiedlich breite Chromatinstränge in Verbindung (Abb. 185 und 186). In Hochauflösung werden Strukturdetails der 30 nm-Fibrillen wie z.B. Fusionen, Schlaufen, Verdrillungen und Verästelungen sichtbar, wie sie auch in unbehandelten mitotischen und meiotischen Inter- und Prophasestadien nachgewiesen wurden (Abb. 187 und 188).

### ***Leptotän***

Im Leptotän erscheint das Chromosomenknäuel auch bei geringer Vergrößerung stark aufgelockert (Abb. 189). Individuelle Chromosomen werden über kurze Abschnitte sichtbar, die mit anderen Chromosomen in Verbindung stehen (Abb. 190). Untersuchungen bei hoher Vergrößerung zeigen parallel orientierte Fibrillen, die Bereiche mit geknäuelten Fibrillen verbinden (Abb. 191 und 192; Pfeile). Eine Unterscheidung individueller Chromosomen oder Chromatiden ist nicht möglich.

### ***Pachytän***

Im Pachytän kann die Konjugation homologer Chromosomen auch nach Behandlung mit Proteinase K nicht gelöst werden (Abb. 193 und 194). Heterochromatische Bereiche beider homologen Chromosomen paaren so eng, daß sie zu einer „einheitlichen“ Chromomerstruktur führen (Abb. 192 – 196). In euchromatischen Segmenten dagegen ist eine deutliche Auflockerung zu beobachten, so daß in diesen Bereichen individuelle Chromosomen unterschieden werden können (Abb. 194 und 196). Dennoch war trotz guter Auflockerung der Chromosomen kein vollständiger Einblick in den strukturellen Aufbau des SCs möglich. Fibrilläre Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen bleiben auch nach der Proteinase K-Behandlung erhalten (Abb. 197 und 198). Bei hoher Vergrößerung wird die kompakte Verdichtung im Bereich der Chromomere sichtbar, die im Kontrast zu der aufgelockerten Struktur von längsorientierter Fibrillen steht (Abb. 199 und 200). Auch bei guter Spreitung kann im Bereich des synaptonemalen Komplex keine regelmäßige, leiterartige Struktur von transversalen Fibrillen beobachtet werden, wie sie für SC-Strukturen im TEM beschrieben wurden (Abb. 201 und 202). 30 nm-Fibrillen, die als Verbindungselemente zwischen den Homologen auftreten, zeigen eine unregelmäßige Organisation. Die 10 nm-Fibrillen, die meist longitudinal orientiert sind, werden dagegen häufig als verbindende Elemente zwischen einzelnen 30 nm-Fibrillen nachgewiesen (Abb. 202). Die 30 nm-Fibrille zeigt Strukturvarianten, wie sie schon in Interphasen beobachtet worden sind. In Bereichen mit Längsfibrillen (Abb. 203) können dabei häufig fusionierte 30 nm-Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 204), während in den heterochromatischen Bereichen (Chromomere) meist Verkäuelungen und Verästelungen von Fibrillen auftreten.

### ***Diplotän***

Im Diplotän bleiben die Homologen vollständig gepaart. Nach der Platinblau-Färbung können charakteristische, unregelmäßige Chromatinverdichtungen entlang des gesamten Chromosoms

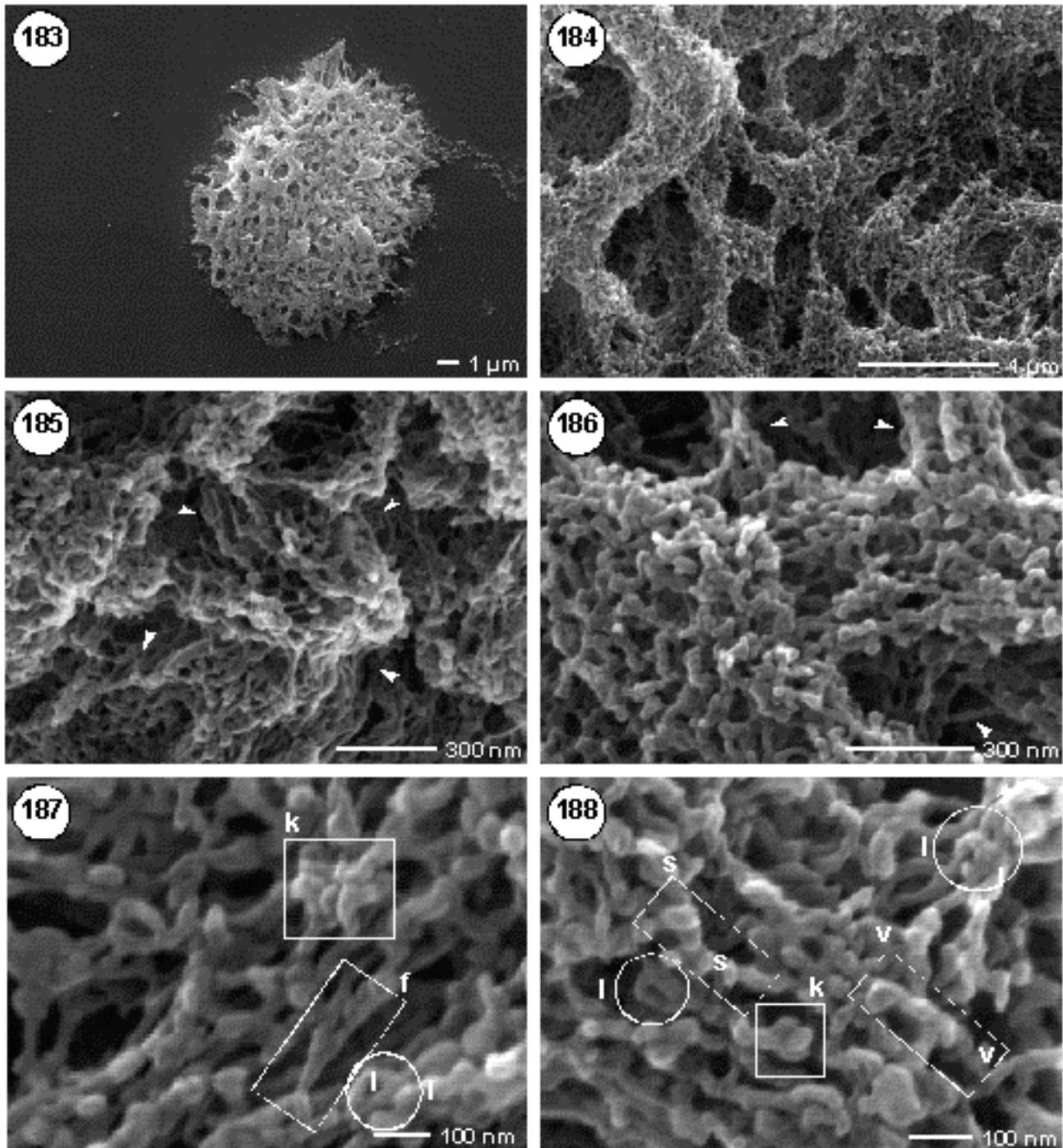
beobachtet werden (Abb. 205 und 206). Bei hoher Vergrößerung werden vereinzelt längsorientierte Fibrillen sichtbar, die ohne Proteinase K-Behandlung durch Oberflächenschichten maskiert waren (Abb. 207). Im BSE-Bild scheinen diese Bereiche weniger dicht organisiert zu sein als Abschnitte mit überwiegend geknäulten Fibrillen (Abb. 208). Die meisten Fibrillen zeigen deutliche Signale nach Platinblau; nur vereinzelt können Proteinfibrillen nachgewiesen werden (Abb. 209 und 210).

### ***Metaphase I***

In der Metaphase I werden nach der Proteinase K-Behandlung strukturelle Details der 10 nm- und 30 nm-Fibrille sichtbar, wie sie auch für Prophasen charakteristisch sind. Die Fibrillen sind deutlich dichter gepackt als in Prophasestadien. Die Telomere der Bivalenten bleiben trotz guter Auflockerung der Fibrillen und leichter Streckung der Chromosomen fest miteinander verbunden (Abb. 211). Die Fibrillen der individuellen Telomere können dabei nicht unterschieden werden (Abb. 212). Im Centromer kennzeichnen dünne herausgezogenen Fibrillen den Kinetochorbereich (Abb. 213). In einem kleinen Teilbereich werden längsorientierte Fibrillen sichtbar, während der restliche Chromosomenkörper eine dichte Knäuelung von Fibrillen aufweist (Abb. 214). Bei hoher Vergrößerung werden Strukturdetails der 30 nm-Fibrille wie Schlaufenbildung, Verdrillungen, knöpfchenartige Elemente, Verknäuelungen und Fusionen zweier Fibrillen vergleichbar mit gering kondensierten Stadien sichtbar (Abb. 215 und 216).

### ***Anaphase I und Telophase I***

In der Anaphase I kann die Oberflächenstruktur deutlich aufgelockert werden, so daß die fibrilläre Oberfläche sichtbar wird. Zwischen den individuellen Chromosomen können sowohl DNA-Fibrillen als auch Proteinfibrillen (Abb. 217 und 218) nachgewiesen werden. Das Chromatin zeigt eine komplexe Organisation von Längsfibrillen und geknäuelten Elementen (Abb. 219 und 220). Im SE-Bild werden Verdichtungsbereiche sichtbar, die wiederum keine helikale Anordnung der Fibrillen erkennen lassen. Die Telomerbereiche sind gleichfalls fibrillär komplex organisiert (Abb. 221 und 222). In der Telophase I sind die Chromosomen nach der Proteinase K-Behandlung insbesondere im distalen Bereich stark aufgelockert und zeigen häufig Denaturierungserscheinungen an den Telomeren (Abb. 223 und 224). Durch die hervorgerufene starke Spreitung der Chromatinfibrillen fusionieren individuelle Telomerbereiche miteinander (Abb. 225 und 226). Kontrastierungen der Fibrillen mit Platinblau zeigen eine komplexe, netzartige Organisation, ohne daß regelmäßige Verdichtungszone nachweisbar sind (Abb. 227 und 228).



**Abbildungen 183 - 188: REM-Analyse des frühen Leptotäns des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung.**

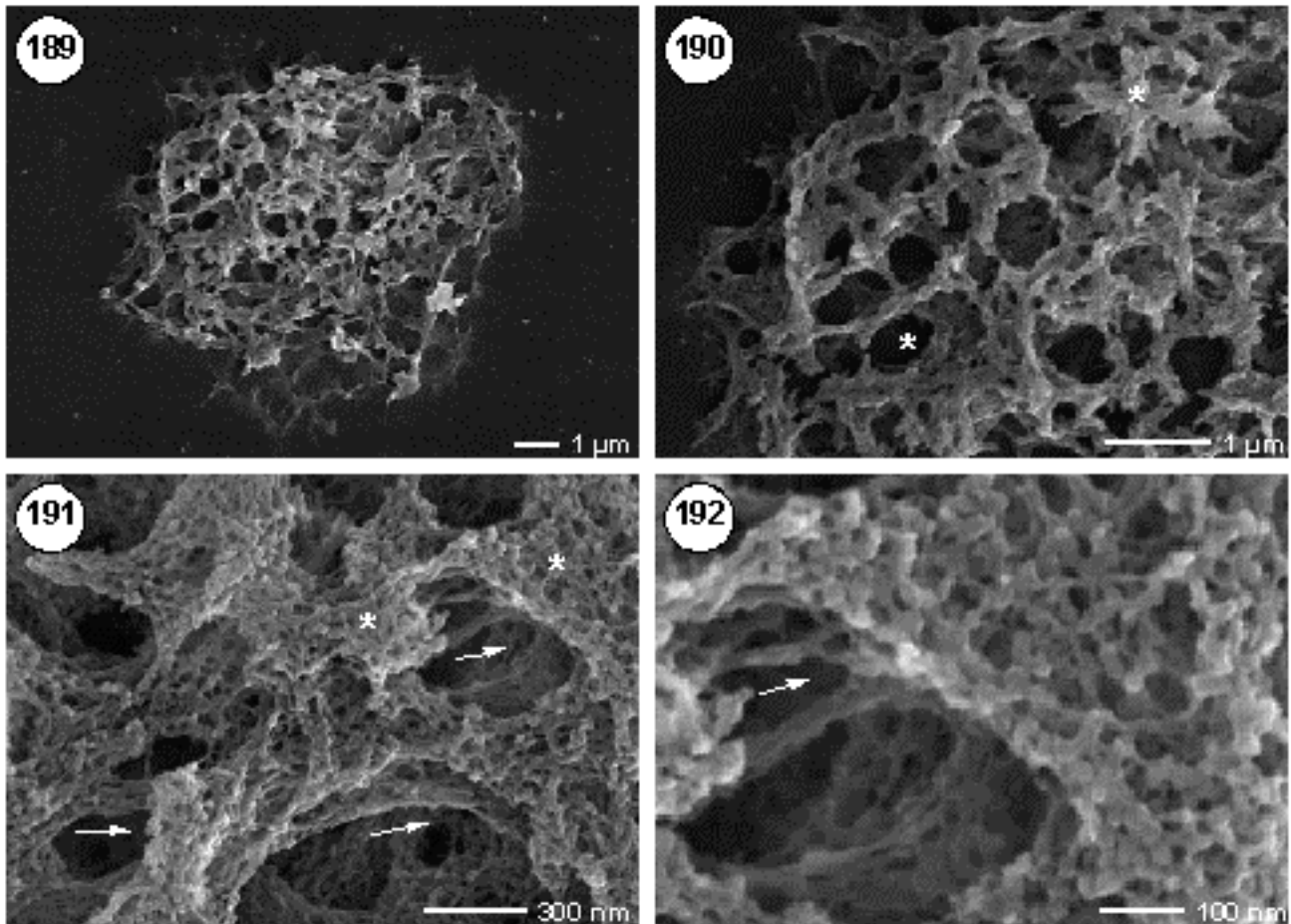
**Abbildung 183:** Die Chromosomen sind in einem komplexen Netzwerk eingebunden. Heterochromatische Bereiche sind mehr oder weniger gleichmäßig im Kern verteilt.

**Abbildung 184:** Individuelle Chromosomen können nur über kurze Bereiche unterschieden werden und stehen in engen Kontakt miteinander.

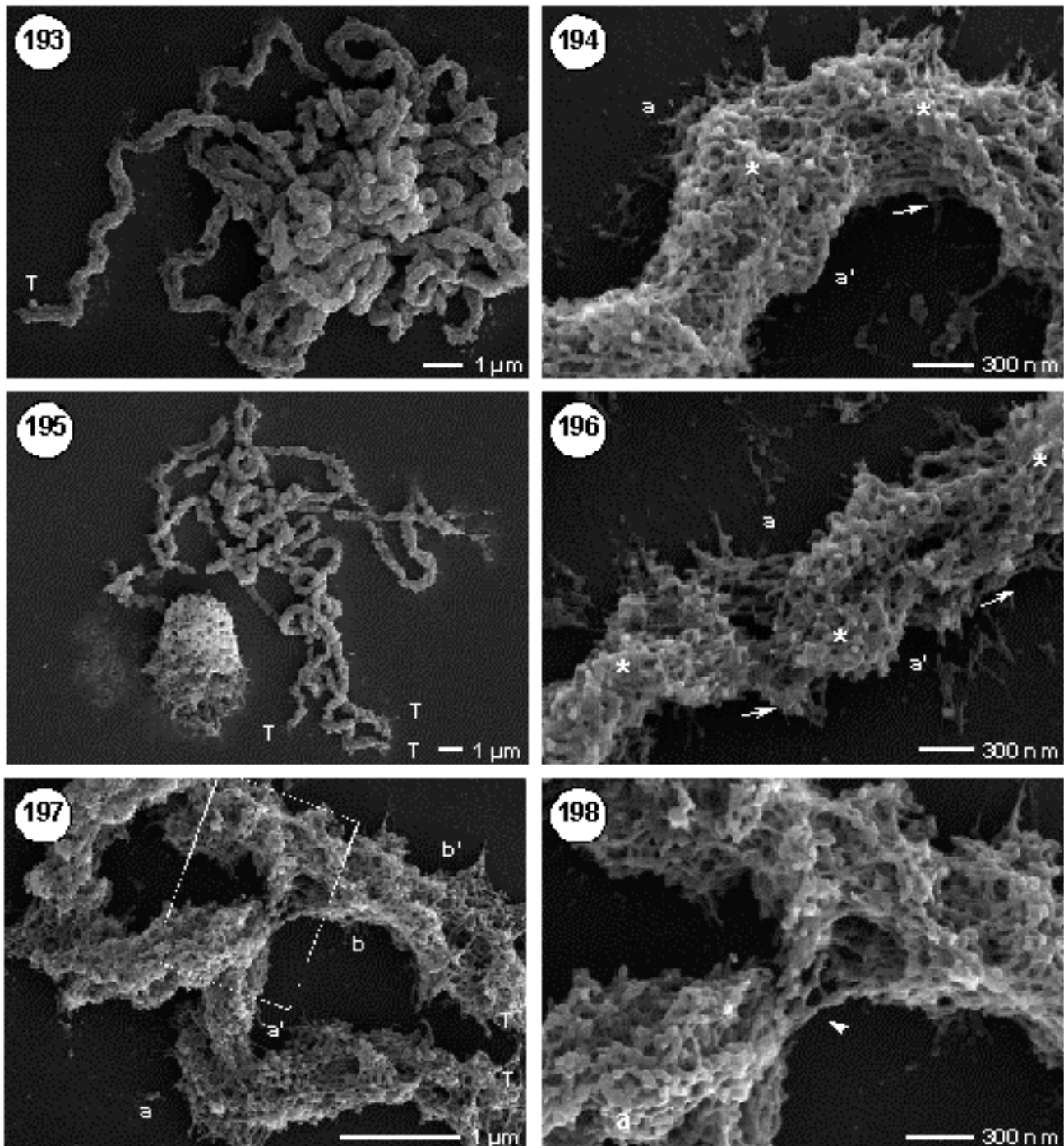
**Abbildung 185:** Chromomere sind aus geknäuelten 30 nm-Fibrillen aufgebaut, die dominant hervortreten.

**Abbildung 186:** In Hochauflösung wird die komplexe Organisation der 30 nm-Fibrillen sichtbar, die benachbarte Bereiche über einzelne oder gebündelte Fibrillen verbinden (Pfeilspitzen).

**Abbildungen 187 - 188:** Unterschiedliche Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen werden sichtbar wie: Chromatinschlaufen (Kreis: l), Knäuel (Rahmen: k), Fusionen (Rahmen: f), Verdünnungen (Rahmen: v) oder knötchenförmige Sekundärstrukturen (Rahmen: s).

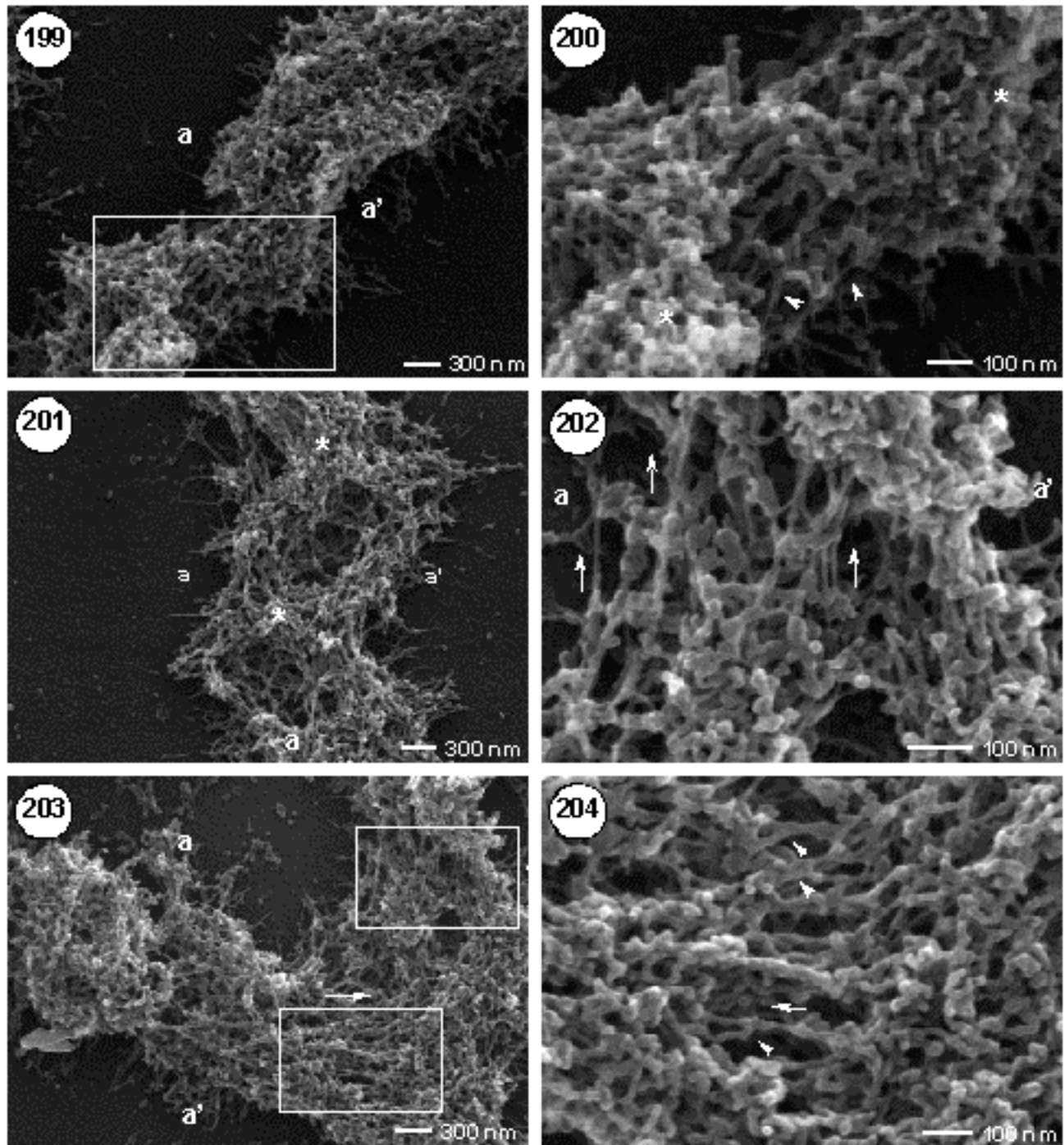


**Abbildungen 189 - 192: REM-Analyse des Leptotäns des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung.** Der Kern ist deutlich aufgelockert wobei größere chromatinfreie Bereiche sichtbar werden (Abb. 189). Der Verlauf einzelner Chromosomen ist nur über kurze Abschnitte erkennbar (Abb. 190; Stern). In Hochauflösung wird ein komplexes Netzwerk aus geknäuelten 30 nm-Fibrillen und Chromomer-ähnliche Domänen sichtbar (Abb. 191; Sterne), die über parallele Fibrillen (Pfeile) miteinander in Verbindung stehen (Abb. 192). Zahlreiche Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille können unterschieden werden (Abb. 192).



**Abbildungen 193 - 198: REM-Analyse des frühen Diplofäns des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung. Homologe Chromosomen sind mit a und a' bezeichnet.**

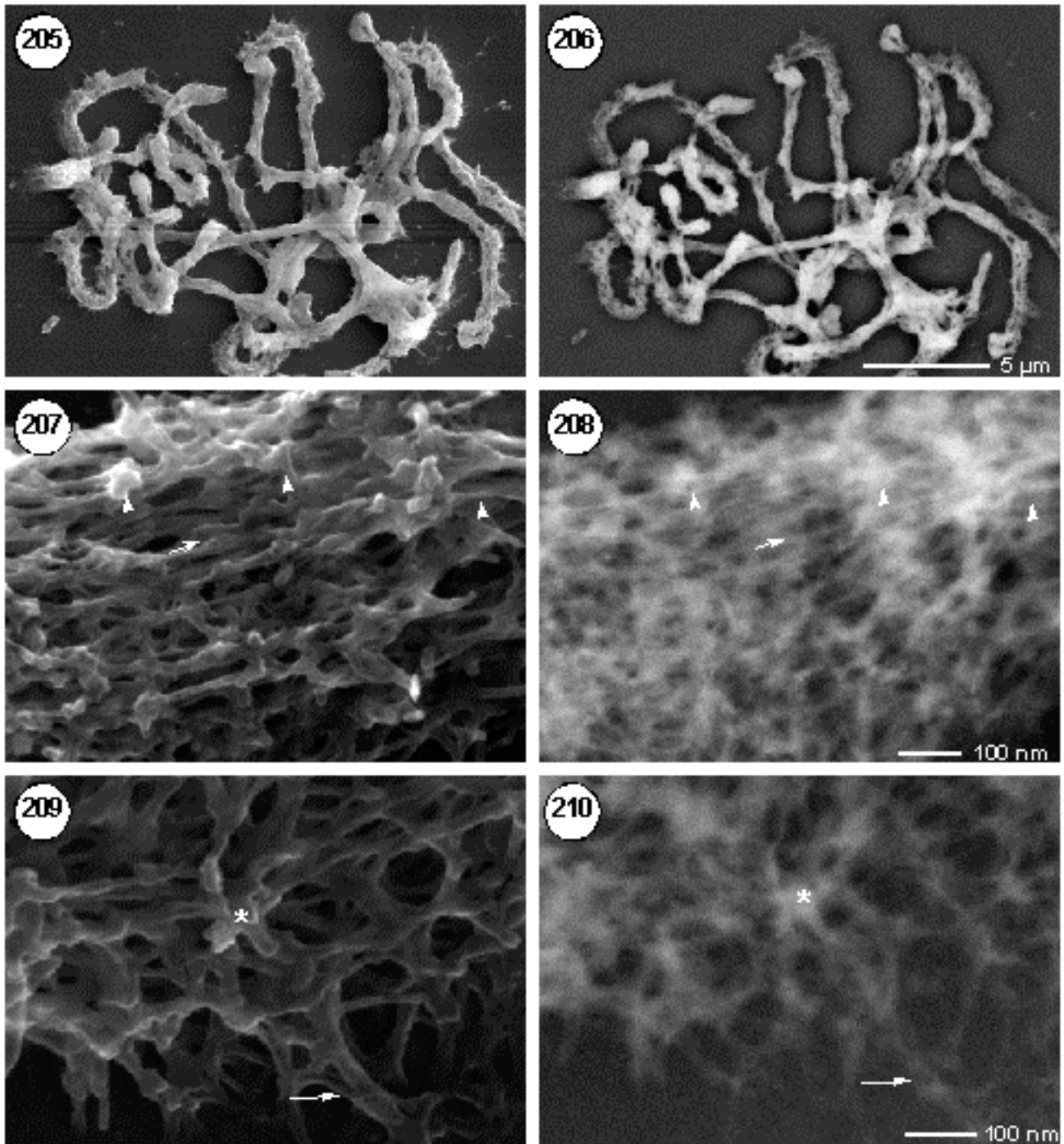
**Abbildungen 193 - 194:** Die Chromosomen liegen in einem Knäuel (Abb. 193). Homologe Chromosomen bleiben auch nach der Proteinase K-Behandlung miteinander verbunden (Abb. 194). In Hochauflösung wird die Organisation in Chromomerenstrukturen, geknäuelte (Sterne) und kurze Segmente von parallelen Fibrillen (Pfeil) sichtbar. **Abbildungen 195 - 196:** Im Diplotän bleiben die Homologen assoziiert (Abb. 195). Individuelle Homologe können insbesondere in Bereichen mit längs orientierten Fibrillen unterschieden werden (Abb. 196; Pfeile). Im Vergleich zu unbehandelten Chromosomen treten die Chromomerenstrukturen deutlich hervor (Abb. 196; Sterne). **Abbildungen 197 - 198:** Interchromosomale Verbindungen sind zwischen nicht-homologen Chromosomen nachweisbar. In Hochauflösung werden mehrere Fibrillen sichtbar, die miteinander interagieren (Abb. 197 und 198).



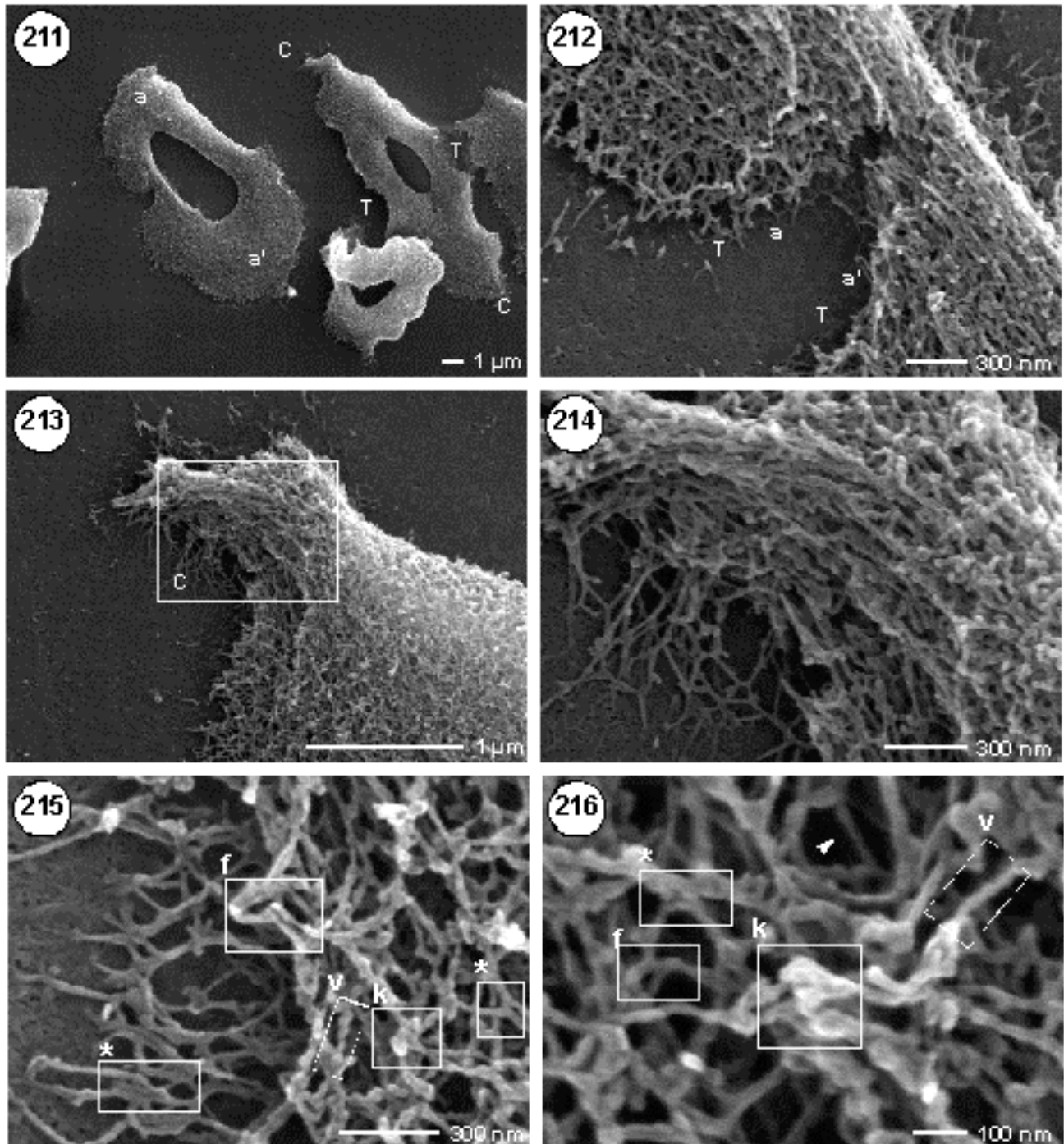
**Abbildungen 199 - 204: REM-Analyse des Pachytäns des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung (a und a' = homologe Chromosomen).**

Die Chromosomenmorphologie ist aufgelockert und ermöglicht Einblick in die Paarungsstruktur (Abb. 199). In Bereichen mit überwiegend geknäuelten Fibrillen (Abb. 200; Sterne) bleiben die Homologen eng gepaart. Vereinzelt stehen 30 nm-Fibrillen mit 10 nm-Fibrillen in Verbindung (Abb. 200; Pfeilspitze). Bereiche mit überwiegend längsorientierten Fibrillen zeigen eine verstärkte Auflockerung nach Proteinase K. In Bereichen mit überwiegend geknäuelten Fibrillen (Sterne) sind die homologen Chromosomen fest miteinander verbunden (Abb. 201; Sterne). Bei starker Auflockerung werden längsorientierte 10 nm-Fibrillen und 30 nm-Fibrillen sichtbar, die miteinander in Verbindung stehen (Abb. 202; Pfeile). Geknäuelte 30 nm-Fibrillen werden durch kurze Segmente paralleler und transversal-orientierter Fibrillen unterbrochen werden (Abb. 203; Pfeil). Bei hoher Vergrößerung werden parallele Fibrillen, Fusionen und komplexe Interaktionen von 30 nm-Fibrillen sichtbar (Abb. 204; Pfeilspitzen).



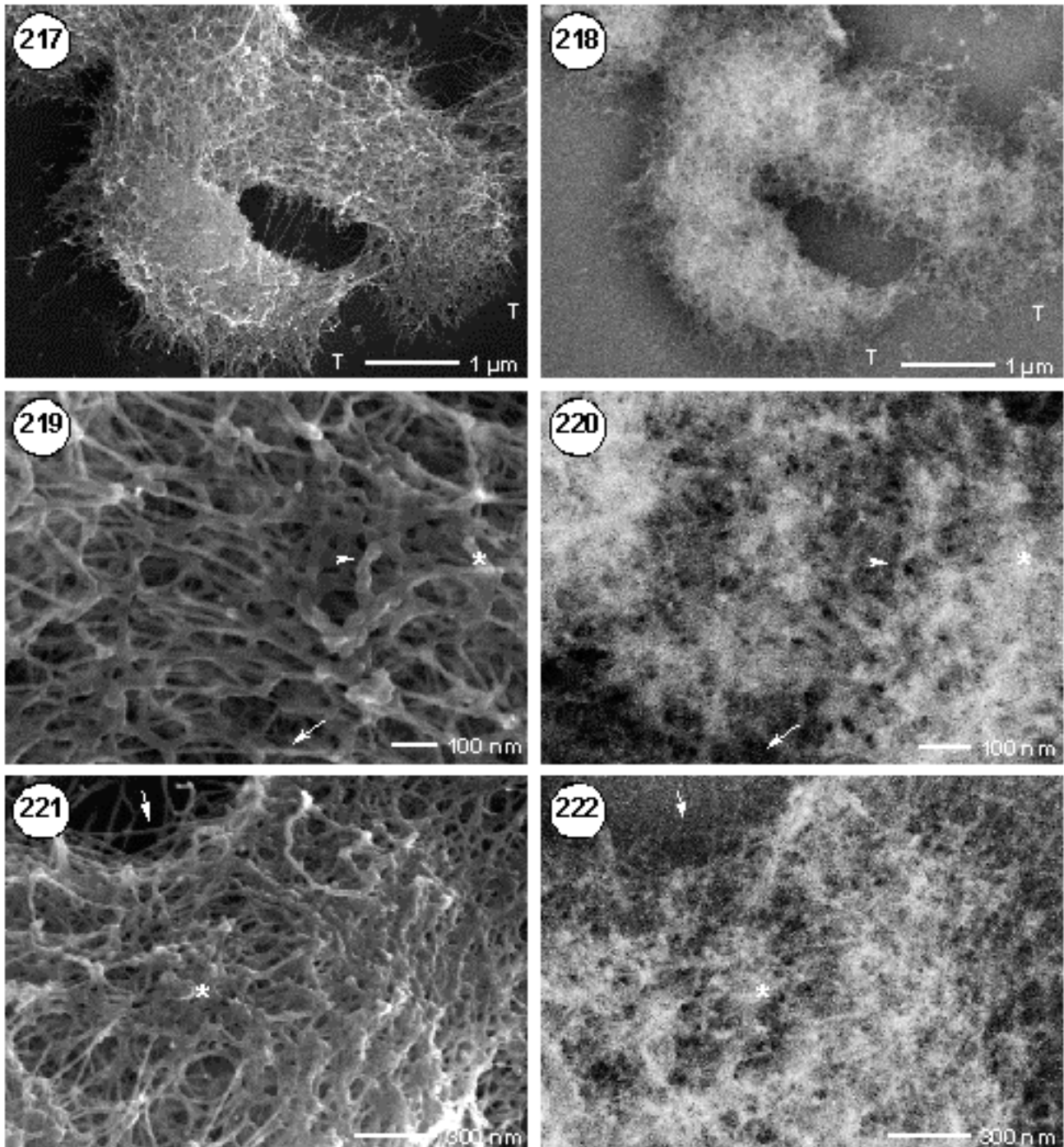


**Abbildungen 205 - 210: REM-Analyse des Diploids des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung und Platinblau-Kontrastierung in SE- (links) und BSE-Darstellung (rechts). Abbildungen 205 - 206: Homologe Chromosomen liegen erg gepaart. Die Chromosomenmorphologie ist unregelmäßig (Abb. 205). Im BSE-Bild wird die enge Paarung der Chromosomen sichtbar (Abb. 206), die nur über kurze Abschnitten unterschieden werden können. Abbildungen 207 - 208: In Hochauflösung wird eine komplexe Fibrillentextur mit kurzen, längs orientierten Fibrillen sichtbar (Abb. 207; Pfeile). Bereiche mit geknäuelten Fibrillen (Pfeilspitzen) zeigen verstärkte Signale mit Platinblau und stehen mit parallelen Fibrillen in Verbindung (Abb. 208; Pfeilspitzen). Abbildungen 209 - 210: Im SE-Bild werden Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen sichtbar. Die Mehrzahl der Fibrillen zeigt Signale mit Platinblau. Nur wenige Fibrillen bleiben unmarkiert (Abb. 209 - 210: Pfeil).**



**Abbildungen 211 - 216: REM-Analyse der Metaphase I des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung**

**Abbildung 211:** Die Bivalente sind leicht gestreckt und zeigen laterale Abflachungen. Die Telomerbereiche (T) der Homologen sind vollständig gepaart (C = Centromer). **Abbildung 212:** Im Detailausschnitt einer Telomerregion werden 30 nm-Fibrillen sichtbar. Im Bereich der homologen (a + a') Telomere sind die Fibrillen individueller Chromosomen miteinander fusioniert. **Abbildungen 213 - 214:** Im Centromer (C) wird deutlich der elongierte Kinetochorbereich sichtbar. Die Oberfläche zeigt eine deutliche Fibrillenstruktur (Abb. 213). Chromomeren können nicht nachgewiesen werden. Bei hoher Vergrößerung werden kurze parallele Abschnitte sichtbar (Abb. 214). **Abbildung 215:** In gut gespreiteten Randbereichen wird die netzartige Textur der 30 nm-Fibrillen sichtbar. Individuelle Fibrillen stehen teilweise in engen Kontakt mit benachbarten Fibrillen (Sterne). **Abbildung 216:** In Hochauflösung wird der Verlauf individueller Fibrillen sowie Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen sichtbar. Die Fibrillen stehen mit benachbarten Fibrillen in engem Kontakt (Sterne), sind verdreht (Rahmen: v), fusioniert (Rahmen: f) oder zeigen knötchenförmige Sekundärstrukturen (Rahmen: k). Vereinzelt können 10 nm-Fibrillen beobachtet werden (Pfeilspitze).

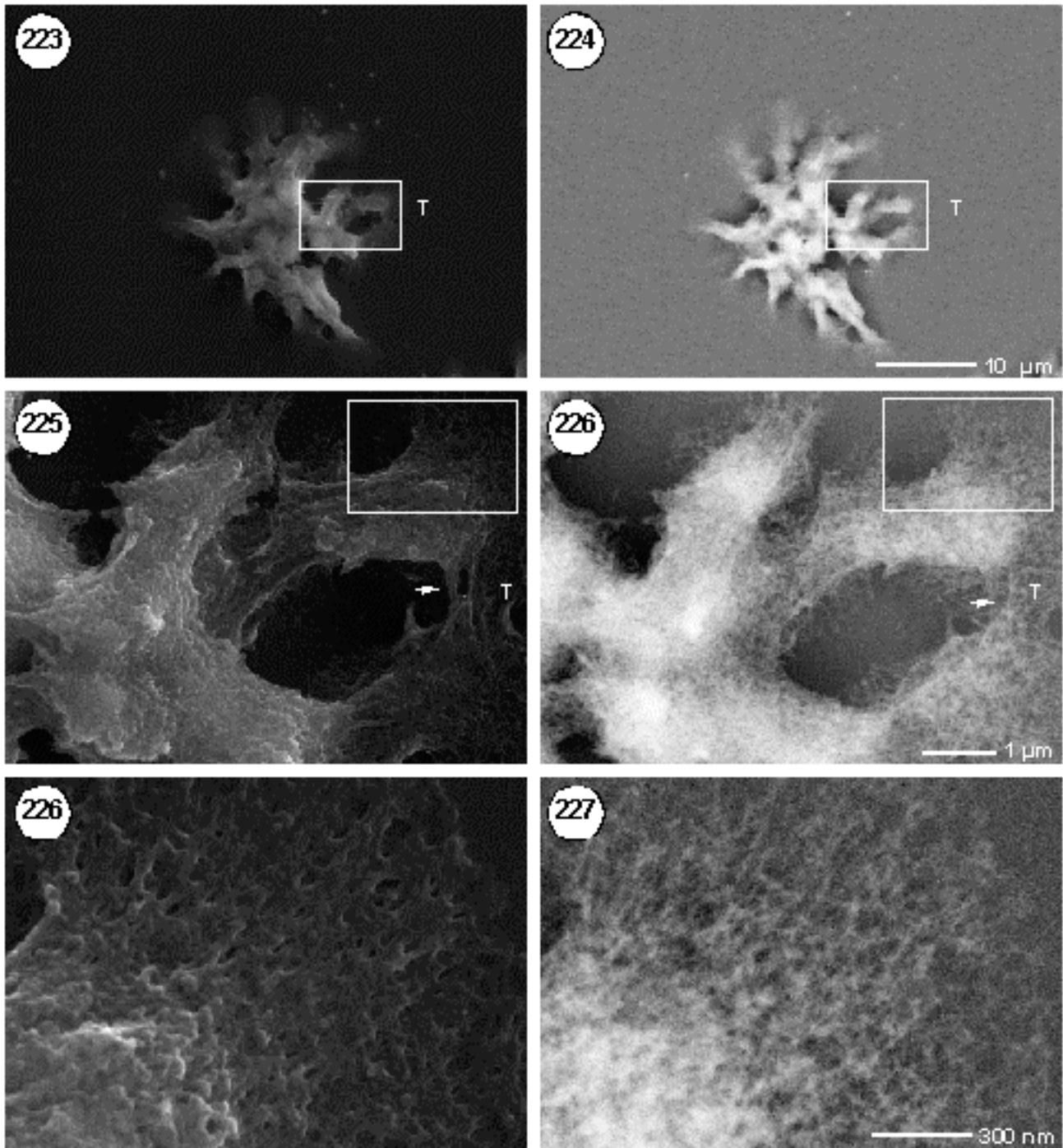


**Abbildungen 217 - 222: REM-Analyse der Anaphase I des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung und Platinblaukontrastierung in SE- (links) und BSE-Darstellung (rechts).**

**Abbildungen 217 - 218:** Die Chromosomen sind leicht gestreckt und abgeflacht (Abb. 217). Die Chromosomenoberfläche zeigt deutliche Fibrillenstruktur. Im BSE-Bild wird die DNA-Vereinigung innerhalb der Chromosomenarme sichtbar (Abb. 218; T = Telomerbereich).

**Abbildungen 219 - 220:** Bei höherer Vergrößerung werden 10 nm- und 30 nm-Fibrillen sichtbar, die kein BSE-Signal aufweisen und als verbindende Elemente zwischen den 30 nm-Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 219 und 220; Pfeil). Im Gegensatz zur 30 nm-Fibrille sind die 10 nm-Fibrillen meist parallel angeordnet. Im BSE-Bild werden unterschiedliche Verdichtungsgebiete (Stern) sichtbar, die im SE-Bild verborgen blieben.

**Abbildungen 221 - 222:** In Hochofflösung wird eine netzartige Organisation der Fibrillen im Telomerbereich sichtbar. Im BSE-Bild sind fast alle Fibrillen mit Platinblau markiert (Abb. 221). Einzelne 10 nm-Fibrillen sind im SE-Bild nachweisbar (Abb. 222). Einzelne Chromatinverdichtungen werden sichtbar.



**Abbildungen 222 - 227: REM-Analyse in der Telophase I des Roggens (*Secale cereale*) nach Proteinase K-Behandlung und Platinblau-Kontrastierung in SE- (linkes Bild) und BSE-Darstellung (rechtes Bild).**

**Abbildungen 222 - 223:** Die Chromosomen liegen gebündelt. Im peripheren Telomerbereichen zeichnet sich deutlich die Dekondensation der Chromosomen ab (Abb. 223).

**Abbildungen 224 - 225:** Individuelle Telomere (T) stehen über Chromatinfibrillen miteinander in Verbindung. Das Chromatin ist ungleich verteilt und zeigt keine regelmäßige spiralförmige Organisation.

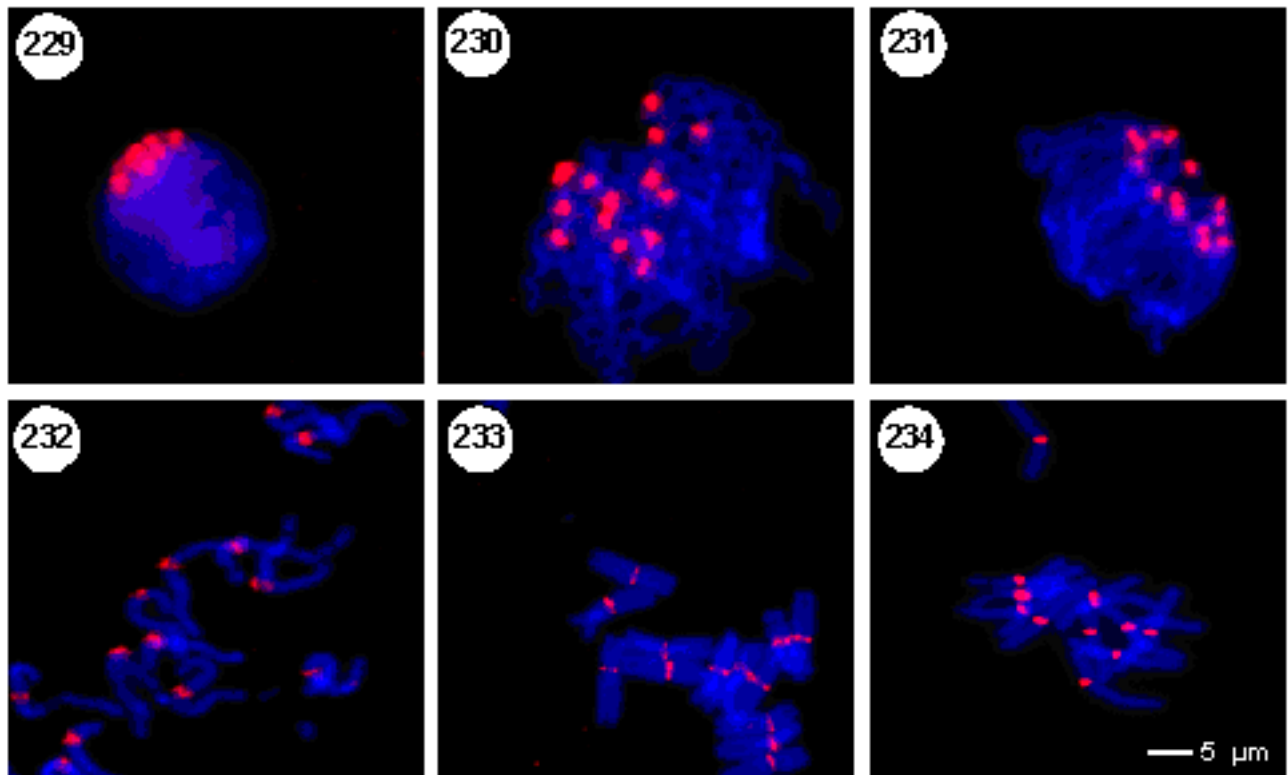
**Abbildungen 226 - 227:** Unter Hochauflösung wird die komplexe Netzstruktur der Fibrillen des Telomerbereiches deutlich (Abb. 226, 227 stellen Detail aus den Abb. 224, 225 dar).

### 3.6.8. FISH-Analyse des Centromerbereiches in Mitose und Meiose

Zur Analyse der Chromosomendynamik wurden Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) mit der Centromer-spezifischen Sonde pAWrc aus dem Roggen (LANDGRIDE, persönliche Mitteilung) auf unterschiedliche Stadien mitotischer (Abb. 229 – 234) und meiotischer Chromosomen (Abb. 235 – 246) des Roggens (*Secale cereale*) hybridisiert. Alle Signale wurden ohne weitere Signalverstärkung nachgewiesen. Beobachtete Abweichungen im Signalmuster der Centromerbereiche von Meiose I- und Meiose II-Chromosomen deuten auf eine unterschiedliche Organisation innerhalb der verschiedenen Zellzyklen hin.

In der Mitose können bei Hybridisierungen mit pAWrc in Inter- und Prophasen 14 polar orientierte Centromerbereiche (*Rabl*-Konfiguration) nachgewiesen werden (Abb. 229 – 231). In der Interphase sind die Centromere polar organisiert (Abb. 229). Die Signallbereiche der frühen Prophasen liegen bevorzugt in proximalen Bereichen, wodurch ein kleiner signalfreier Zwischenraum sichtbar wird, der in der Abbildung 230 und 231 nur schwer zu erkennen ist. In der späten Pro- und frühen Metaphase kann eine einzige starke Signalbande beobachtet werden, die den gesamten Centromerbereich markiert (Abb. 232). Späte Metaphasen sind durch zwei distinkte Signale, je ein Signal pro Chromatide, gekennzeichnet (Abb. 233). In Ana- (Abb. 234) und Telophase (Abbildung nicht gezeigt) zeigen die Centromere ebenfalls nur ein ausgeprägtes Signal.

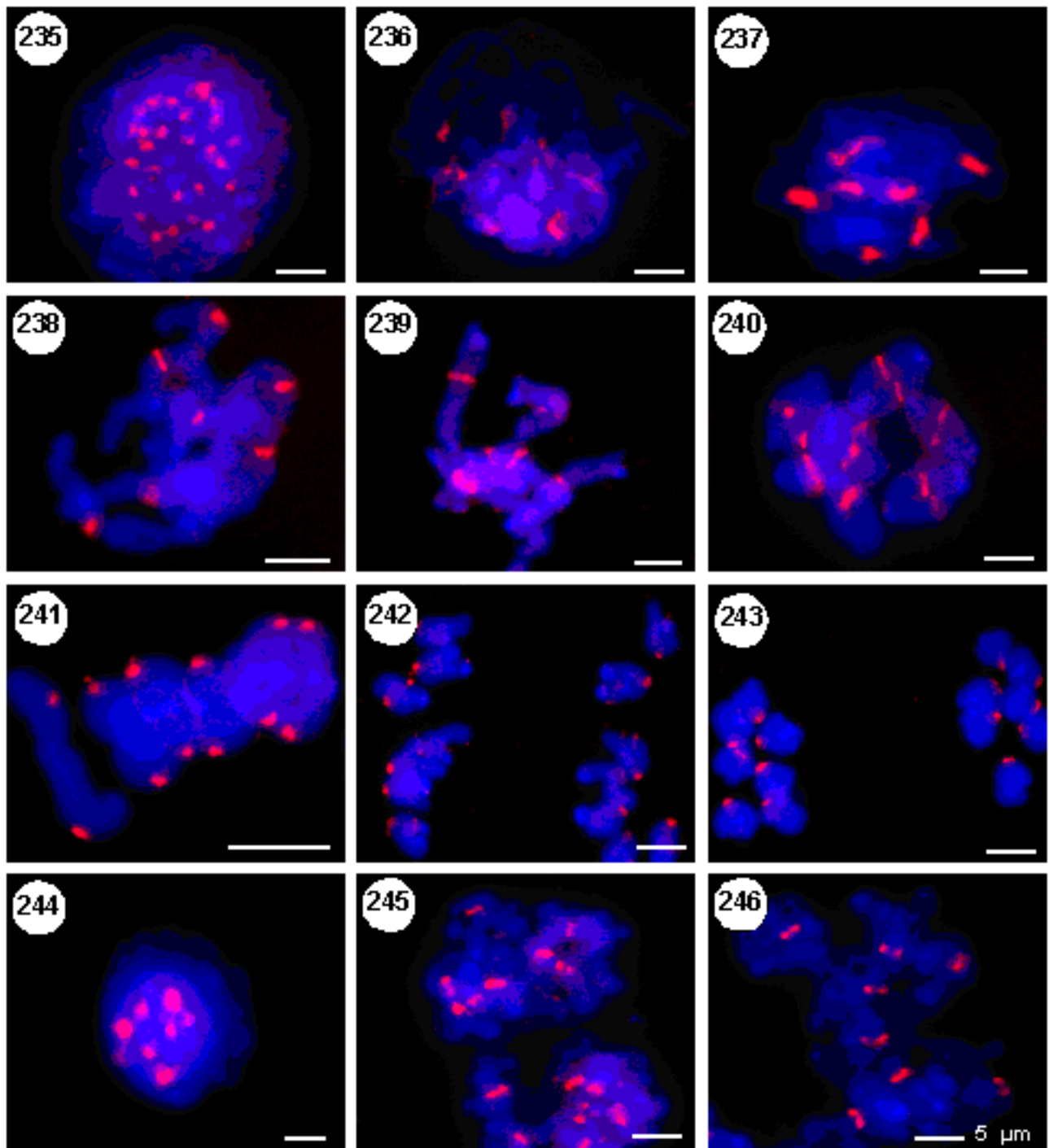
In der Meiose ist im Gegensatz zur Mitose weder in Inter- noch Prophasen eine Ausrichtung der Centromerbereiche in der *Rabl*-Konfiguration nachweisbar. In der Interphase werden 28 Signale nachgewiesen, ohne daß eine polare Ausrichtung erkennbar ist (Abb. 235). In allen Prophasestadien können dagegen nur 7 Markierungen ( $2n = 14$ ) nachgewiesen werden, was auf eine enge Assoziation der homologen Chromosomen in diesen Stadien hindeutet. Im Zygotän sind die Signalbanden im Vergleich zur Mitose deutlich langgestreckt (Abb. 236). Ein signalfreier Zwischenraum ist nicht nachweisbar. Vereinzelt werden verzweigte Signale sichtbar, die von den individuellen homologen Chromosomen stammen und auf ungepaarte, proximale Centromerbereiche zurückzuführen sind (Abb. 236). Im Pachytän werden 7 lange Signalbanden beobachtet (Abb. 237). Im Diplotän sind aufgrund der verstärkten Kondensation die Signallbereiche deutlich verkürzt. (Abb. 238). Mit Beginn der Diakinese können erstmals Signale von den individuellen homologen Chromosomen unterschieden werden (Abb. 239). Im Gegensatz zur Mitose ist keine weitere Differenzierung der Signale der individuellen Chromatiden möglich. Stattdessen wird eine Verlagerung des bislang zentrischen Signallbereiches zur Chromosomenaußenseite sichtbar (Abb. 240). Diese Umstrukturierung führt am Ende der Metaphase I zu einer tangentialen Anordnung der Centromerbereiche. Vereinzelt können auf den herausgezogenen Fibrillen der Kinetochorregion Signale nachgewiesen werden (Abb. 241).



**Abbildungen 229 – 234: FISH-Analyse mit der Centromer-spezifischen Sonde pAWrc auf mitotische Chromosomen des Roggens im Verlauf des Zellzyklus. Die biotinylierte DNA-Sonde wurde mit Cy3 (rot) nachgewiesen. Die Chromosomen sind mit DAPI (blau) kontrastiert.**

In der Interphase können 14 polare Signale Centromersignale nachgewiesen werden (Abb. 229). In der Prophase hybridisiert die Sonde auf den proximalen Bereich der Centromerregion, wobei ein kleiner interstitieller signalfreier Zwischenraum nicht markiert wird (Abb. 230). In den Prophasestadien markiert die Sonde mehr oder weniger gleichmäßig den Centromerbereich (Abb. 231). Im Verlauf der Prometaphase ist die Signalbande deutlich verkürzt (Abb. 232). In der Metaphase können Signale auf beiden Chromatiden nachgewiesen werden (Abb. 233). In der Anaphase ist ein gleichmäßiger Signalbereich im Centromer sichtbar (Abb. 234)

In Ana- (Abb. 242) und Telophase (Abb. 243) bleibt der tangentielle Status des Centromers erhalten. In der Interkinese können 7 Signale beobachtet werden, die im Vergleich zur Telophase und frühen Prophase II deutlich vergrößert sind (Abb. 244). Im Gegensatz zur mitotischen Prophase kann in dem frühen Prophasestadium der Meiose II auf beiden Chromatiden individuelle Signale nachgewiesen werden. Der zentrale Centromerbereich bleibt auch hier unmarkiert (Abb. 245). In der Metaphase II kennzeichnen vier Signalpunkte den Centromerbereich eines Chromosoms: Je ein Signal pro Chromatidenarm. In der Anaphase kann nur noch ein Signal pro Chromosom unterschieden werden (Abb. 246).



**Abbildungen 235 – 246: FISH-Analyse mit der Centromer-spezifischen Sonde pAWrc-Cy3 (rot) auf meiotische Chromosomen des Roggens im Verlauf des Zellzyklus. Die Chromosomen sind mit DAPI (blau) kontrastiert.** In der premeiotischen Interphase können 28 distinkte Signale nachgewiesen werden (Abb. 235). Im Zygotän markieren 7 langgestreckte Signalbanden den gesamten Centromerbereich. Nur vereinzelt sind verzweigte Signale durch nicht vollständig gepaarte Homologe sichtbar (Abb. 236). Im Pachytän ist ein ausgedehnter Centromerbereich beider Homologer markiert (Abb. 237). Im Diplotän ist die Signalbande deutlich reduziert (Abb. 238). In der Diakinese können Signale der individuellen Chromosomen unterschieden werden (Abb. 239). In der Diakinese wird eine Signalverlagerung zur Aussenseite der Chromosomen sichtbar (Abb. 240). In der Metaphase I ist nur ein monopolarer Signalbereich des Centromerbereiches nachweisbar (Abb. 241). Auf einigen herausgezogenen Fibrillen können Signale der Sonde nachgewiesen werden. In der Ana- (Abb. 242) und Telophase I (Abb. 243) bleibt die Metaphase-Organisation der Telomere erhalten. In der Interkinese können 7 unterschiedlich starke Signalbereiche unterschieden werden (Abb. 244). Prophase II- (Abb. 245) und Metaphase II-Chromosomen zeigen Signale auf beiden Chromatiden (Abb. 246).

### 3.7. Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen der Lilie im REM

Meiotische Chromosomen der Lilie (*Lilium longiflorum*:  $2n = 14$ ) wurden nach unterschiedlichen Präparationsprotokollen präpariert und Strukturdetails bei geringer und hoher Vergrößerung im REM dargestellt.

#### 3.7.1. Chromosomentropfpräparation nach „3:1“-Fixierung

Meiotische Chromosomen der Lilie wurden in „3:1“-Fixativ (Ethanol/Eisessig) fixiert und mit Hilfe der Cellulase/Pectolyase-Behandlung isoliert. Die dreidimensionale Struktur der Chromosomen bleibt bei dieser Präparation gut erhalten (Abb. 247 – 252). Bei REM-Analysen zeigt sich deutlich, daß die Chromosomenspreitungen mehr oder weniger von Cytoplasmatischen maskiert werden, so daß eine Ultrastrukturanalyse bis zur 30 nm-Fibrille meist nicht möglich ist.

#### **Zygotän**

Bei der REM-Analyse von Zygotänstadien der Lilie werden deutlich gepaarte und ungepaarte Chromosomen sichtbar. Mehrere Chromomere, die den heterochromatischen Bereichen im LM entsprechen, treten deutlich hervor (Abb. 247 und 248). Auch bei hoher Vergrößerung ist die Chromosomenoberfläche glatt und verhindert so eine Feinanalyse der Chromatinfibrillen (Abb. 248).

#### **Pachytän**

Im Pachytän liegen die Homologen verknäuel, ohne daß freie Telomerbereiche sichtbar werden (Abb. 249). Die Chromosomenoberfläche ist einheitlich glatt, so daß gleichfalls keine Darstellung von Fibrillen möglich ist (Abb. 250). Heterochromatische Segmente treten deutlich hervor. Individuelle homologe Chromosomen können aufgrund der engen Paarung im Gegensatz zur mitotischen Prophase nicht unterschieden werden. Eine Präparation von Chromosomen der

---

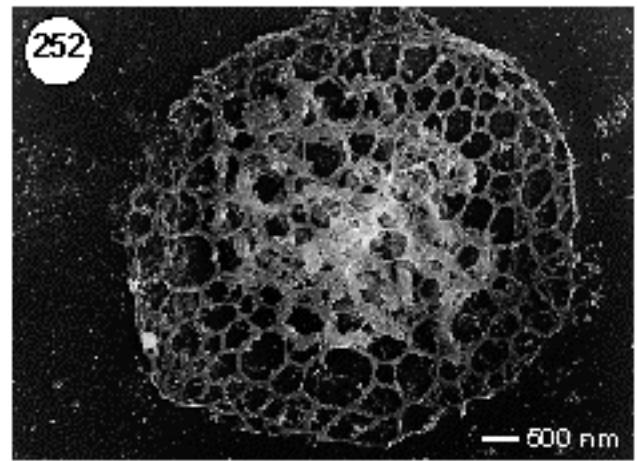
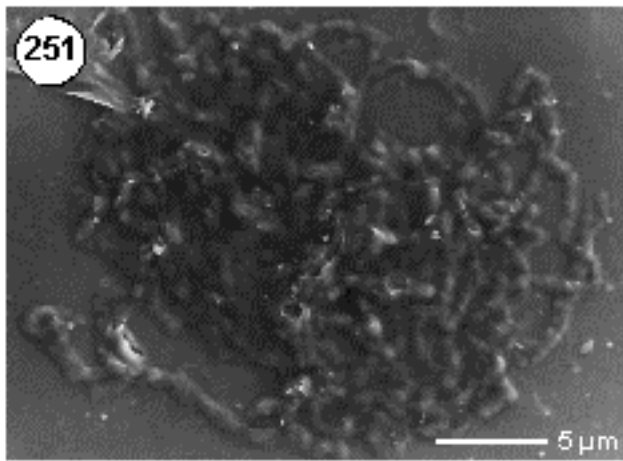
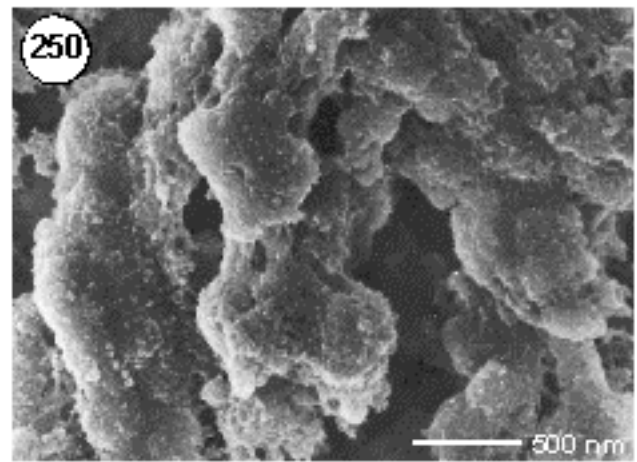
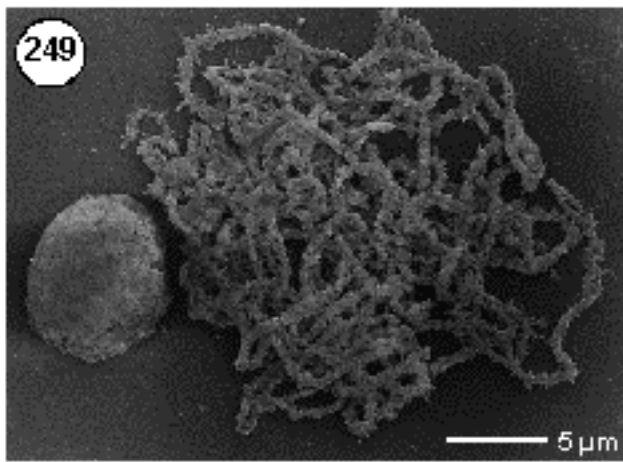
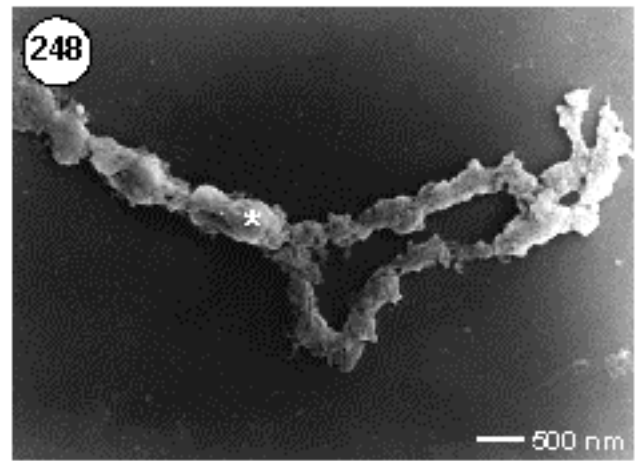
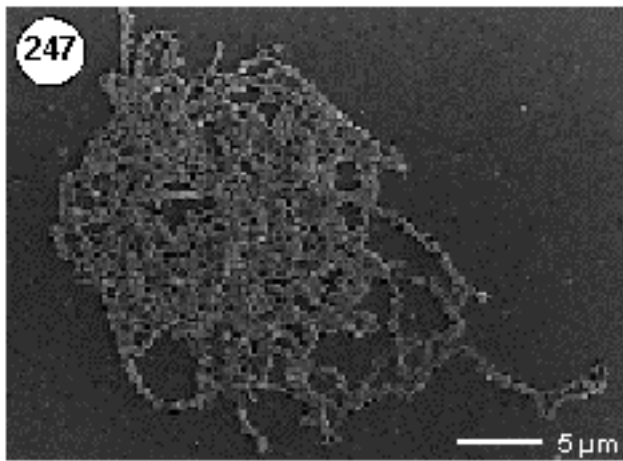
#### **Abbildungen 247 – 252: Strukturanalyse meiotischer Chromosomen der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach „3 : 1“ Fixierung und Cellulase/Pectolyase-Behandlung im REM**

**Abbildungen 247 – 248:** Im Zygotän sind dünne Chromosomen mit heterochromatischen Segmenten erkennbar. Homologe sind über weite Bereiche gepaart (Abb. 247). Bei hoher Vergrößerung werden keine Strukturdetails der Fibrillen sichtbar. Im Paarungsbereich treten Chromomere dominant hervor (Abb. 248; Stern).

**Abbildungen 249 – 250:** Im Pachytän liegen die gepaarten Chromosomen stark verknäuel neben einem mitotischen Interphasekern (Abb. 249). Bei hoher Vergrößerung wird eine glatte Oberflächenstruktur sichtbar, die keinen Einblick in den fibrillären Aufbau ermöglicht. Chromomere treten deutlich hervor (Abb. 250).

**Abbildungen 251 – 252:** Die Chromosomenspreitungen sind häufig durch Cytoplasmatischen kontaminiert, die eine Strukturanalyse im REM verhindern (Abb. 251). Im Pollenstadium bleiben Teile der Zellwand (Exine) erhalten, während Bereiche der Intine durch die Enzymmischung verdaut wurden. Die Chromosomen sind noch weitgehend kondensiert (Abb. 252).





frühen Prophasestadien war häufig aufgrund störender Cytoplasmaschichten, welche die Chromosomenspreitungen maskierten, nicht möglich (Abb. 251).

Die Präparation erwies sich als ungeeignet um Chromatin des Pollenstadiums aus der Pollenzelle freizusetzen. Wie Abbildung 252 zeigt bleiben die Exine der PZW erhalten, während die Intine durch die Cellulase-Pectolyase-Behandlung zerstört wurden. Chromosomen, die kaum decondensiert sind, werden teilweise sichtbar.

### 3.7.2. Chromosomenquetschpräparation nach Glutaraldehydfixierung

Pollenmutterzellen der Lilie, die in Glutaraldehyd (2,5%) fixiert wurden, können durch die Quetschtechnik aus den Zellen freigesetzt werden. Die Ausbeute an verwertbaren Chromosomenspreitungen ist bei dieser Präparationstechnik im Vergleich zu Chromosomentropfpräparationen deutlich geringer. Eine Isolierung der Chromosomen aus Pollenzellen ist nicht möglich. Im REM zeigt sich, daß die dreidimensionale Struktur der Chromosomen, insbesondere die Anordnung heterochromatischer Strukturen, gut erhalten bleibt. Das Chromatin erscheint nach der Glutaraldehydfixierung deutlich aufgelockert, wobei der Chromosomendurchmesser im Pachytän mit 600 nm im Vergleich zu 490 nm der Ethanol- bzw. „3:1“-Fixierung leicht erhöht ist. Im Gegensatz zu Analysen am Roggen können ultrastrukturelle Details der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen, wie Fusionen und Verdrillungen, aufgrund der leichten Maskierung der Fibrillenstruktur meist nicht untersucht werden.

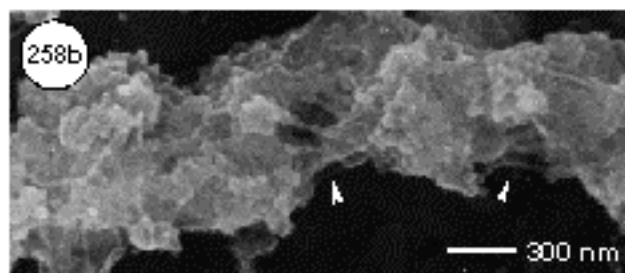
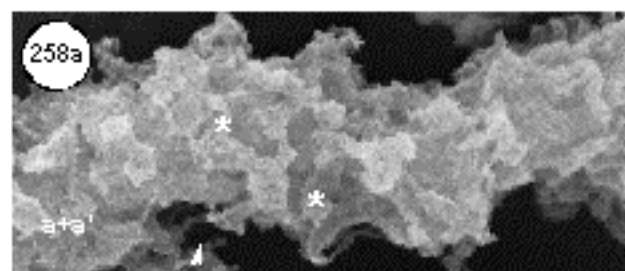
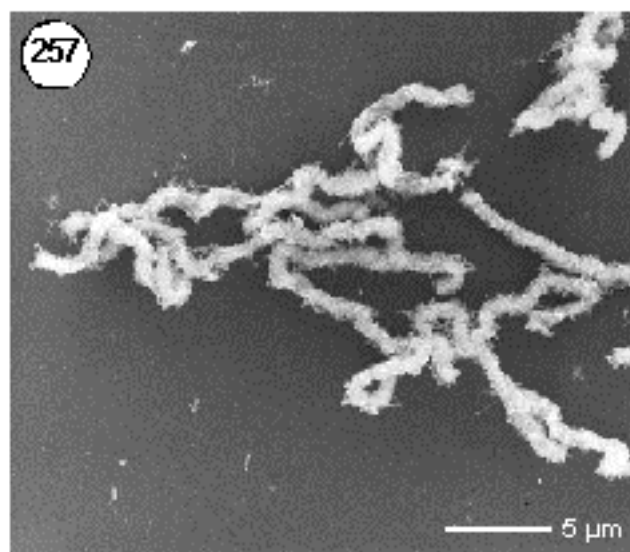
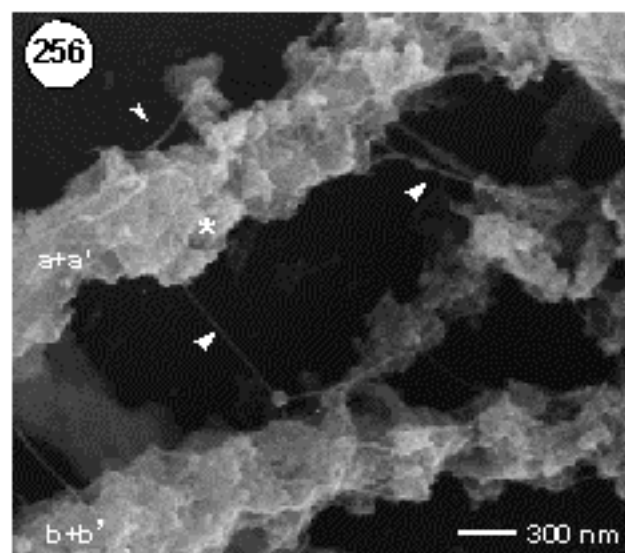
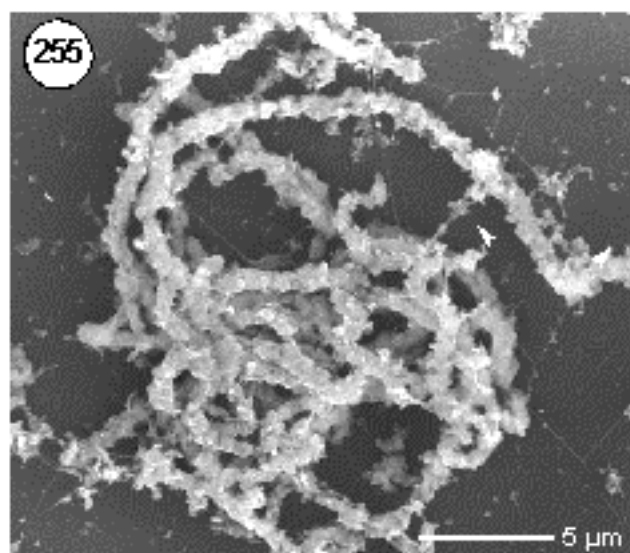
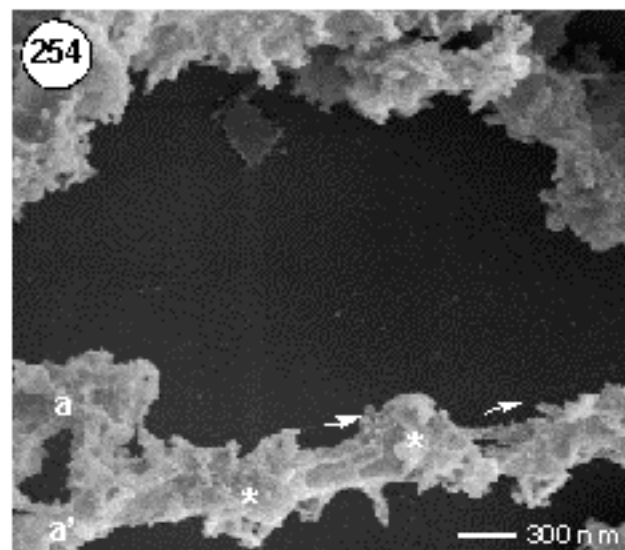
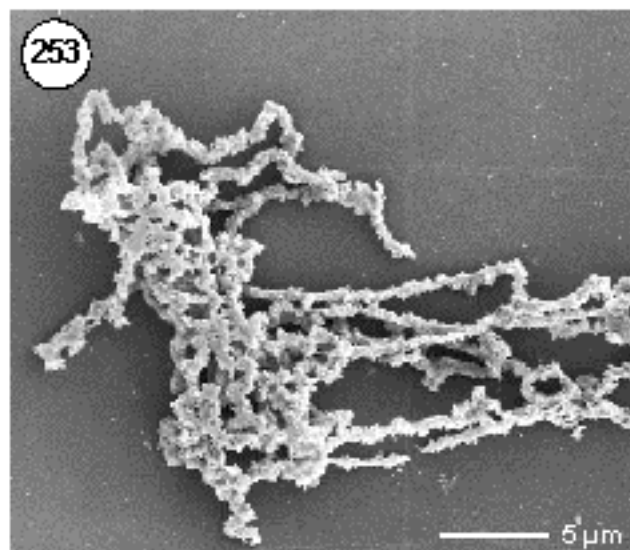
---

#### **Abbildungen 253 – 258: Strukturanalyse meiotischer Chromosomen der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Glutaraldehyd-Fixierung im REM.**

**Abbildungen 253 – 254:** Die Chromosomen des Zygotän weisen bei geringer Vergrößerung eine unregelmäßig strukturierte Chromosomenoberfläche auf (Abb. 253). Bei hoher Vergrößerung werden alternierend Chromomer-ähnliche Strukturen (Sterne) und parallele Abschnitten (Pfeile) sichtbar (Abb. 254). Der Übergang zum Paarungsabschnitt homologer Chromosomen ( $a+a'$ ) ist durch eine Überlagerung von geknäuelten Fibrillen nicht darstellbar.

**Abbildungen 255 – 256:** Im Pachytän sind die Homologen vollständig gepaart. Vereinzelt werden verbindende Fibrillen zwischen nicht-homologen Chromosomen sichtbar (Abb. 255; Pfeilspitze). Bei hoher Vergrößerung wird eine Segmentierung der Chromosomen durch Chromomere deutlich. Verbindende Fibrillen treten zwischen nicht-homologen Chromosomen ( $a+a'$ ) und ( $b+b'$ ) sowie zwischen individuellen Chromomeren eines gepaarten Chromosomenpaares auf (Abbildung 256; Pfeilspitzen).

**Abbildungen 257 – 258:** Im Diplotän sind die Chromosomen mehr oder wenig zylindrisch. Konstriktionen können nicht nachgewiesen werden (Abbildung 257). In Hochauflösung wird eine Strukturierung der Chromosomenoberfläche durch unterschiedlich große Chromomere sichtbar (Abb. 258a). 10 nm- und 30 nm-Fibrillen treten als verbindende Elemente zwischen den individuellen Chromomeren auf (Abb. 258a und 258b; Pfeilspitzen) und führen scheinbar zu einer Chromosomenverkürzung.



### ***Zygotän***

Im Zygotän zeigt sich eine Chromosomenstruktur, die von peripheren Chromomeren geprägt ist (Abb. 253). Bei hoher Vergrößerung werden geknäuelte und längsorientierte Bereiche sichtbar, die alternierend angeordnet sind (Abb. 254). An einigen wenigen Stellen kann eine scheinbar spiralige Verdrillung der homologen Chromosomen beobachtet werden, die im Pachytän nicht mehr auftritt.

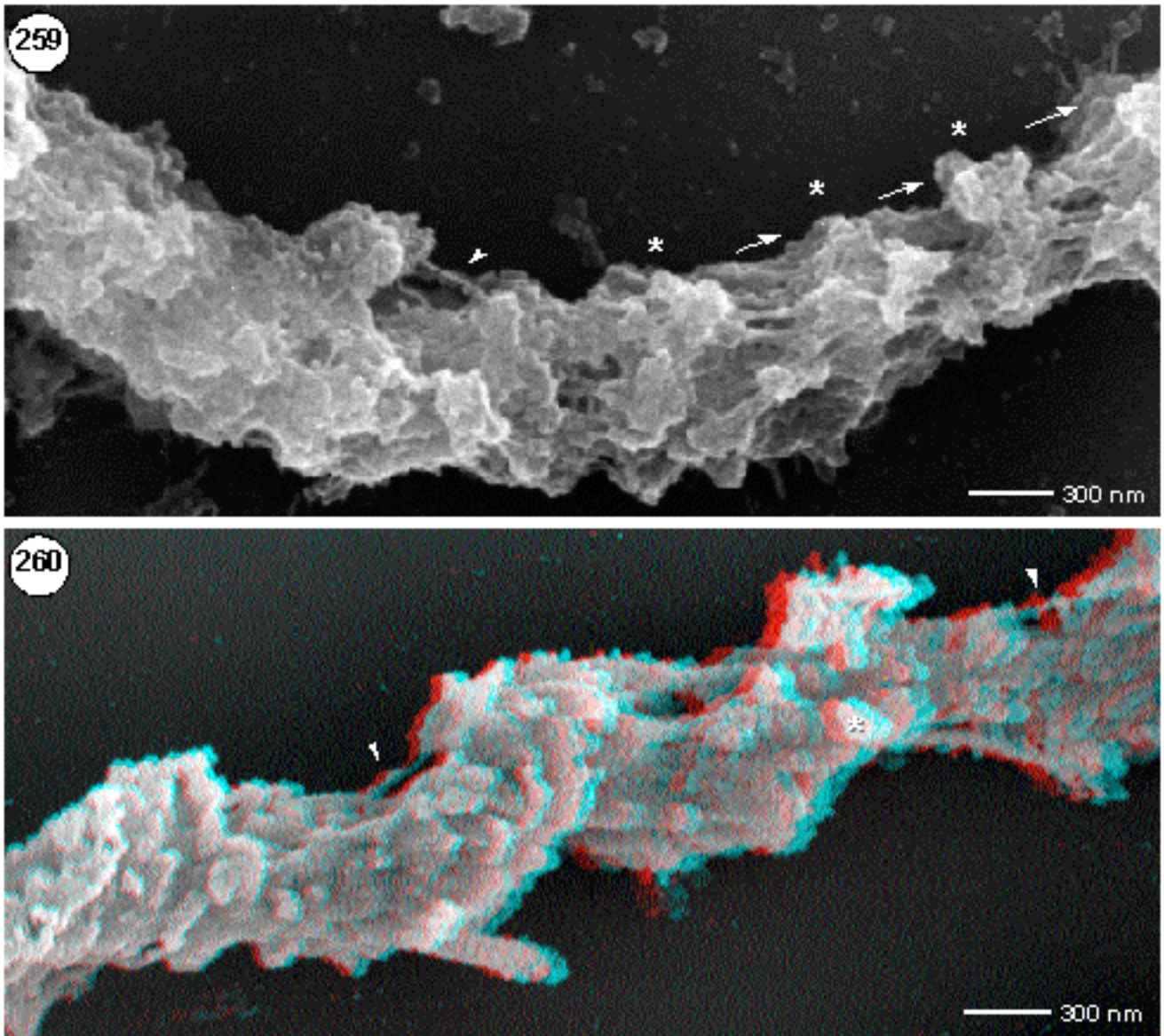
### ***Pachytän***

In der 3D-Darstellung eines Details aus dem Pachytänstadium wird die Strukturierung des Chromosomenkörpers durch heterochromatische Bereiche sichtbar (Abb. 255). Zwischen nicht-homologen Chromosomen als auch zwischen individuellen Chromomeren eines Chromosoms können verbindende Fibrillen von 10 nm und 30 nm im Durchmesser beobachtet werden (Abb. 256; Pfeilspitze). Der Chromosomenkörper nimmt mit Zunahme der Kondensation eine zylindrische Form an (Abb. 255 und 256), wobei auf der Chromosomenoberfläche verstärkt Chromomere ausgeprägt werden. Bereiche mit längsorientierten Fibrillen sind nicht mehr nachweisbar (Abb. 256).

### ***Diplotän***

Im Diplotän ist die Chromosomenoberfläche verstärkt durch Schichtenbildung im Nanometerbereich maskiert, so daß Feinstrukturen der gepaarten Homologen wie z.B. Chromomere, nur noch andeutungsweise erkennbar sind (Abb. 257 und 258).

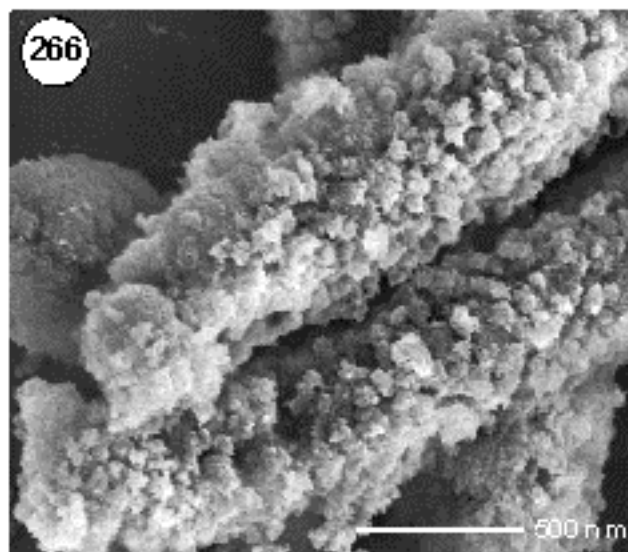
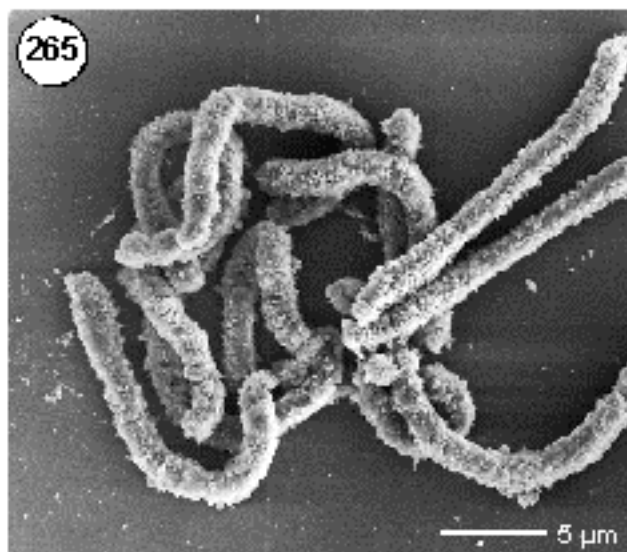
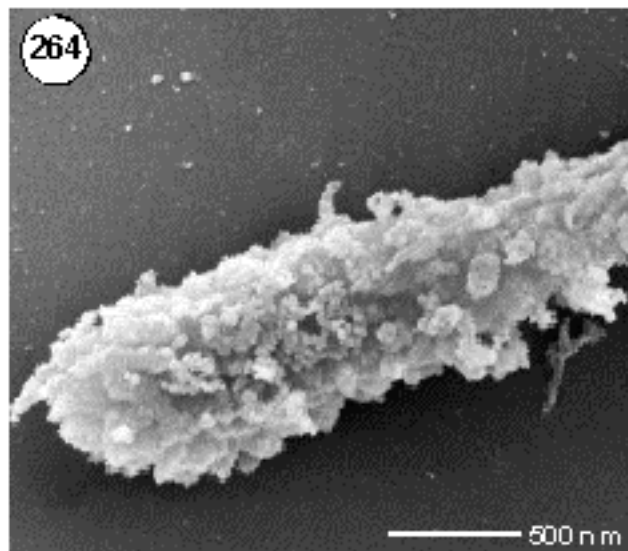
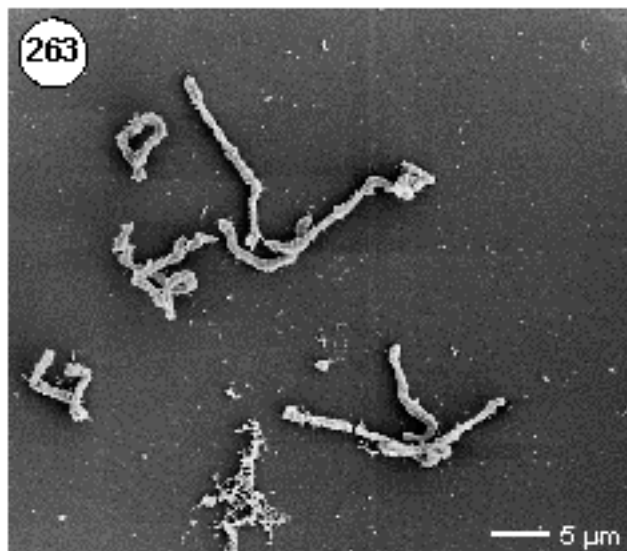
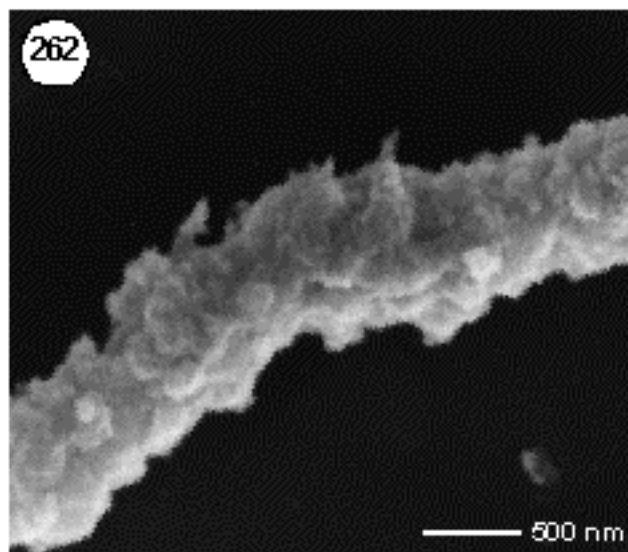
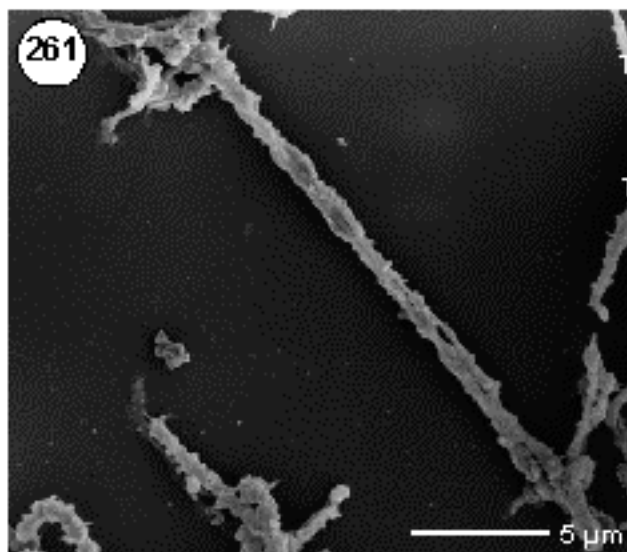
Die 3-D-Darstellungen geben Teilbereiche der Chromosomen des Zygotäns (Abb. 259) und Pachytäns wieder (Abb. 260). Im gering kondensierten Stadium des Zygotän wird die alternierende Organisation von geknäuelten (Abb. 259; Sterne) und parallelen Fibrillen (Abb. 259; Pfeile) sichtbar. Zwischen den benachbarten Chromomeren können einzelne verbindende Fibrillen beobachtet werden (Abb. 259; Pfeilspitze). Nur an wenigen Bereichen tritt eine leicht schraubenförmige Windung der gepaarten Homologen auf. Chromomere treten ungleich über den Chromosomenkörper auf. Einzelne Fibrillen verbinden chromosomale Bereiche in einem Abstand von 100 nm (Abb. 260). Mit Zunahme der Kondensation tritt eine deutliche Chromatinverdichtung ein. Die eng benachbarten Homologen können nur bei guter Spreitung unterschieden werden (Abb. 261). Fibrilläre Strukturen sind kaum erkennbar (Abb. 262). Im Gegensatz zu Meiose I-Stadien können in den mitotischen Prophasestadien eine deutliche Strukturierung der Chromosomenoberfläche in Chromomere beobachtet werden. Der Durchmesser der Chromomeren der Lilie ist mit etwa 220 nm im Vergleich zu denen des Roggens und der Gerste reduziert (Abb. 263 und 264). In der Prometaphase sind die Chromosomen zylindrisch und die Oberfläche von kleinen Chromomere geprägt. Primäre und sekundäre Konstriktionen sind nur schwach ausgeprägt (Abb. 265 und 266).

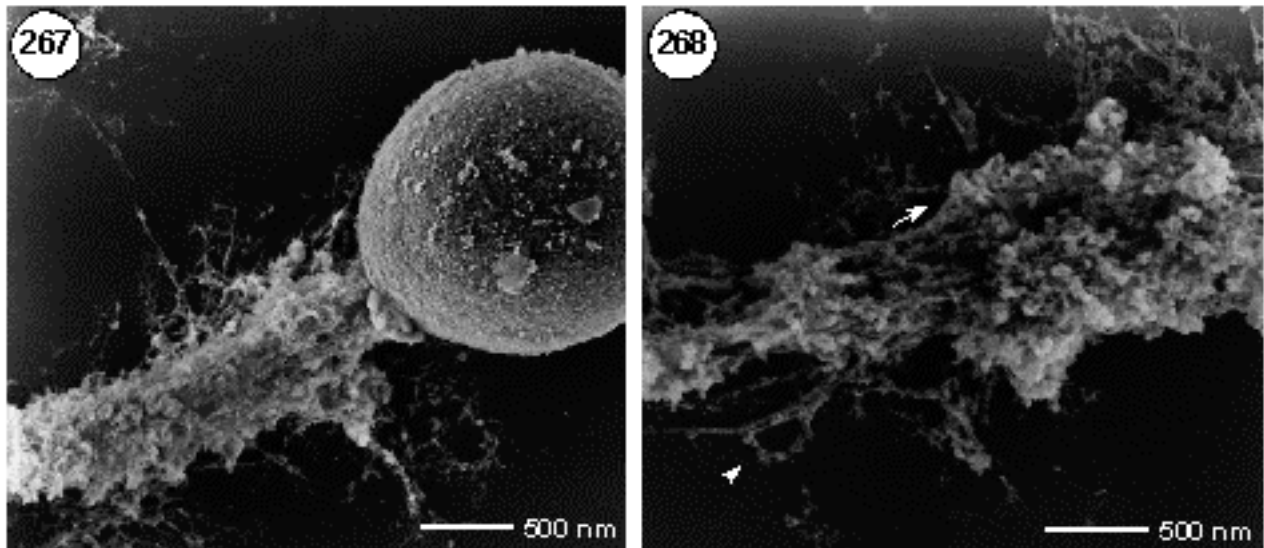


**Abbildungen 259 – 260: 3D-Darstellung des Pachytäns der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Glutaraldehyd-Fixierung im REM.**

**Abbildung 259:** Im Pachytänstadium wird eine alternierende Anordnung von Chromomeren (Sterne) und längsorientierten Fibrillen (Pfeile) sichtbar. Verbindende Elemente treten insbesondere zwischen den individuellen Chromomeren auf (Pfeilspitzen).

**Abbildung 260:** Die Paarung der Homologen ist so vollständig, daß kein Blick in den SC möglich ist. Chromomere sind deutlich ausgeprägt. Individuelle Fibrillen verbinden entfernte Chromomere (Pfeilspitzen). An einigen wenigen Abschnitten sind die Chromosomen schraubenförmig verdreht.





**Abbildungen 261 – 266: Strukturanalyse meiotischer Chromosomen der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Glutaraldehyd-Fixierung im REM.**

**Abbildungen 261 – 262:** Im Diplotän sind die Chromosomen mehr oder weniger zylindrisch. Individuelle Chromosomen können über kurze Abschnitte im Paarungsbereich unterschieden werden (Abbildung 261). Bei hoher Vergrößerung werden unterschiedlich große Chromomere sichtbar. Strukturdetails der 30 nm-Fibrille werden durch Schichten maskiert.

**Abbildungen 263 – 264:** In der mitotischen Prophase sind die Chromosomen zylindrisch (Abb. 265). Bei hoher Vergrößerung wird die kompakte Oberflächenstruktur der Chromomere sichtbar (Abb. 266).

**Abbildungen 265 – 266:** Bei mitotischen Prophasestadien wird eine granuläre Chromosomenstruktur sichtbar (Abb. 265), die sich bei hoher Vergrößerung als eng-benachbarte Chromomere darstellt (Abb. 264).

**Abbildungen 267:** Globuläre Strukturen („dense-bodies“) sind häufig mit den meiotischen Chromosomen des Meiose I-Zyklus assoziiert.

**Abbildung 268:** Bei guter Auflockerung der Chromosomen wird der alternierende Aufbau in geknäuelte und längsorientierte (Peil) Segmente sichtbar. Einzelne Chromatinschlaufen (Pfeilspitze) können unterschieden werden.

Die Chromosomenspreitungen weisen häufig kleinere, globuläre Körperchen, „dense bodies“, von 1 - 3  $\mu\text{m}$  im Durchmesser auf, welche die Chromosomen umgeben oder mit ihnen in Verbindung stehen (Abb. 267). Bei guter Auflockerung der Chromosomenstruktur werden längsorientierte Fibrillen und alternierende geknäuelte Fibrillen sichtbar, wie sie auch im Roggen beobachtet werden (Abb. 268). Einzelne 30 nm Fibrillen, die an der Peripherie gut spreiten, bilden Chromatinschlaufen aus.

### ***3.7.3. Ultrastrukturanalyse (REM) meiotischer Chromosomen der Lilie mit neu-etablierter Präparationsmethode in Isolierungspuffer (IDe)***

Die neu etablierte Präparationstechnik mit Isolierungspuffer (IDe), modifiziert nach BURKHOLDER und MUKHERJEE (1970), erweist sich als schnelle Methode zur Isolierung meiotischer Chromosomen der Lilie, einschließlich der Chromosomen des Pollenstadiums. Nach einer kurzen Fixierung in 70% Ethanol für 1 – 2 Stunden und anschließender Behandlung in einem Puffersystem (IDe) definierter Ionenstärke können meiotische Chromosomen aus Meiose I- und II-Stadien frei von störendem Zytoplasma und Kernkomponenten dargestellt werden. Im Gegensatz zu „3:1“- (Ethanol/Eisessig)-fixiertem Material können die Nukleolus-organisierende Regionen sowie „dense bodies“, kleine globuläre Körperchen von etwa 1 µm Durchmesser, in der Interphase und im Leptotän nachgewiesen werden. Bestandteile der Kernmembran, des Cytoplasmas und der Zellwand bleiben teilweise erhalten, ohne daß diese die Chromosomen maskierten.

Chromosomen aus Meiose I (Abb. 269 – 285) und II (Abb. 286 – 289) zeigen in allen untersuchten Stadien eine charakteristische Organisation der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen in geknäuelte und längsorientierte Segmente, wie sie auch im Roggen und der Zuckerrübe nach „3:1“-Fixierung beobachtet werden. Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille (Fusionen, knötchenförmige Strukturen, Schlaufen) können in allen Stadien nachgewiesen werden. Während in den kondensierten Stadien von Pachytän und Metaphase die Chromosomenstruktur dreidimensional gut erhalten bleibt, flachen die Chromosomen in den frühen Prophasen auf dem Objektträger deutlich ab.

#### ***Interphase***

In Interphasen wird schon bei geringer Vergrößerung eine netzartige Architektur des Chromatins sichtbar, ohne daß individuelle Chromosomen nachweisbar sind (Abb. 269). Bei hoher Vergrößerung zeigt sich eine komplexe Organisation der 30 nm-Fibrille in Bereichen mit geknäuelten und längsorientierten Fibrillen (Abb. 270).

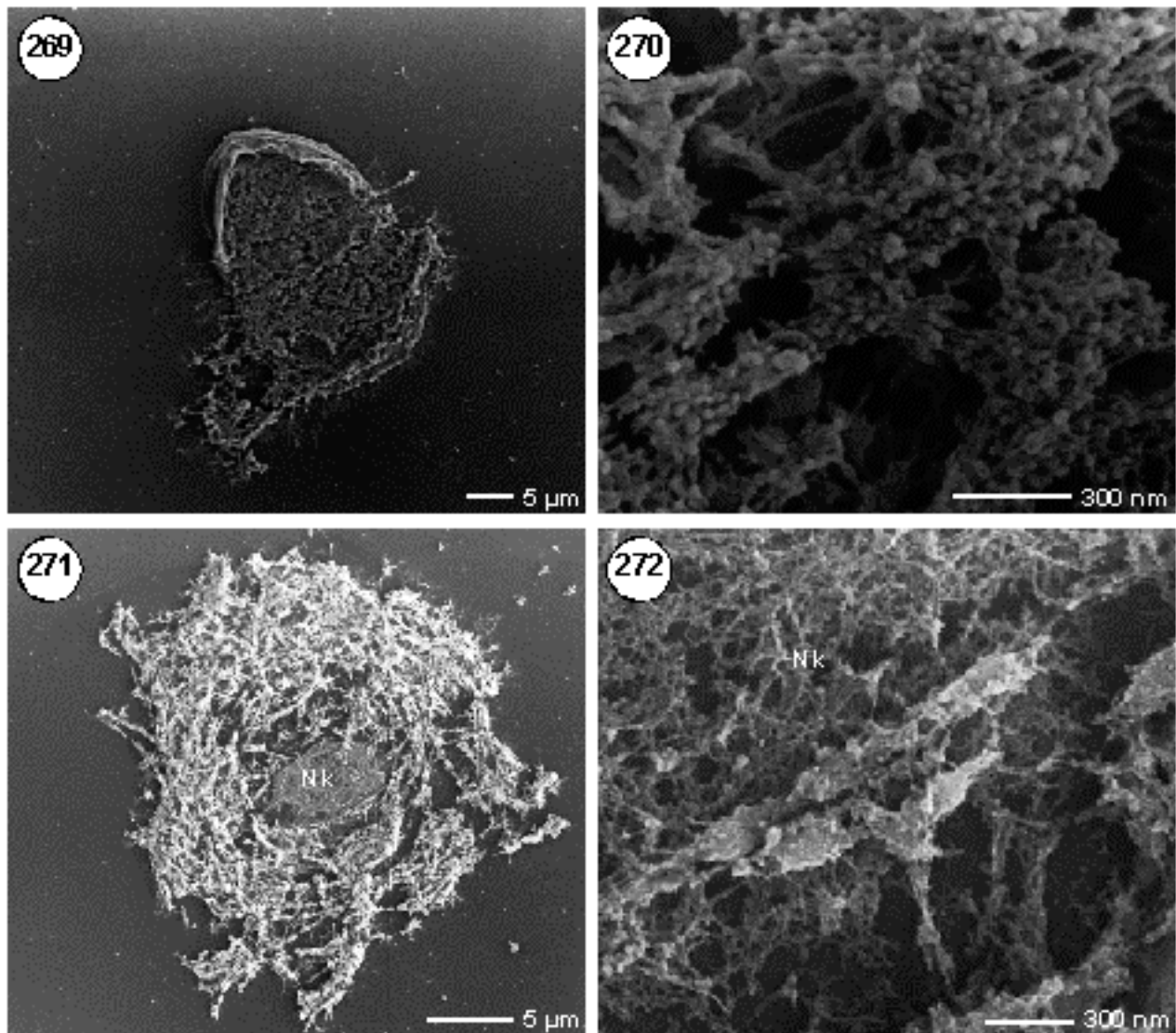
#### ***Leptotän***

Im frühen Leptotän werden erstmals dünnfädige Chromosomen sichtbar (Abb. 271). Der Nukleolus (Nk) bleibt nach der Chromosomentropfpräparation als fibrilläres Netzwerk erhalten. Bei hoher Vergrößerung zeigt sich deutlich eine Matrix aus Fibrillen von überwiegend 10 nm Durchmesser, die mit den terminalen Bereichen individueller Chromosomen assoziiert sind (Abb. 272).

#### ***Zygotän***

Mit Zunahme der Kondensation können im Zygotän kurze Abschnitte gepaarter homologer Chromosomen wahrgenommen werden (Abb. 273). Bei hoher Vergrößerung werden

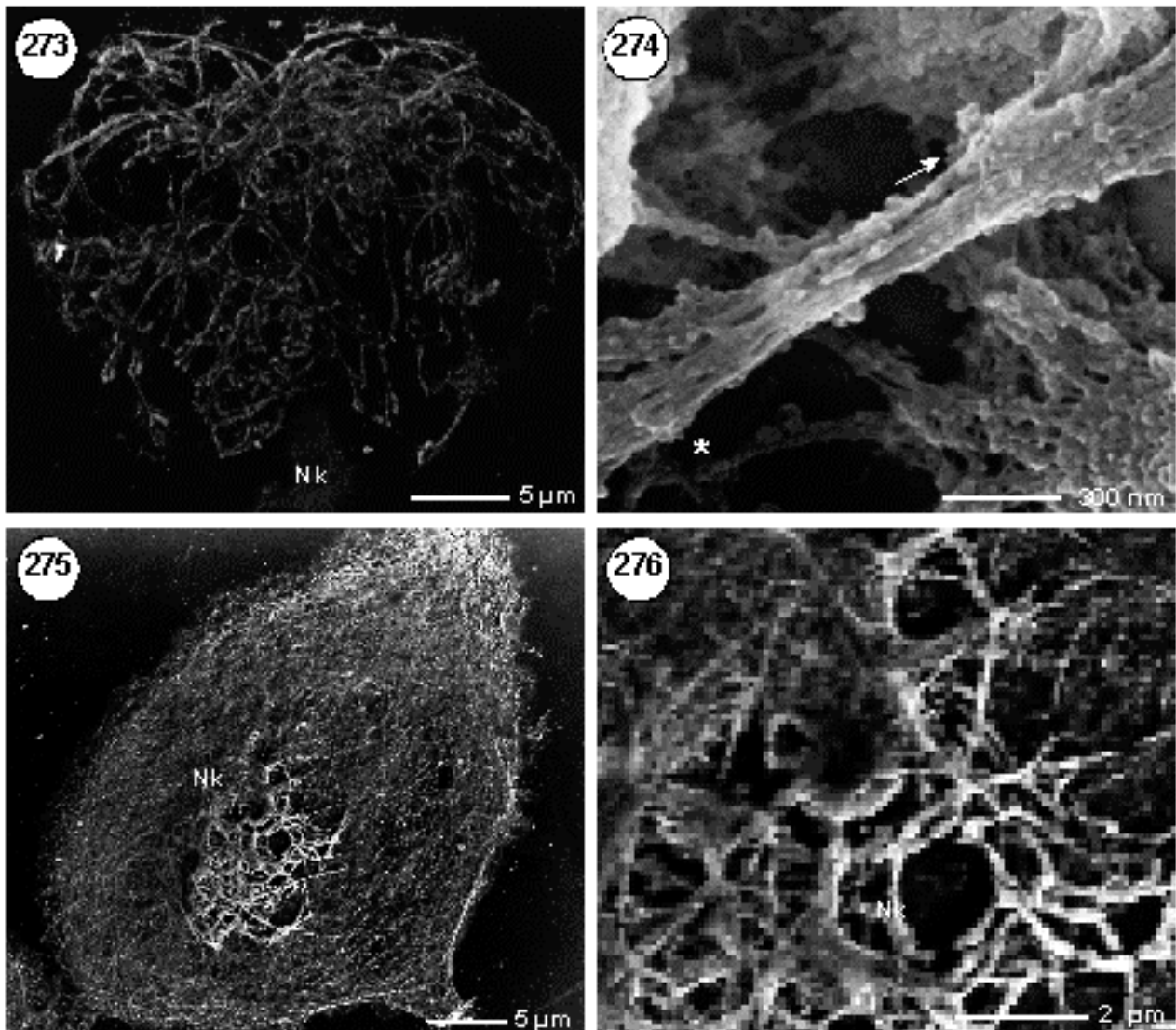




**Abbildungen 269 – 272: Strukturanalyse früher meiotischer Prophasen der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

**Abbildungen 269 – 270:** Prämeiotische Pollenmutterzellen zeigen nach dem Aufplatzen eine granuläre Chromatinorganisation. Die Pollenzellwand bleibt teilweise erhalten (Abb. 269) Bei hoher Vergrößerung wird ein komplexes Netzwerk aus 10 nm- und 30 nm-Fibrillen sichtbar (Abb. 270).

**Abbildungen 271 – 272:** Im Leptotän können die Chromosomen als dünne Fäden unterschieden werden. Der Nukleolus (Nk) bleibt nach der Präparation erhalten und grenzt sich vom umgebenden Chromatin klar ab (Abb. 271). Im Detail wird der Bereich eines Chromosoms sichtbar, der mit dem Nukleolus ein komplexes Netzwerk aus überwiegend 10 nm-Fibrillen bildet (Abb. 272).



**Abbildungen 273– 276: Strukturanalyse meiotischer Prophasen der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

**Abbildungen 273– 274:** Im frühen Zygotän liegen einige der Homologen eng benachbart. Bereiche gepaarter und ungepaarter Chromosomen und Reste des Nukleolus werden sichtbar (Abb. 273). Bei hoher Vergrößerung können längsorientierte Fibrillen (Pfeil), geknäuelte und einzelne Schlaufen (Stern) beobachtet werden (Abb. 274).

**Abbildungen 275– 276:** Gelegentlich bleiben außer dem Nukleolus (Nk) auch Bestandteile des Cytoplasma erhalten (Cpl). Die Chromosomen des Zygotän liegen verknäuelte, können aber vom umgebenden Cytoplasma unterschieden werden (Abb. 275). Bei hoher Vergrößerung werden Chromosomen von unterschiedlichem Durchmesser sichtbar, die mit den umgebenden cytoplasmatischen Bestandteilen in Verbindung stehen (Abb. 276; Nk = Nukleolus).

Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen, wie knotige Segmente und Verknäuelungen sowie parallele Abschnitte und Chromatinschlaufen, erkennbar, wie sie auch im Roggen auftreten (Abb. 274). Einzelne Chromatiden oder gepaarte Homologe können nicht unterschieden werden. Mit Zunahme der Kondensation nehmen die Chromosomen eine regelmäßige, fädige Struktur an. Aufgrund der „milden“ Präparationsmethode bleiben in einigen Stadien zytoplasmatische Bestandteile so gut konserviert, daß sie als Schicht die Chromosomen umgeben, ohne diese jedoch zu maskieren (Abb. 275). In diesen Stadien können Fibrillen zwischen den nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 276).

### ***Pachytän***

Im Pachytän ist die Paarung der Homologen so eng, daß individuelle Chromosomen selbst unter Hochauflösung nicht unterschieden werden können. In den hochauflösenden Detaildarstellungen von Zygo- und Pachytänstadien wird eine symmetrische Anordnung von Chromomeren sichtbar (Abb. 277 und 278). Zahlreiche Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille wie Fusionen oder Verdrillungen werden deutlich. Einzelne Verbindungen von 10 nm-Fibrillen treten zwischen verschiedenen Chromomeren und benachbarten, geknäuelten Fibrillen auf (Abb. 277; Pfeil). Die Fibrillen sind überwiegend längsorientiert und werden durch geknäulte Segmente (Chromomere) unterbrochen. Die Chromosomenabschnitte im Paarungsbereich sind überwiegend komplex

---

### **Abbildungen 277 – 278: Strukturanalyse des Pachytän der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

**Abbildung 277:** Im Pachytän sind die Homologen (a + a') vollständig gepaart und können nicht unterschieden werden. In Hochauflösung wird die Organisation der Chromosomen in 30 nm-Fibrillen sichtbar, die geknäuel (Chromomere) oder parallel angeordnet sind (Abb. 277). Einzelne Chromomere sind häufig über 10 nm-Fibrillen mit anderen Strukturelementen verbunden (Pfeil). Zahlreiche Sekundärstrukturen der Fibrillen wie Knäuelungen, Schlaufen, Verdrillungen und Fusionen werden sichtbar.

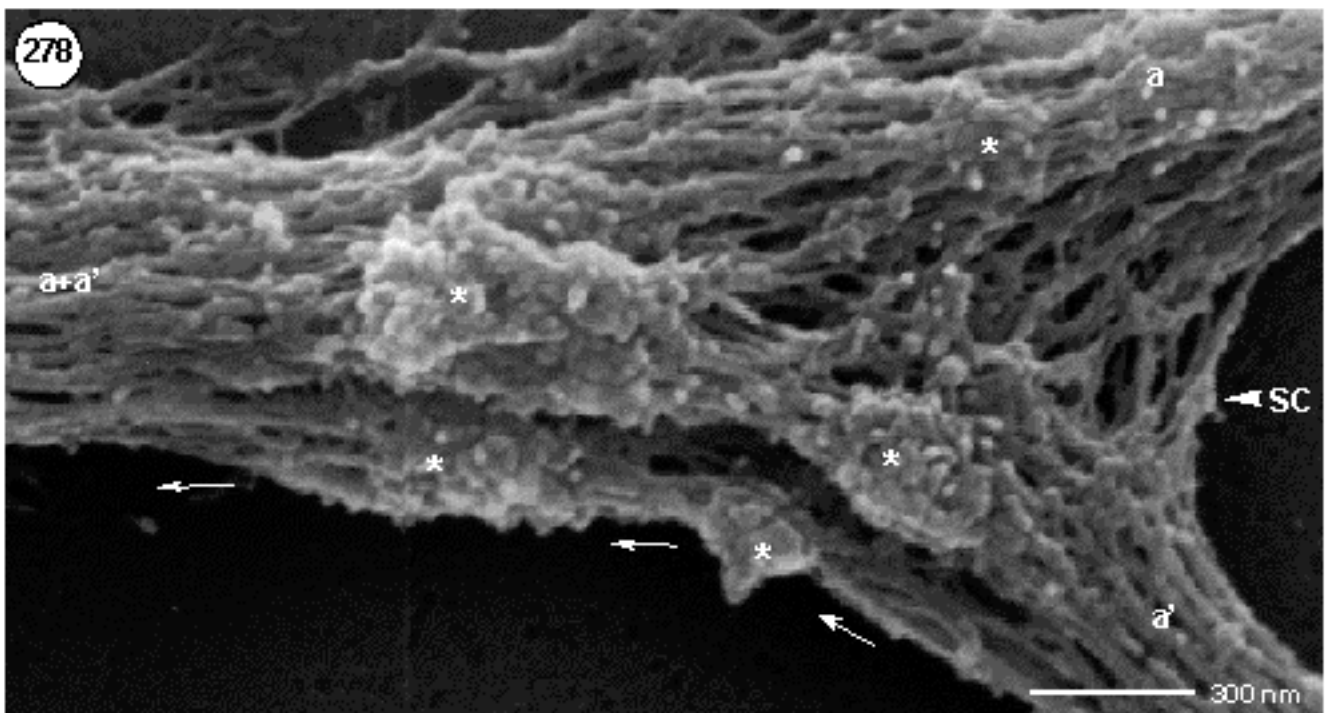
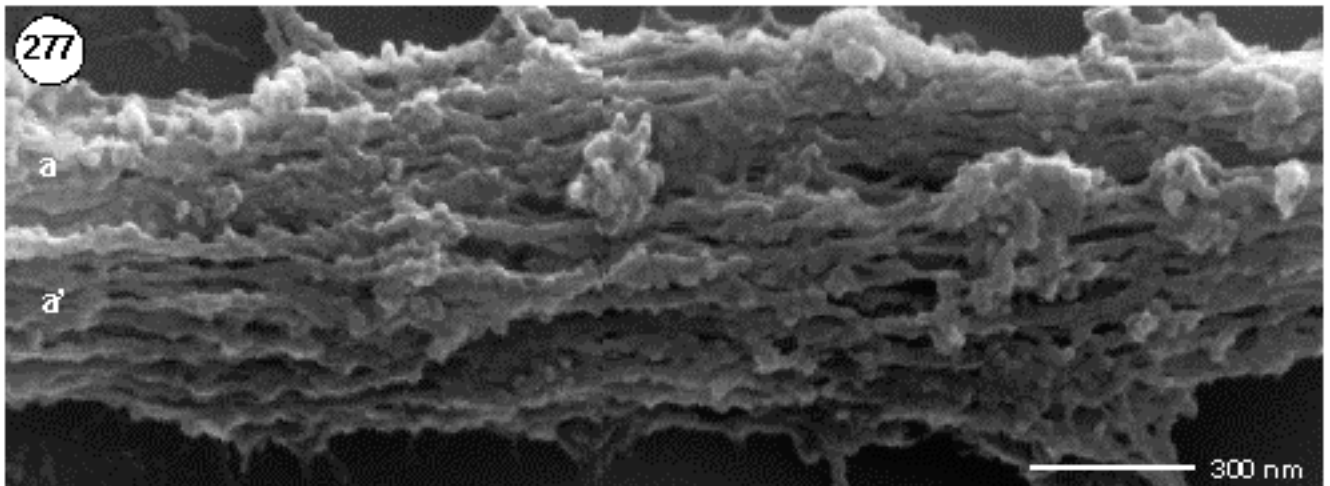
**Abbildung 278:** Im Paarungsbereich treten große Chromomere auf, die dominant hervorstehen. Zwischen den gepaarten, homologen Chromosomen a und a' wird ein komplexes Netzwerk aus 10 nm- und 30 nm Fibrillen im Bereich des synaptonemalen Komplexes (SC) sichtbar. Chromomere der beiden Homologen, aber auch der individuellen Chromatiden zeigen eine symmetrische Anordnung (Sterne).

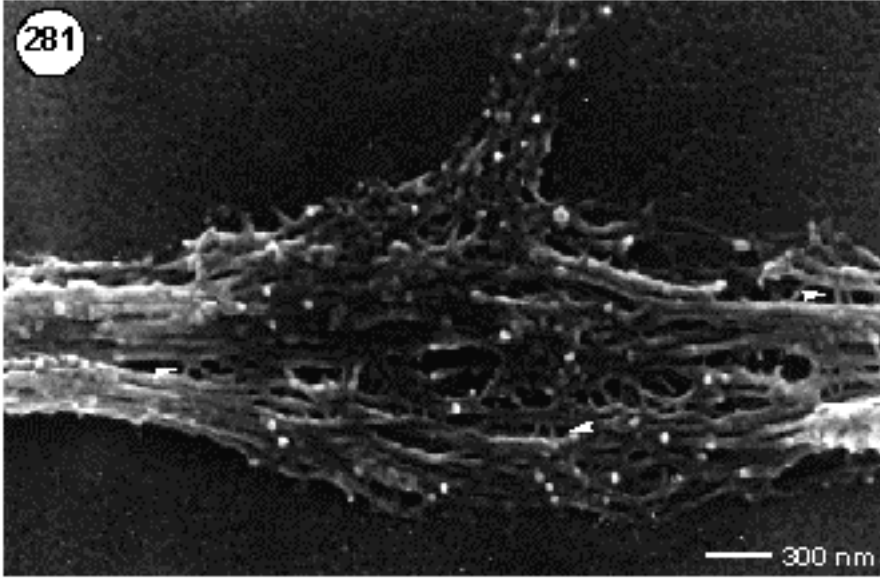
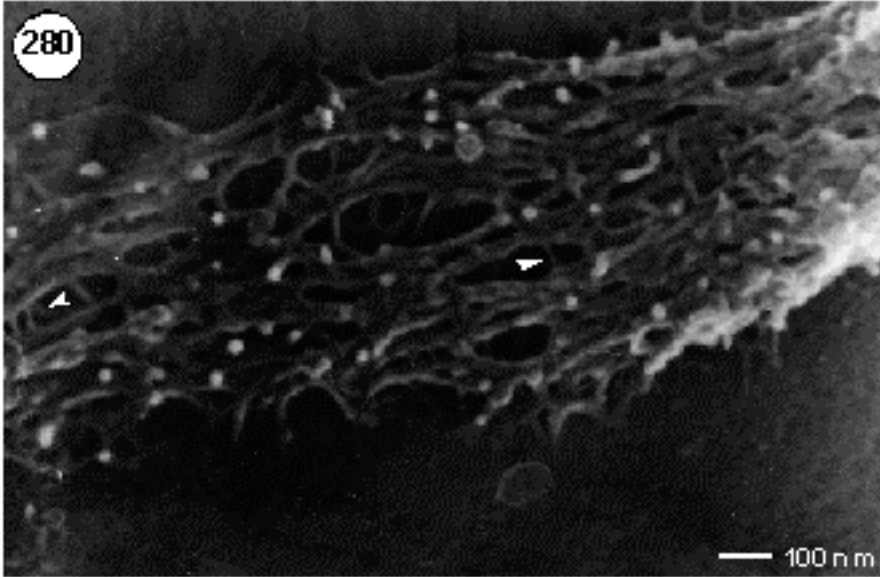
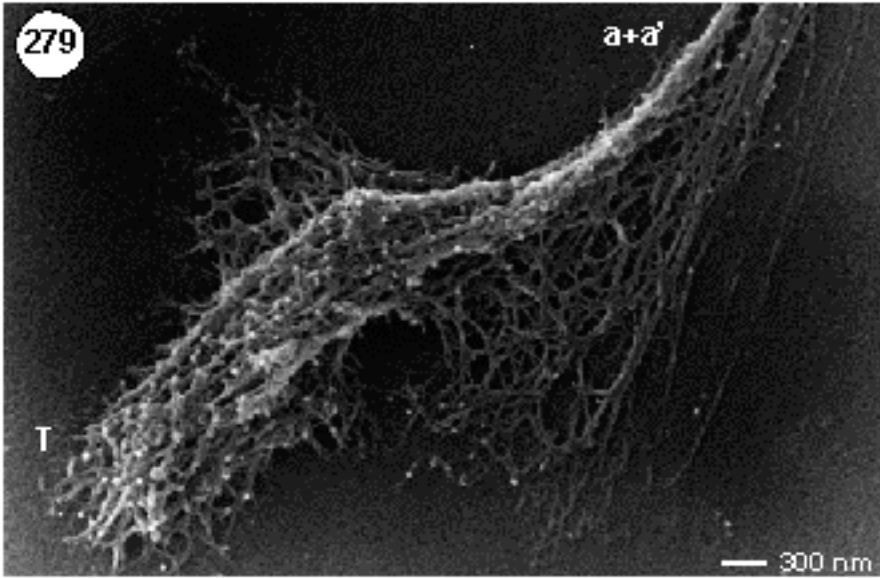
### **Abbildungen 279 – 281: Strukturanalyse meiotischer Telomerbereiche der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

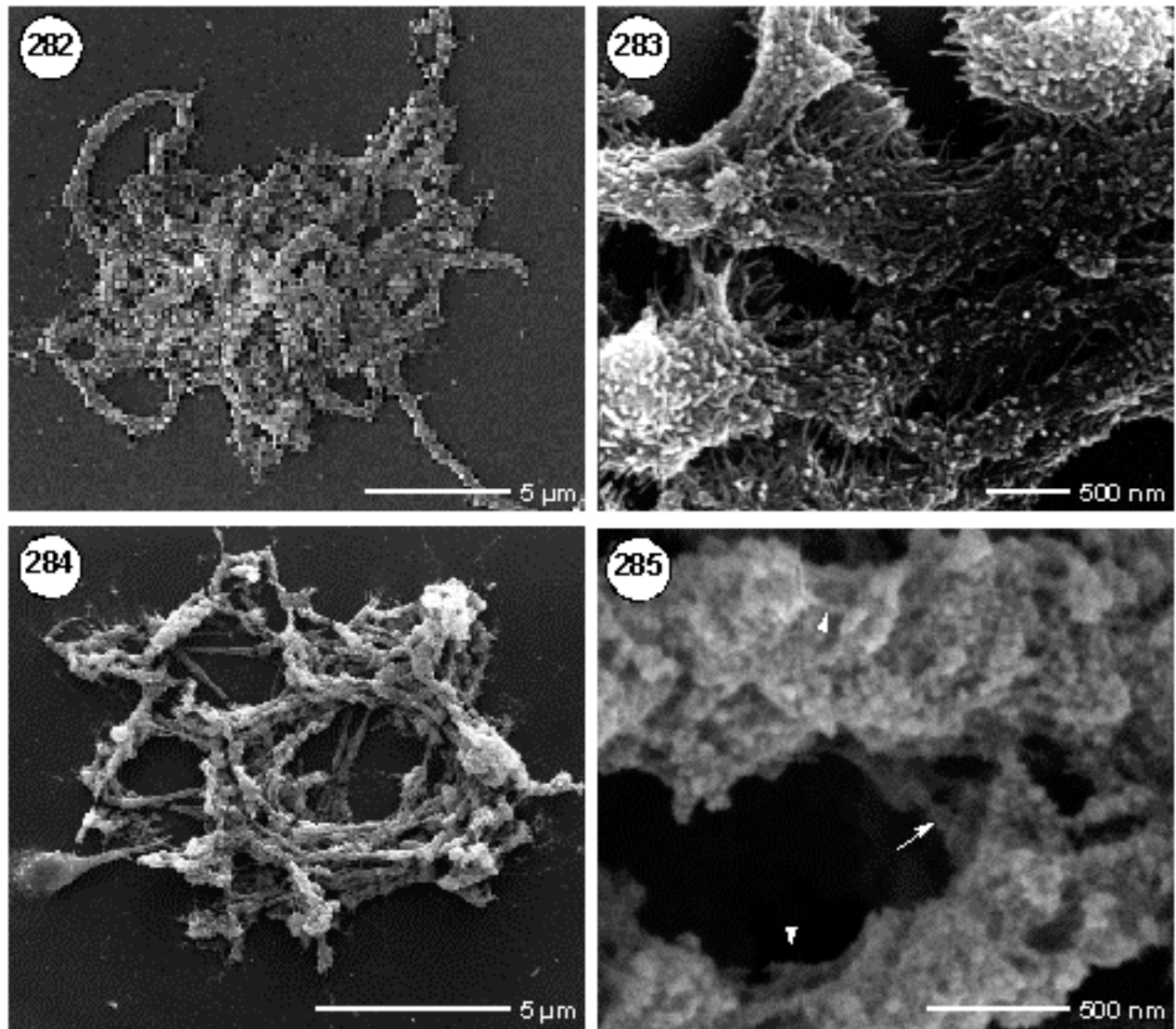
**Abbildung 279:** Die Fibrillen im Telomerbereich sind überwiegend geknäuel angeordnet, ohne daß Chromomere oder Verdichtungsgebiete sichtbar werden. In Bereichen mit guter Spreitung werden längsorientierte Fibrillen sichtbar.

**Abbildung 280:** Im subtelomeren Bereich können bei guter Spreitung längsorientierte 30 nm-Fibrillen beobachtet werden. Individuelle Fibrillen stehen mit benachbarten über 10 nm-Fibrillen in Verbindung (Abb. 281). Kleine knöpfchenförmige Strukturen sind häufig mit den Fibrillen assoziiert.

**Abbildung 281:** In Hochauflösung wird die komplexe Organisation der 30 nm-Fibrillen sichtbar, die über kurze Bereiche miteinander in Verbindung stehen. Vereinzelt können Chromatinschlaufen unterschieden werden. 10 nm-Fibrillen verbinden benachbarte 30 nm-Fibrillen (Pfeile).







**Abbildungen 282 – 285: Strukturanalyse des Diplotän der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

**Abbildung 282 – 283:** Im frühen Diplotän sind die Chromosomen deutlich verknäuelte (Abb. 282). Der Nukleolus ist nicht mehr nachweisbar. Bei hoher Vergrößerung können gepaarte Homologe, sowie zahlreiche, fibrilläre Verbindungen zwischen den nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 283).

**Abbildung 284 – 285:** Im späten Diplotän ist der Chromosomendurchmesser unregelmäßig (Abb. 284). Bei hoher Vergrößerung werden 30 nm-Fibrillen sichtbar, die stark verknäuelte sind. Die gepaarten Homologen stehen noch über 30 nm-Fibrillen mit benachbarten Chromosomen in Verbindung (Abb. 274). Einzelne Fibrillen werden zwischen den Chromomeren sichtbar (Pfeilspitzen).

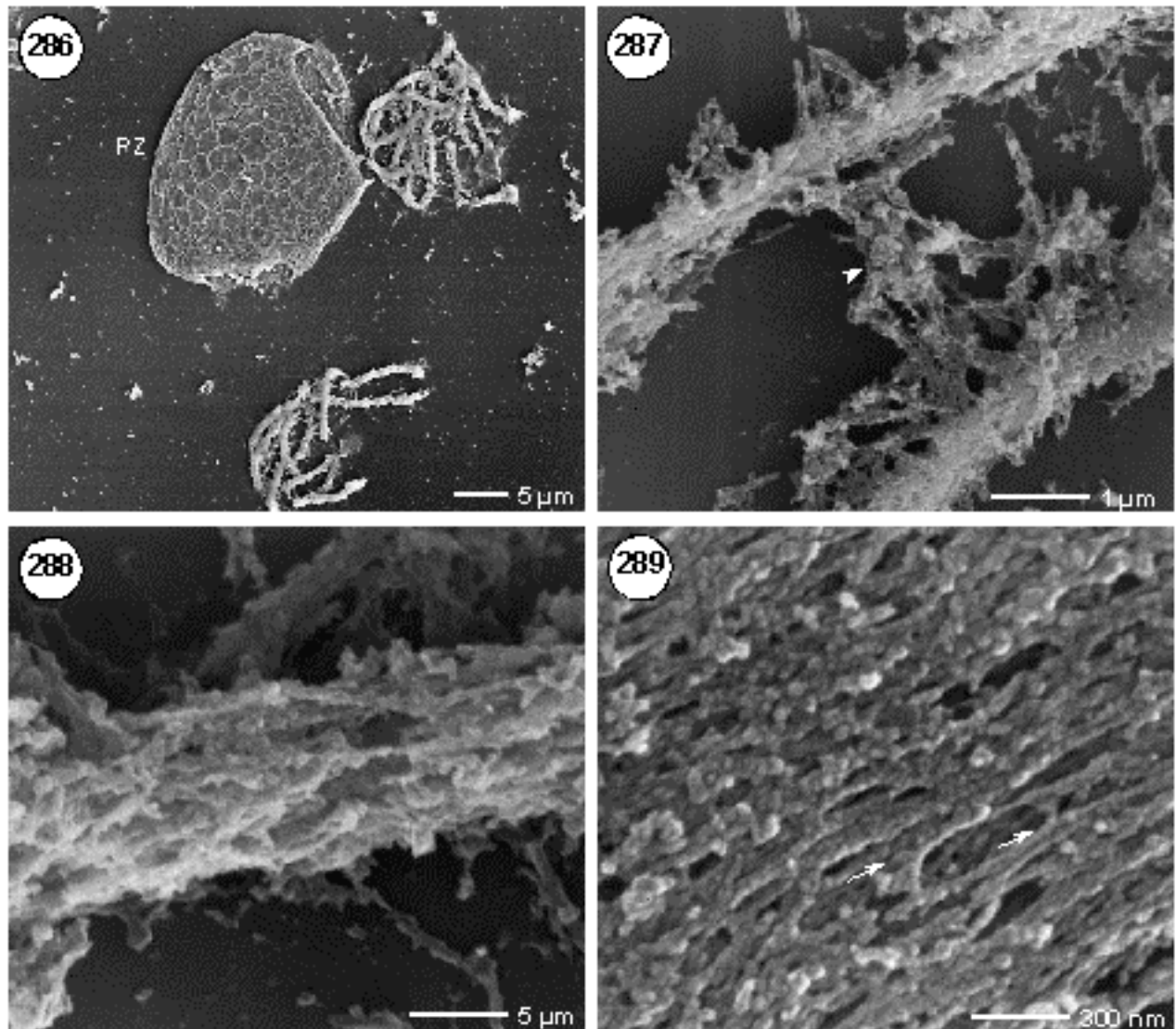
geknäuelte und nur über kurze Abschnitte parallel organisiert. Chromomere treten nur vereinzelt auf. Bei guter Spreitung ist zwischen den homologen und nicht-homologen Chromosomen ein Einblick in die netzartige Organisation der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen im Bereich des synaptonemalen Komplexes möglich (Abb. 278). Die Synapsis der Homologen wird häufig von größeren, heterochromatischen Domänen (= Chromomere) begleitet, die dominant hervortreten. Kleinere Chromomere treten symmetrisch auf den individuellen Schwesterchromatiden auf (Abb. 278). Im Paarungsbereich variiert der Durchmesser von 520 nm von individuellen Chromosomen bis zu 770 nm bei gepaarten Homologen. Die Telomerbereiche der Lilie sind im Gegensatz zum Roggen weniger kompakt, so daß bei guter Spreitung der Verlauf individueller Fibrillen sichtbar wird (Abb. 279 – 281). Die 30 nm-Fibrillen sind überwiegend geknäuelte und in Bereichen mit guter Spreitung längsorientiert (Abb. 281). Bei höherer Vergrößerung werden einzelne 10 nm-Fibrillen im Bereich paralleler, längsorientierter Fibrillen sichtbar, welche 30 nm-Fibrillen miteinander verbinden. Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille, Schlaufen und Knötchen, die mit den Fibrillen assoziiert sind, können in Hochauflösung dargestellt werden (Abb. 280 und 281).

### ***Diplotän***

Im frühen Diplotän sind die Chromosomen über weite Bereiche miteinander verbunden (Abb. 282 und 283). Bei hoher Vergrößerung können 30 nm-Fibrillen nachgewiesen werden, die mit kleinen runden Strukturen von 45 nm Durchmesser assoziiert sind (Abb. 283). Die Fibrillen sind stark verknäuelte. Zwischen den homologen Chromosomen können fibrilläre Verbindungen von 30 nm-Fibrillen nachgewiesen werden. Im späten Diplotän sind die Chromosomen miteinander verknäuelte und zeigen eine unregelmäßige Chromosomenoberfläche (Abb. 284). Bei hoher Vergrößerung wird die Verdichtung der Fibrillen und Ausprägung von einzelnen Chromomeren sichtbar. Fibrilläre Verbindungen zwischen nicht homologen Chromosomen, wie sie auch im Roggen auftreten, können in diesem Stadium gleichfalls in der Lilie nachgewiesen werden (Abb. 285).

### **Pollenstadium**

Im Pollenstadium bleibt die Pollenzellwand fast vollständig erhalten und platzt meist nur an wenigen Stellen auf (Abb. 286). Die Chromosomen sind hier im Gegensatz zum Roggen nicht vollständig dekondensiert. An der Chromosomenperipherie können zahlreiche Chromatinfäden beobachtet werden, wobei einige dieser Fibrillen mit anderen Chromosomen in Kontakt stehen (Abb. 287). Konstriktionsbereiche von Centromer und NOR fehlen. Bei hoher Vergrößerung wird die dichte Packung der Chromatinfibrillen sichtbar, die im Chromosom überwiegend längsorientiert und stark geknäuelte angeordnet sind. 10 nm-Fibrillen sind nur vereinzelt nachweisbar (Abb. 288 und 289).



**Abbildungen 286 – 289: Strukturanalyse des meiotischen Pollenstadiums der Lilie (*Lilium longiflorum*) nach Präparation in Isolierungspuffer (IDe) im REM.**

Im Pollenstadium bleibt die Pollenzellwand (Exine und Intine) weitgehend erhalten, so daß die Chromosomen nur an Bruchstellen der Pollenzellwand (PZ) freigesetzt werden können (Abb. 286). Die Chromosomen sind noch weitgehend kondensiert. Erst bei hoher Vergrößerung wird die aufgelockerte Fibrillenstruktur an der Chromosomenperipherie sichtbar (Abb. 287; Pfeilsitze). Die 30 nm Fibrille ist überwiegend geknäuel (Abb. 288), so daß nur vereinzelt längsorientiert Fibrillen sichtbar werden (Abb. 289; Pfeile)



### 3.8. Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen der Zuckerrübe im LM und REM

#### 3.8.1. Lichtmikroskopische Darstellung

Die Chromosomen der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*:  $2n = 18$ ) spreiten meist gut, so daß der Verlauf individueller Chromosomen in Pro- und Metaphase schon bei geringer Vergrößerung gut sichtbar ist. Nukleoli können nach der Tropfpräparation nicht mehr nachgewiesen werden.

#### Meiose I-Zyklus

Der Meiose I-Zyklus der Zuckerrübe ist nach der DAPI-Färbung bei lichtmikroskopischer Untersuchung mit dem des Roggens vergleichbar. In der Interphase ist eine lockere Strukturierung der Kerne sichtbar (Abb. 290). Im Leptotän können kurze Bereiche fädiger Strukturen in einer Interphase-ähnlichen Kernstruktur wahrgenommen werden (Abb. 291). Im frühen Zygotän werden homologe Chromosomen sichtbar, die eng benachbart liegen und nur an wenigen Stellen gepaart sind (Abb. 292). Im späten Zygotän sind die Homologen fast vollständig gepaart (Abb. 293). Im Pachytän ist die Paarung der homologen Chromosomen vollständig und eng, daß sie im LM als ein einheitliches Chromosom nachweisbar sind. Vereinzelt treten heterochromatische Segmente auf (Abb. 294). Die Telomere sind im Gegensatz zur Meiose des Roggens deutlich sichtbar. Im Diplotän liegen die Homologen eng benachbart. Nur vereinzelt können „crossing-over“-Strukturen beobachtet werden (Abb. 295). In der Meta- und Anaphase I sind die Chromosomen maximal kondensiert (Abb. 296 und 297). Im Gegensatz zum Roggen kann kein vergleichbares Interkinesestadium beobachtet werden.

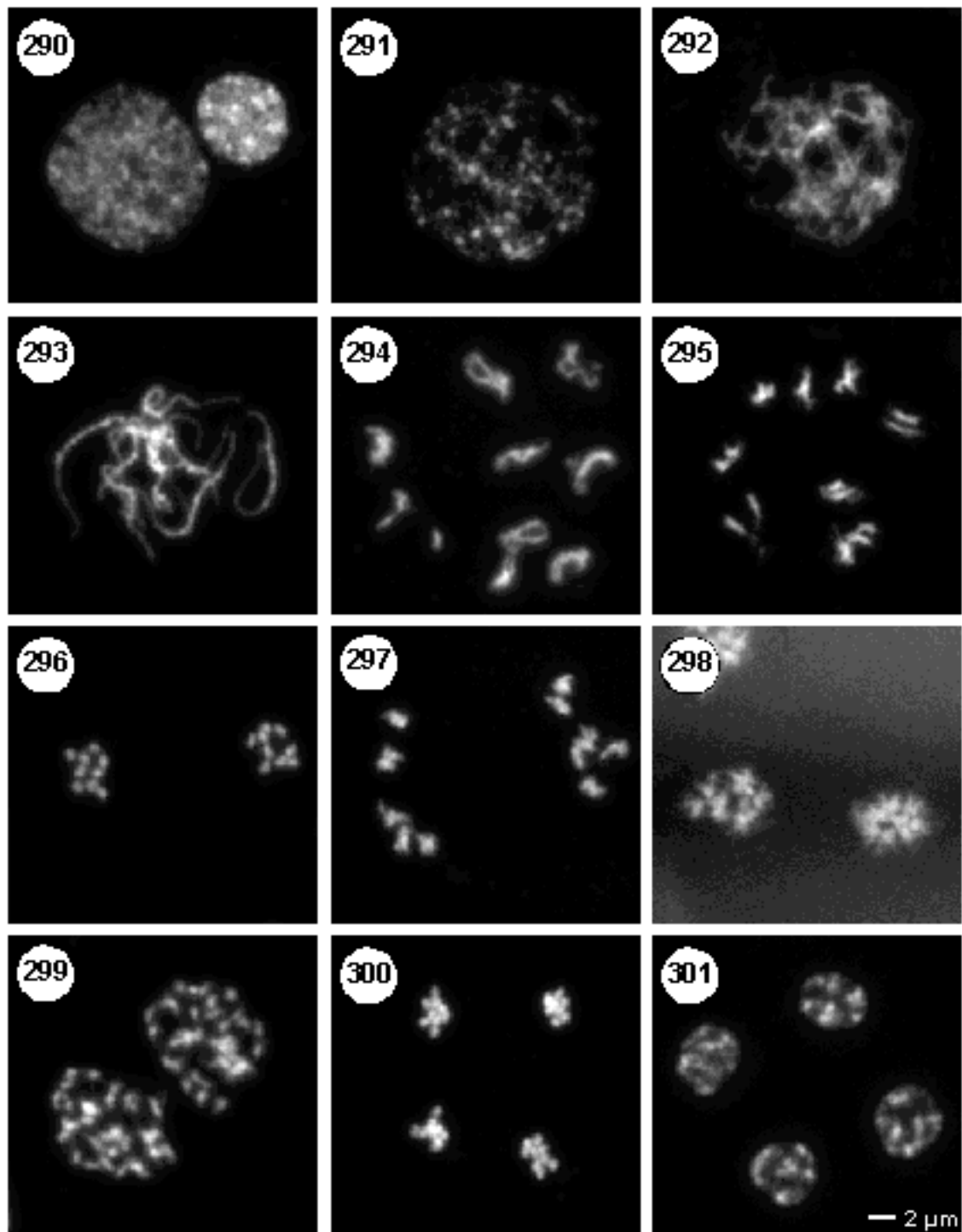
#### Meiose II-Zyklus

Die Meiose II ist zeitlich deutlich verkürzt und findet sofort im Anschluss an die Telophase statt (Abb. 298). Prophase II- und Metaphase II-Stadien, die denen des Roggen entsprechen, können

---

#### Abbildungen 290 – 301: Meiose-Zyklus der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) nach DAPI-Kontrastierung im Lichtmikroskop (LM).

Der meiotische Interphasekern ist im Vergleich zu mitotischen Kernen (rechter Kern) vergrößert (Abb. 290). Das Chromatin weist nur wenige heterochromatische Domänen auf. Im Leptotän können vereinzelt individuelle Chromosomenfäden unterschieden werden (Abb. 291). Heterochromatische Segmente werden sichtbar. Im Zygotän werden homologe Chromosomen sichtbar, die teils benachbart und teils gepaart sind (Abb. 292). Die homologen Chromosomen im Pachytän sind vollständig gepaart. Vereinzelt treten heterochromatische Segmente auf (Abb. 293: LM-Übersicht zur REM-Abb. 302 – 304). Diplotän: Die homologen Chromosomen liegen eng benachbart, können jedoch über weite Bereiche unterschieden werden (Abb. 294). Crossing-over-Strukturen in distalen und proximalen Bereichen werden sichtbar. In der Diakinese treten Chiasmata im terminalen Bereichen auf (Abb. 295). Metaphase I – Anaphase I: Die Chromosomen sind stark kondensiert. Konstriktionen sind nicht sichtbar (Abb. 296). Die Chromosomen segregieren in der späten Anaphase I einzeln (Abb. 297). In der Telophase I beginnen die Chromosomen erneut zu dekondensieren (Abb. 298). Prophase II: Die Trennung der Chromatiden ist teilweise erkennbar (Abb. 299). Eine *Rab1*-Orientierung ist nicht erkennbar. In der Telophase II sind die Chromosomen maximal kondensiert (Abb. 300). Im frühen Pollenstadium sind die Chromosomen dekondensiert, wobei erneut heterochromatische Bereiche sichtbar werden (Abb. 301).



nicht beobachtet werden. Stattdessen werden Chromatiden unmittelbar nach der Telophase I getrennt und unvollständig dekondensiert (Abb. 299), bevor sie erneut in der Metaphase II kondensiert (Abb. 300) und auf 4 Tetradenzellen aufgeteilt werden (Abb. 301).

### **3.8.2. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung**

Meiotische Chromosomen der Zuckerrübe weisen nach der Chromosomentropfpräparation verstärkt cytoplasmatische Schichten auf, so daß nur wenige Präparate für REM-Analysen geeignet sind. Bei allen Stadien können im verstärktem Ausmaß 10 nm- und 30 nm-Fibrillen unbekannter Herkunft beobachtet werden, welche die Chromosomen umgaben. Nach dem Dehydrieren der Präparate wurden häufig Verluste durch Ablösen der Chromosomen verzeichnet.

#### ***Pachytän***

Bei Analysen des Pachytäns zeigt sich eine für Mitose- und Meiose-Chromosomen charakteristische Chromatinorganisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen. Die Fibrillen sind überwiegend längsorientiert und werden von kürzeren Segmenten mit geknäuelten Fibrillen unterbrochen. Vergleiche identischer Chromosomenspreitungen im LM und REM (Abb. 293 und 302) zeigen, daß im REM eine Unterscheidung heterochromatischer Domänen nicht möglich ist. Die gepaarten homologen Chromosomen liegen im Pachytän in einem lockeren Knäuel, wobei gelegentlich eine gemeinsame Orientierung der Telomerbereiche sichtbar wird. An der Chromosomenperipherie können kurze fibrilläre Strukturen zwischen den Homologen als auch zwischen nicht-homologen Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 303 und 304).

---

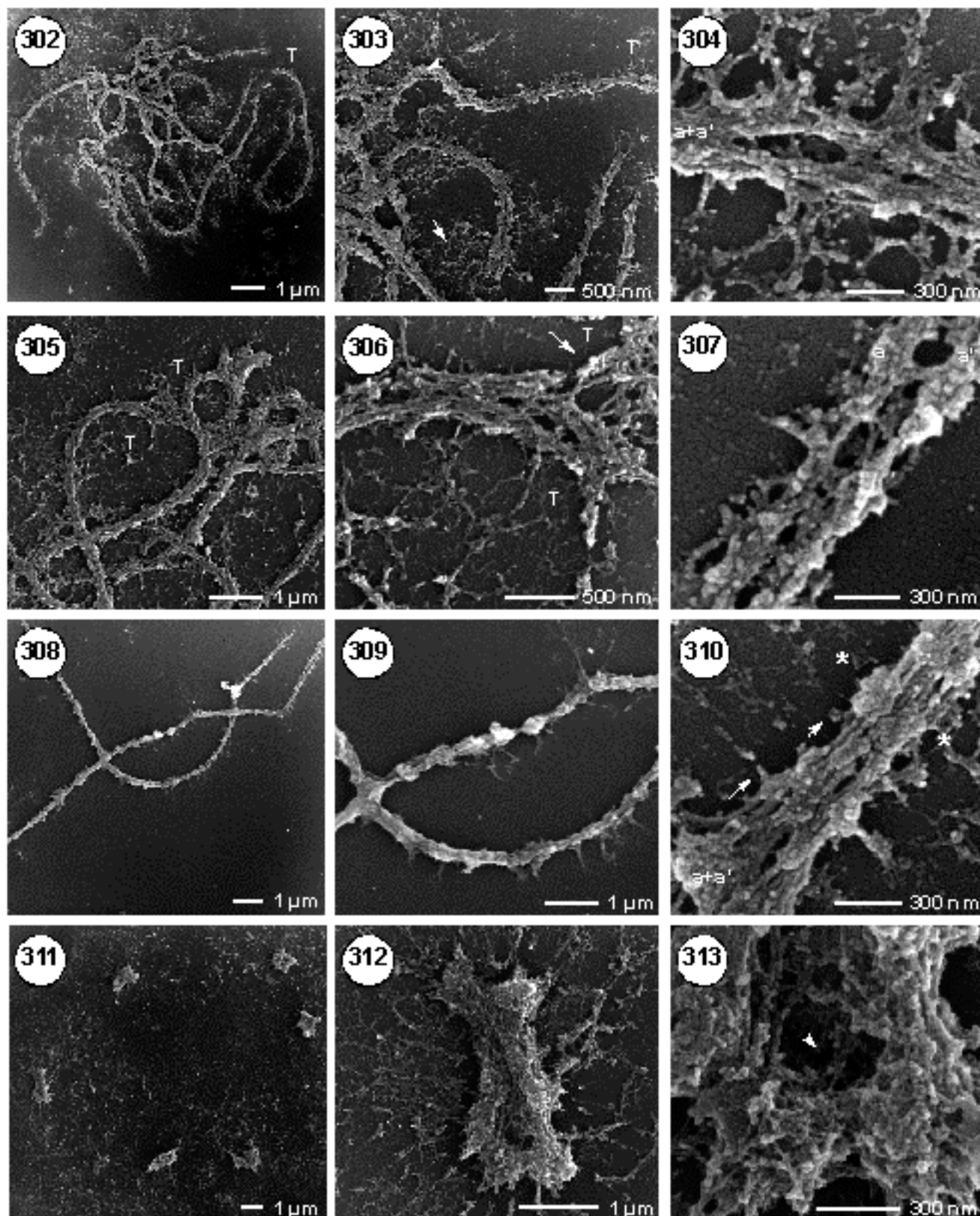
#### **Abbildungen 302 – 313: Ultrastrukturanalyse meiotischer Chromosomen der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) im Rasterelektronenmikroskop (REM).**

**Abbildungen 302 – 304:** Im Pachytän (identisch mit Abb. 293 [LM]) sind die Homologen bei geringer Vergrößerung eng gepaart (Abb. 302). Einige Telomerbereiche (T) liegen teilweise benachbart (Abb. 303; Pfeil). Die Chromosomen sind gleichmäßig kondensiert ohne daß heterochromatische Segmente nachweisbar sind. In Hochauflösung werden ungepaarte Bereiche sichtbar. Die Chromosomenstruktur wirkt aufgelockert. Zahlreiche Fibrillen können an der Chromosomenperipherie nachgewiesen werden (Abb. 304).

**Abbildungen 305 – 307:** Die Chromosomen sind schlaufenförmig verknäuel (Abb. 305; T = Telomer). Bei hoher Vergrößerung werden fibrilläre Verbindungen (Pfeil) zwischen zwei benachbarten Telomerbereichen (T) sichtbar (Abb. 306). Zwischen den gepaarten Homologen a und a' werden komplexe Verbindungen von Fibrillen sichtbar (Abb. 307).

**Abbildungen 308 – 310:** Im frühen Diplotän sind die Homologen noch vollständig gepaart. Heterochromatische Segmente werden sichtbar (Abb. 308). Periphere Fibrillen an der Oberfläche nehmen ab. Bei hoher Vergrößerung werden alternierend Chromomere (Sterne) und längsorientierte Fibrillen (Pfeile) sichtbar (Abb. 309 und 310).

**Abbildungen 311 – 313:** In der Metaphase I sind die Chromosomen maximal verkürzt und können kaum unterschieden werden (Abb. 311). Bei höherer Vergrößerung zeigt sich, daß die Homologen noch eng benachbart liegen (Abb. 312). Die Fibrillen sind überwiegend geknäuel. Konstriktionen sind nicht nachweisbar. In Hochauflösung werden fibrilläre Verbindungen zwischen den homologen Chromosomen im Bereich eines Chiasmata, sowie an interstitiellen Bereichen sichtbar (Abb. 313; Pfeilspitze).



Individuelle Telomerbereiche liegen teilweise eng benachbart und stehen mit Bereichen anderer Chromosomen über Fibrillen in Verbindung (Abb. 305 und 306). Die Assoziation der Homologen ist bei geringer Vergrößerung scheinbar vollständig (Abb. 305). Bei hoher Vergrößerung zeigt sich jedoch, daß die Konjugation mit korrelierenden Pachytän-Stadien des Roggens vergleichbar unvollständig ist (Abb. 306 und 307). In diesen kurzen Segmenten (50 – 100 nm) können die individuellen Chromosomen unterschieden werden. Die Paarung der Homologen erscheint deutlich lockerer als in vergleichbaren Stadien des Roggens und der Lilie. In Paarungsbereichen können transversal verlaufende 10 nm- und 30 nm-Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 307).

***Diplotän***

Im frühen Diplotän sind die homologen Chromosomen über weite Bereiche gepaart (Abb. 308 - 310). Der Telomerbereich ist im Gegensatz zum Roggen nicht verdickt. Einige Chromomere treten dominant hervor (Abb. 308 und 309). In Hochauflösung zeigt sich, daß ungepaarte Bereiche häufig längsorientierte Fibrillen aufweisen, während die individuellen Homologen über heterochromatische Segmente mit geknäuelten Fibrillen in engem Kontakt stehen (Abb. 310). Im Gegensatz zu den großen Chromosomen der Lilie und des Roggens werden deutlich weniger Chromomere auf der Oberfläche ausgeprägt. Der Durchmesser dieser Chromomer-ähnlichen Strukturen ist mit 100 – 200 nm im Vergleich zu mitotischen und meiotischen Chromomeren des Roggens deutlich reduziert (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Korrelation von Genomgröße, Anteile repetitiver Sequenzen zur Anzahl und Größe von Chromomeren im Pachytän des Roggen, der Lilie und der Zuckerrübe.**

<b>Genom</b>	<b>Lilie</b>	<b>Roggen</b>		<b>Zuckerrübe</b>
<b>Genomgröße (pg) (Chromosomenanzahl)</b>	74 pg/2C (2n = 12)	18,6 pg/2C (2n = 14)		2,6 pg/2C (2n = 18)
<b>Anteil repetitiver DNA</b>	90% repetitive	85% repetitive		60% repetitive
<b>Zellzyklus</b>	<b>Meiose Pachytän</b>	<b>Mitose Prophase</b>	<b>Meiose Pachytän</b>	<b>Meiose Pachytän</b>
<b>Chromomeranzahl/<math>\mu</math>m Chromosomenlänge</b>	10 – 13	6 – 9	3 – 5	2 – 4
<b>Chromomergröße (Durchmesser in nm)</b>	220 nm	55 nm	360 nm	135 nm

Im weiteren Verlauf der Kondensation bleiben die homologen Chromosomen in einer „Seite an Seite“-Position und können in der Metaphase I bei geringer Vergrößerung kaum unterschieden werden (Abb. 311 und 312). Konstriktionen im Centromer und in der NOR-Region treten nicht auf (Abb. 312). Bei hoher Vergrößerung zeigt sich eine kompakte Organisation der Fibrillen (Abb. 313). Das Chromatin ist stark geknäuel, wobei parallele Fibrillen nicht mehr nachweisbar sind. Abbildung 313 (Detail der Abb. 309) zeigt den terminalen Bereich eines Metaphase I-Chromosoms, das über ein Chiasma verbunden ist. Vergleichbar zum Roggen wird die

Verbindung an den Chiasmata durch eine komplexe Interaktion von Fibrillen vermittelt. In interstitiellen Bereichen wird zwischen den homologen Chromosomen ein komplexes Netzwerk von 30 nm-Fibrillen sichtbar.

### **3.9. Immunogold-*in situ*-Hybridisierung (EMISH) biotinylierter DNA-Sonden im REM**

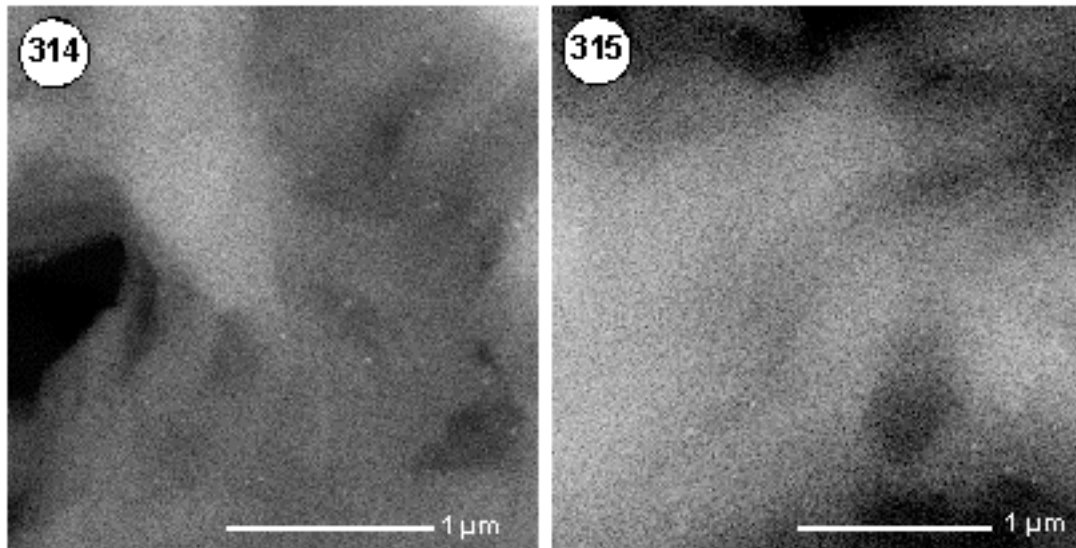
Der Nachweis (Hybridisierungserfolg und Signalintensität) molekularer DNA-Sonden bei EMISH-Analysen ist mit einer Effizienz von nur 10% im Vergleich zur Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen (FISH) deutlich reduziert. Die Oberfläche der Chromosomen ist nach der Hybridisierung häufig glatt und zeigt im Vergleich zu nicht-hybridisierten, unbehandelten Präparaten selten gute ultrastrukturelle Details der 30 nm-Fibrille. Verschiedene Parameter können einzeln, aber auch in Kombination, einen Einfluss auf die geringe Nachweiseffizienz bei der EMISH haben, wie:

- Markierungsdichte der DNA-Sonde,
- Präfixierung der Chromosomen und
- Detektionssystem der hapten-gekoppelten Nukleotiden.

Zur Analyse dieser o.g. Faktoren wurden Reihenuntersuchungen an mitotischen Chromosomen des Roggens mit Hilfe der repetitiven DNA-Sonden pSc119.2, pAWrc und cGISH.Ara durchgeführt.

#### **3.9.1. Markierungseffizienz markierter DNA-Sonden**

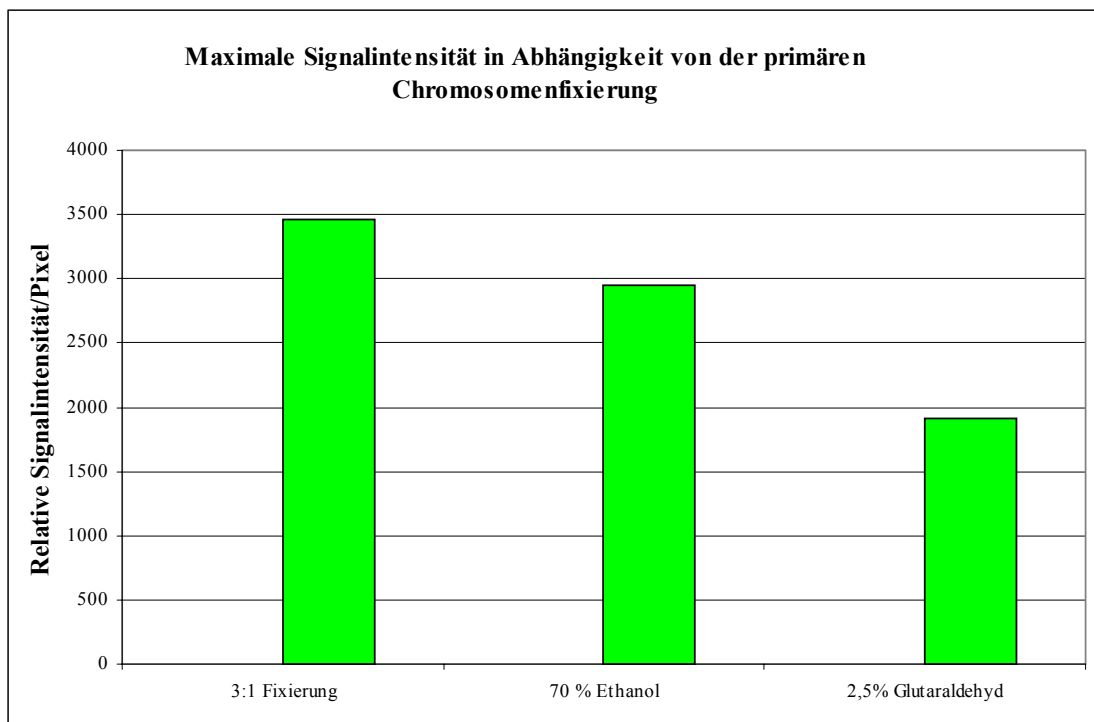
Die DNA-Sonde pSc119.2, die bei einer Länge von 661 Bp einen AT-Gehalt von 46,4 % aufweist, wurde über die Polymerasekettenreaktion im Verhältnis 1:2 mit dUTP-Biotin:dTTP markiert und in einer Verdünnungsreihe im Filtertest mit alkalischer Phosphatase und BCIP auf Markierungseffizienz getestet. Die Qualität der Markierung wurde anhand eines sichtbaren Farbniederschlags der 0,1 pg Verdünnung als „sehr gut“ bewertet (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich dazu wurde die einzelsträngige DNA-Sonde in einer entsprechenden Verdünnungsreihe durch UV-Bestrahlung (bzw. alternativ über Backen bei 80°C) an eine Nylonmembran gebunden und direkt mit einer Avidin-Gold (10 nm) -Verdünnung in Phosphat-Puffer (1 x PBS; pH 7,1) bzw. alternativ in Citratpuffer (2 x SSC; pH 7,1) nachgewiesen. Die Signale wurden als SE-Bild im REM detektiert, wobei unabhängig vom Puffersystem durchschnittlich 20 – 30 Signale/ $\mu\text{m}^2$  Filterareal nachgewiesen wurden (Abb. 314 und 315). Unter der Voraussetzung, daß die Verteilung und Bindung der aufgetragenen DNA auf dem Filter gleichmäßig erfolgte, bedeutet dies eine deutliche Diskrepanz von mehr als 115 zu den etwa 147 möglichen dUTP-Biotin-Bindungsstellen nach der Detektion mit den Avidin-Gold (10 nm)-Konjugaten. Dies zeigt, daß die tatsächliche Nachweiseffizienz von etwa 20% weit unter dem theoretisch zu erwartenden Signalniveau liegt.



**Abbildungen 314 – 315: Nachweis von Sequenzen der Sonde pSc119.2 mit Biotinmarkierung im Verhältnis 1:2 (dTUTP-Biotin : dTTP) und Detektion mit Avidin-Gold (10 nm) im REM**

Abbildung 314: SE-Signale der Antikörperdetektion in Phosphatpuffer (pH 7,1).

Abbildung 315: SE-Signale der Antikörperdetektion in Citratpuffer (pH 7,1).



**Diagramm2:** Signaleffizienz der Sonde pAWrc(Cy3) nach einer Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung auf Chromosomen des Roggen, die in „3:1“-Fixativ, 70“ Ethanol bzw. 2,5% Glutaraldehyd fixiert wurden.

### **3.9.2. Chromosomenfixierung und Hybridisierungseffizienz**

Vergleichende Hybridisierungen wurden mit der biotinylierten, Centromer-spezifischen DNA-Sonde pAWrc an unterschiedlich fixierten, mitotischen Chromosomentropfpräparaten des Roggens durchgeführt und nach der Hybridisierung mit Avidin-Cy3 nachgewiesen. Dabei zeigte sich in Abhängigkeit von der Fixierung der Chromosomen eine unterschiedliche Signaleffizienz der Sonde (Diagramm 2). In die Auswertung wurden Messwerte von 10 mitotischen Zellen aus 3 verschiedenen Hybridisierungen einbezogen. Alle Signale sowie deren Intensitäten wurden anhand von schwarz-weiß Aufnahmen der CCD-Camera über das Iplab-Extension Programm als Helligkeitsverteilung quantifiziert und gegen den Chromosomenhintergrund verrechnet. Dabei zeigt sich, daß das stärkste Signalniveau nach einer „3:1“-Fixierung in Ethanol/Eisessig nachweisbar ist. Eine deutliche Reduzierung der Signalintensität und -frequenz (in einigen Hybridisierungsarealen konnten keine Signale erzielt werden) wird nach der Fixierung in 70%igem Ethanol (16% Signalverlust), in 2% Formaldehyd (40%) (Daten nicht dargestellt) und am stärksten in 2,5% Glutaraldehyd (46%) beobachtet (Diagramm 2).

### **3.9.3. EMISH von cGISH.Ara im Antikörperkaskaden-System**

Die Biotin-markierte DNA-Sonde cGISH.Ara wurde nach Vorbehandlung der Chromosomen mit RNase und Proteinase, entsprechend dem Protokoll von MARTIN *et al.* (1995), auf mitotische Chromosomen des Roggens (*Secale cereale*) hybridisiert und über eine 6-fache Antikörper-kaskade im „sandwich“-Verfahren nachgewiesen. Nach der Detektion tritt im unterschiedlichen Ausmaß ein unspezifischer Signalhintergrund durch Fluorochrome auf. Bei fluoreszenzmikroskopischen Kontrollen werden im Vergleich zur FISH-Analyse deutlich schwächere Signale (siehe 3.9.2.) und ein reduziertes Bandenspektrum nachgewiesen. Die stärksten Signale können in Pro- und Metaphasestadien an den prominenten Hybridisierungsorten der distalen Chromosomenbereiche beobachtet werden, während alle interstitiellen Signale ein deutlich reduziertes Signalniveau aufwiesen.

Im REM können trotz 6-facher Signalverstärkung nur die stärksten Signale in distalen Bereichen von Pro- und Metaphase-Chromosomen nachgewiesen werden (Abb. 316 – 322). Ein unspezifischer Signalhintergrund durch die Goldkonjugate wird selten beobachtet. Hybridisierungen auf Prophasen des Roggens können im BSE-Bild starke Signale nachgewiesen werden, die im SE-Bild den Telomerbereichen zugeordnet werden. Die Signale korrelieren dabei mit geknäuelten, fibrillären Chromatinstrukturen und markieren die äusseren Bereiche der Telomere (Abb. 316 und 317). Banden schwacher Fluoreszenzsignale können dagegen nicht mit Avidin-Gold detektiert werden.

Die geringe Nachweiseffizienz wird auch bei einem direkten Vergleich der FISH-Signale zur Goldmarkierung im REM deutlich. Während in den Prophasen starke Fluoreszenz-Signalbanden nachweisbar sind (Abb. 318) kann nach der Detektion im REM ein deutlich reduziertes



Signalniveau beobachtet werden (Abb. 319 und 320). Von Vorteil erweist sich bei der EMISH das hohe Auflösungsvermögen im REM, wodurch eine Detektion im Nanometerbereich möglich ist. In der Prophase können so 4 Signalbanden mit einem räumlichen Abstand von 100 nm nachgewiesen werden (Abb. 320; Pfeile), die in der lichtmikroskopischen Kontrolle auf Grund der technischen Auflösungsgrenze von etwa 300 nm nur als eine einheitliche Signalbande darstellbar ist. Bei der cGISH-Analyse hybridisiert eine Signalbande im Telomerbereich, eine weitere im subtelomeren Bereich, während 2 weitere Signalbanden deutlich schwächer in relativ gleichmäßigen Abständen im distalen Bereich kartieren. Dabei zeigt sich, daß die Signalbanden beide Chromatiden symmetrisch markieren. Eine helikale Signalanordnung, wie sie bei helikalen Chromosomenmodellen zu erwarten ist, konnte nie beobachtet werden. Einige Markierungen liegen deutlich im Assoziationsbereich der Schwesterchromatiden. Insgesamt ist das Signalniveau einzelner Banden insbesondere im kondensierten Stadium der Metaphase deutlich reduziert. So können nach Hybridisierung mit cGISH.*Ara* nur vereinzelte Goldmoleküle in der NOR-Region, dem bevorzugten Bindungsort der Sonde, nachgewiesen werden. Die detektierten Signale liegen dabei überwiegend symmetrisch im proximalen Bereichen der NORs (Abb. 321 und 322).

---

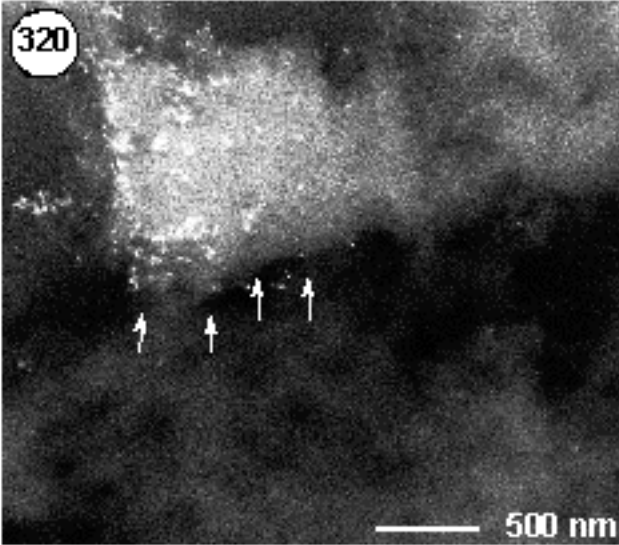
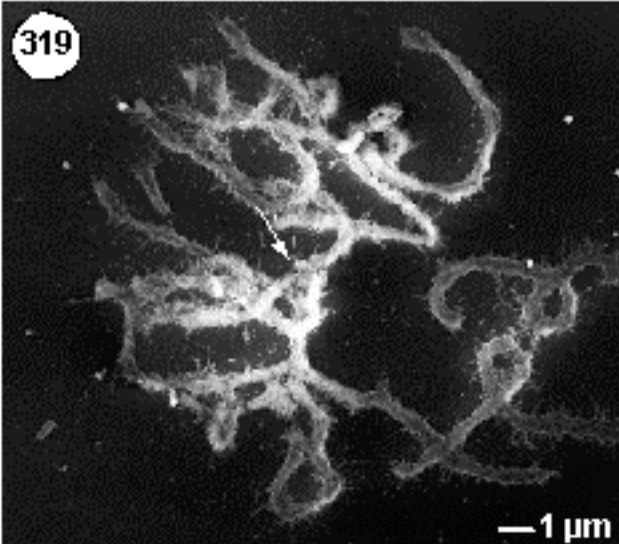
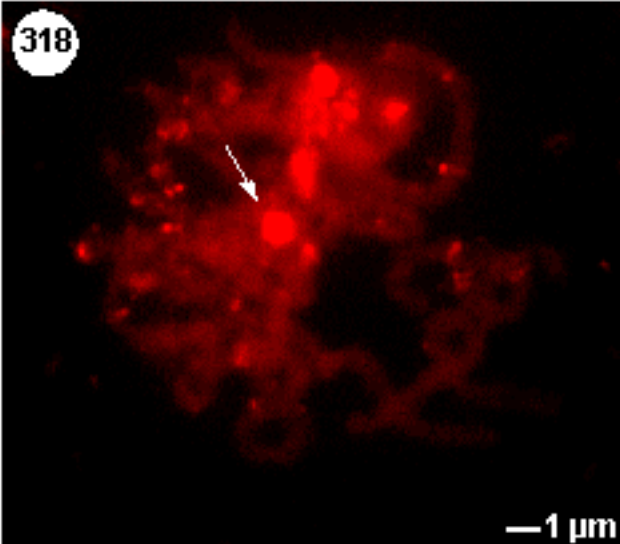
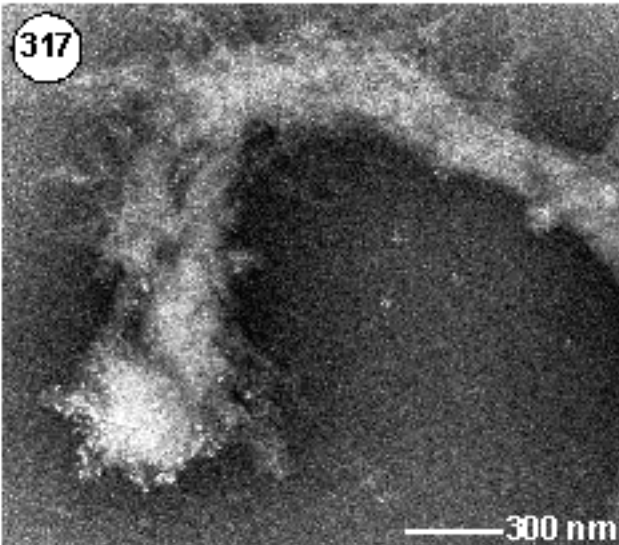
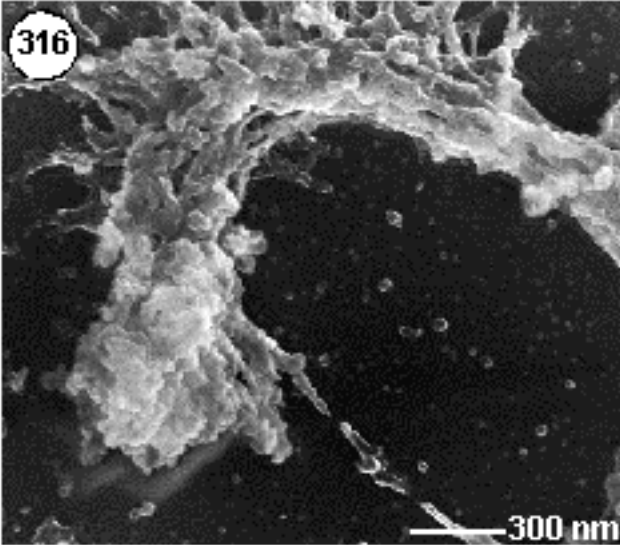
**Abbildungen 316 - 322: EMISH mit cGISH.*Ara* im Roggen (*Secale cereale*) nach Detektion mit Avidin-Gold (12 nm) im „sandwich“-Verfahren:**

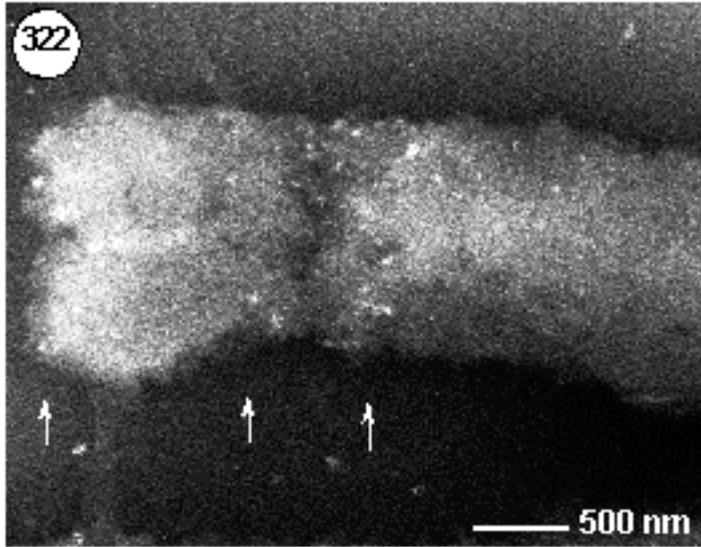
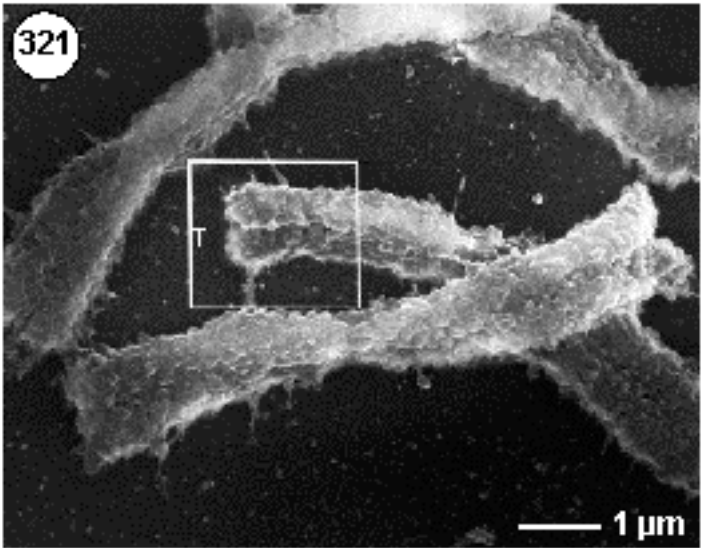
**Abbildung 316 - 317:** Telomerbereich eines mitotischen Prophasestadiums wird als SE- (Abb. 316) und BSE- Darstellung (Abb. 317) mit Signalen der Sonde cGISH.*Ara* wiedergegeben. Im SE-Bild werden geknäuelte Fibrillen im Telomerbereich sichtbar. Die Signale der Sonde cGISH.*Ara* markieren kappenförmig den äußersten Telomerbereich.

**Abbildung 318 - 319:** FISH-Signale der Sonde cGISH.*Ara* nach der Detektion mit Avidin-Cy3. Nach der Hybridisierung können nur die prominenten Signale der NOR-Regionen sowie vereinzelt interstitielle Signale nachgewiesen werden (Abb. 318). Abbildung 319 gibt die identische Chromosomenspreitung als SE-Signal im REM wieder.

**Abbildung 320:** In Hochauflösung werden Avidin-Gold(12nm)-Signale an einem prominenter Bindungsort als BSE-Signal sichtbar. Im Gegensatz zur FISH-Analyse können im BSE-Bild vier Signalbanden unterschiedlicher Intensität im distalen Bereich unterschieden werden (Pfeile).

**Abbildung 321 - 322:** Bei kondensierten Metaphase-Chromosomen (Abb. 321; SE-Bild) können nur wenige Signale in den proximalen Bereichen der NOR-Region sowie am Telomer nachgewiesen werden (Abb. 322; BSE-Bild = Detail aus Abb. 321; Rahmen)





### 3.9.4. EMISH mit pAWrc im Roggen im Avidin-(Gold)-„monolayer“-System

Der Nachweis der Biotin-markierten Sonde pAWrc, wurde nach einem modifizierten, verkürzten Protokoll auf „unbehandelte“ Chromosomenspreitungen in einem Avidin-(Gold)-„monolayer“-System nachgewiesen. Diese Methode zeichnet sich durch zahlreiche Vorteile im Vergleich zur etablierten Methode der „sandwich“ Technik aus, da

- die zeitaufwendige Vorbehandlung der Präparate entfällt, ohne daß ein unspezifischer Signalhintergrund auftritt;
- die Reduzierung von Inkubationszeiten in Pufferlösungen verringert eine mögliche negative Beeinflussung von Chromatinstrukturen durch „unphysiologische“ Bedingungen;
- schnellere Durchführung, da eine zeitaufwendige Antikörper-Kaskade entfällt;
- keine unspezifische Signalverstärkung durch eine Antikörperkaskade;
- der Nachweis der DNA-Sonde erfolgte über einen Monolayer, der einen direkten Signalnachweis auf individuellen Fibrillen *in situ* ermöglicht.

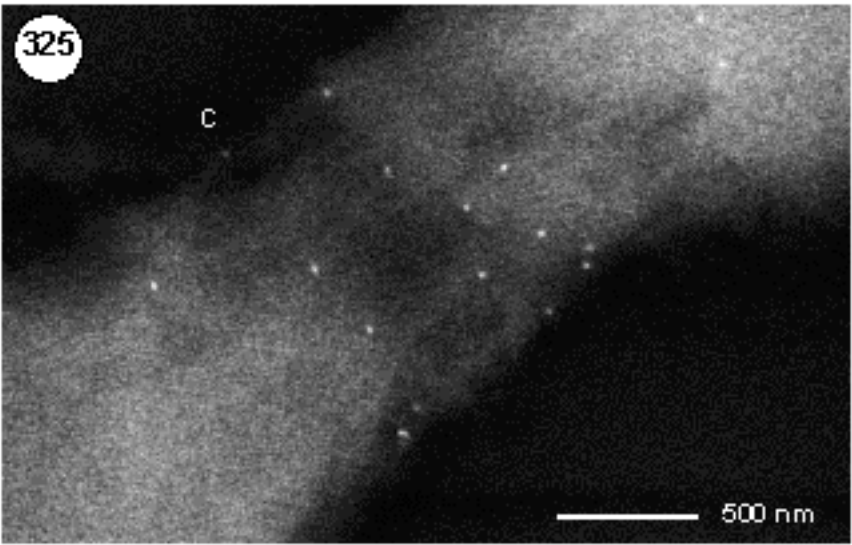
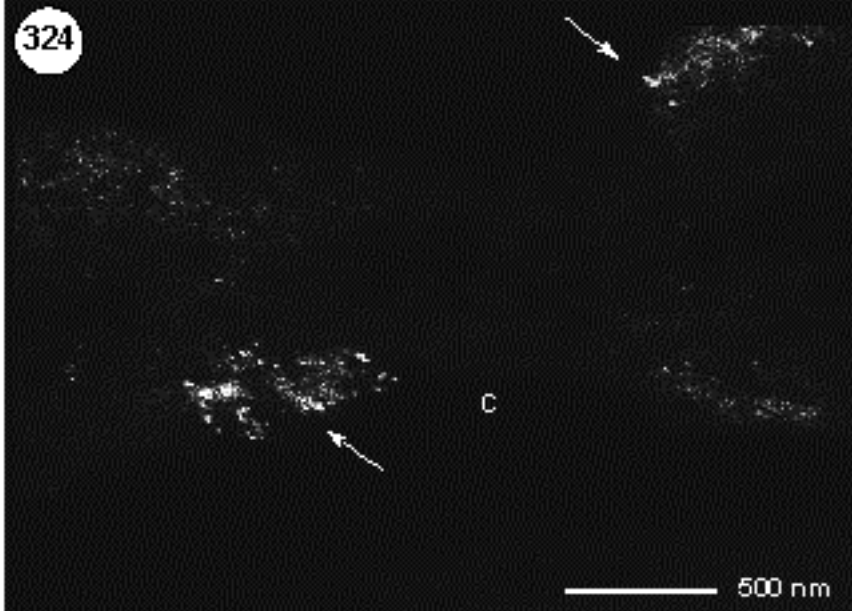
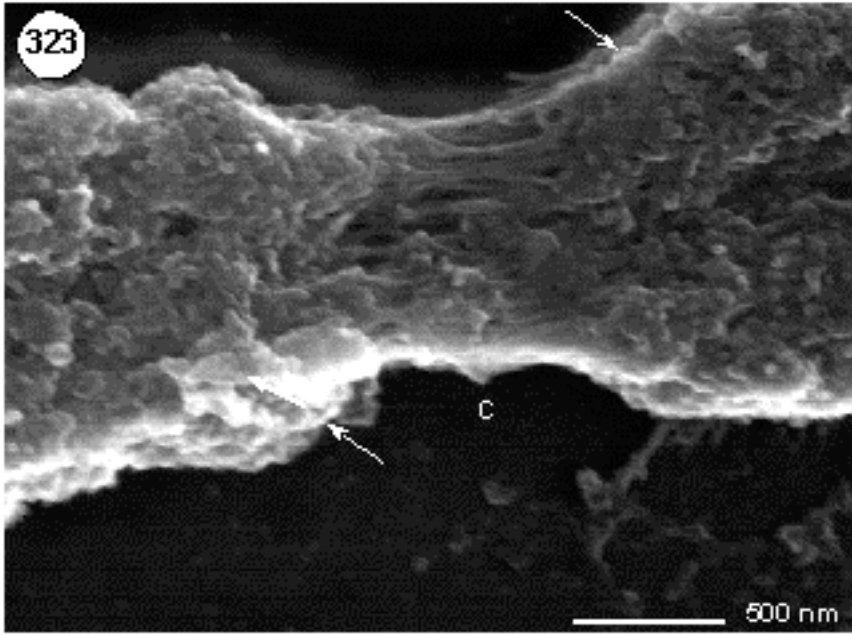
Die Centromer-spezifische DNA-Sonde pAWrc erzeugt auf Metaphasespreitungen des Roggens (*Secale cereale*) überwiegend proximale Signale bevorzugt auf geknäuelten 30 nm-Fibrillen (Abb. 324 – 326). Auf einem Chromosomenarm ist schwach eine Signalbande erkennbar, während auf dem anderen Arm Signale auf herausgezogenen Chromatinfibrillen nachweisbar sind. Längsorientierte, parallele Fibrillen im Konstriktionsbereich weisen dagegen keine Signale auf. Bei Hybridisierungen auf vorbehandelte, frühe mitotische Metaphasestadien können dagegen symmetrisch auf den proximalen Bereichen der Konstriktionen Signale nachgewiesen werden (Abb. 326). Die Signaleffizienz ist im Vergleich zur Detektion im 6-fachen Kaskadensystem der „sandwich“-Methode jedoch meist reduziert.

---

#### **Abbildungen 323 - 325: EMISH mit der Centromer-spezifischen Sequenz pAWrc im Roggen (*Secale cereale*) nach Detektion mit Avidin-Gold (10 nm) im „monolayer“-System:**

**Abbildung 323 - 324:** Im SE-Bild werden charakteristische, längsorientierte Fibrillen im Centromerbereich (C) eines Metaphase-Chromosoms sichtbar, während die proximalen Bereiche aus geknäuelten Fibrillen und Chromomere aufgebaut sind. Nach der EMISH können einseitig Signale der Sonde auf den geknäuelten Fibrillen der proximalen Bereiche nachgewiesen werden (Abb. 325; BSE-Bild).

**Abbildung 325:** EMISH mit Avidin-Gold (10 nm) Detektion: Nach Hybridisierungen auf Prometaphasestadien können gleichmäßige Signalbanden auf den proximalen Bereichen detektiert werden (C = Centromer).



## 4. Diskussion FISH

### Molekulare Karyotypisierung

Die Karyotypanalyse pflanzlicher Genome stellt bis heute ein noch "schwieriges Unterfangen" dar (FUCHS *et al.*, 1996), da Pflanzenchromosomen, insbesondere Getreidechromosomen, einen großen Anteil (70 – 80 %) repetitiver Sequenzen besitzen und morphologisch oft schwer zu unterscheiden sind. Die Isolierung neuer, informativer DNA-Sonden über die Methoden der Mikrodissektion oder über Subklonierung repetitiver Sequenzen erweist sich als zeit- und arbeitsintensiv. Dies führt dazu, daß bislang keine oder nur vereinzelt umfassende Karyotypanalysen pflanzlicher Genome durchgeführt wurden, da:

- nur für wenige Genome eine ausreichende Anzahl informativer Karyotypisierungssonden zur Verfügung stehen,
- Hybridisierungen mit konservierten Sequenzmotiven wie Telomer- und rDNA-Sequenzen nur eingeschränkt eine Identifizierung aller Chromosomen zulassen,
- viele repetitive DNA-Sonden eine disperse Verteilung zeigen, die keine Identifizierung individueller Bereiche ermöglicht,
- bei Hybridisierungen in polyploiden Genomen wie dem Weizen oder pflanzlichen Hybriden häufig ein unspezifischer Signalhintergrund auftritt und
- die Kombination von molekularen Methoden (FISH) mit klassischer C-Bänderung häufig problematisch und oft zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führt.

#### **BACs**

Eine schnelle Identifizierung informativer DNA-Sequenzmotive mit Hilfe von komplexen, künstlichen, bakteriellen Chromosomen (BACs), die für eine Karyotypisierung geeignet sind, ist bei der Durchführung von *in situ*-Hybridisierungsexperimenten schwierig. Wie homologe und heterologe FISH-Experimente mit dem BAC-Klon 115.5 und der repetitiven Sequenz MT 37-2 der Gerste zeigen konnten, sind viele der hybridisierenden Sequenzen repetitiver Natur und kommen ubiquitär und dispers verteilt in der Gerste und im Weizen vor (Abb. 3 und 4). Kompetitionen mit C<sub>0</sub>t1-DNA-Fraktionen oder mit gesamtgenomischer DNA führten zu einer vollständigen Signalunterdrückung, die keinen Nachweis informativer Signalbanden erlaubten. Diese Methode ist daher für eine schnelle Identifizierung informativer Karyotypisierungssonden nicht geeignet. Das weitläufige Vorkommen von repetitiven Sequenzen innerhalb nahe verwandter Genome konnte auch bei Analysen mit der D-Genom-spezifischen Sonden pAs1 innerhalb polyploider Genome, wie dem Weizen (*Triticum aestivum*; AABBDD-Genom) und der *Triticale* TL-15 (AABBRR-Genom) gezeigt werden (Abb. 8). In Übereinstimmung mit bisher

veröffentlichten Ergebnissen kartiert die DNS-Sonde pAs1 überwiegend in den Telomer-nahen Bereichen (RAYBURN und GILL, 1986; MCNEIL *et al.*, 1994). Neben der D-Genom-Spezifität zeigte die Sonde zusätzlich disperse Bindungsorte auf allen A und B-Chromosomen in Abhängigkeit von den Stringenzbedingungen. Wenn die Hybridisierungen unter hoher Stringenz durchgeführt wurden, konnten nur geringe Homologien zum A- und B-Genom beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Beschreibungen von MCNEIL *et al.* (1994) konnten jedoch schon bei mittleren Stringenzbedingungen (80%) zusätzlich disperse Signale auf allen A- und B-Genom-Chromosomen des Weizens (Abbildung nicht gezeigt) und auf allen Chromosomen der *Triticale*-Linie TL-15 nachgewiesen werden.

### ***Translokationsnachweis in Triticalen***

Die Kombination von *in situ*-Hybridisierungen mit genomischer DNA (GISH) und FISH-Analysen mit dispersen, repetitiven Sequenzen (LE *et al.*, 1989; MCINTYRE *et al.*, 1990; HOHMANN *et al.*, 2001 in Vorbereitung) sind bislang die Methoden der Wahl, um schnell und effizient chromosomale Umbauten (inter- und intrachromosomalen Translokationen, Inversionen, Duplikationen oder Deletionen) innerhalb pflanzlicher Hybriden nachzuweisen. Wie die Hybridisierungen in den *Triticale*-Linien (AABBRR) TL-10, TL-15 und TL-41 zeigen (Abb. 6 - 10), bedarf es zur Feinkartierung chromosomaler Bruchpunkte informative Karyotypisierungssonden, die in den entsprechenden Bereichen kartieren. Der Nachweis von Genomumbauten innerhalb polyploider Genome mit Hilfe zytogenetischer Methoden ist jedoch nicht immer eindeutig, da eine Interpretation durch zusätzlich auftretende, disperse Signale erschwert wird. Dies kann zum einen auf die nahe Verwandtschaft repetitiver Sequenzmotive zurückgeführt werden. Wie Hybridisierungen mit den D-Genom-spezifischen Sequenzen der Sonde pAS1 zeigten, können diese auch auf den A-, B- und D-Chromosomen des Weizens vorkommen und so unspezifische Signale verursachen. Disperse Signale könnten jedoch auch auf intrachromosomale Chromosomumbauten zurückgeführt werden, wie sie sich nach dem Einkreuzen unterschiedlicher Genome ereignen können. Mitotische und meiotische Rekombinationsereignisse zwischen repetitiven Sequenzen bleiben bei herkömmlichen RFLP- und Proteinanalysen unerkannt, sollten aber bei der Interpretation der Daten in Betracht gezogen werden. Eine veränderte Chromosomenmorphologie in einzelnen *Triticale*-Linien, wie sie häufig beobachtet wird, könnte als weiterer Hinweis für strukturelle Veränderungen innerhalb der Chromosomen gewertet werden (Daten nicht gezeigt). Morphologische Veränderungen an Roggen und Weizenchromosomen wurden schon früher für *Triticale* beschrieben (SCOLES und KALTSIKES, 1973). Diese können zu fehlenden oder störenden Interaktionen zwischen Weizen-

und Roggenchromosomen in der Meiose führen und die Ausbildung von Univalenten begünstigen. Eine zahlenmäßige Abweichung im Chromosomensatz wurden bei auch bei GISH-Analysen der Linie TL-10 beobachtet (Abb. 6), die einen Chromosomensatz von nur 12 Roggenchromosomen aufwies (HOHMANN *et al.*, 1999).

### ***Vergleichende Analysen mit cGISH.Ara***

Die vergleichende Hybridisierung mit *Arabidopsis*-DNA (cGISH.Ara) ist ein neuer methodischer Ansatz, der eine universelle, molekulare Bänderung von mono- und dikotylen Pflanzenchromosomen *in situ* ermöglicht. In heterologen FISH-Experimenten wurden Signale, die mit konservierten DNA-Bereichen korrespondieren, wie z.B. NOR-, Telomer- oder C-Banden-Regionen sowie zusätzliche interstitielle Signale unbekanntem Ursprungs nachgewiesen (Abb. 12 - 26). Das erzeugte Signalmuster ist artspezifisch und ermöglicht eine Identifizierung von beinahe jedem Chromosom oder Chromosomenarm. Die anscheinend universelle Anwendbarkeit der *Arabidopsis*-DNA als Sonde zur Karyotypanalyse von Pflanzenspezies mit unterschiedlichen Genom- und Chromosomengrößen ermöglicht cytogenetische Untersuchungen auch von bislang nicht charakterisierbaren Genomen. Als weiterer Vorteil dieser Technik erweist sich die schnelle und einfache Präparation der DNA-Sonden, die nach einer Hybridisierung starke, reproduzierbare Signale ohne Signalverstärkung und ohne starken, unspezifischen Hintergrund auch unter niederen Stringenzbedingungen ermöglicht. Im Vergleich zu genomischen-*in situ*-Hybridisierungen (GISH) ist eine Kompetition mit C<sub>0</sub>t1-DNA-Fractionen bei der cGISH.Ara nicht erforderlich. Mit Hilfe dieses neuen methodischen Ansatzes sind umfassende cytogenetische Analysen von mono- und dikotylen Chromosomen ohne langwierige Isolierung von DNA-Sonden möglich

*Arabidopsis thaliana* besitzt das genetisch am intensivsten untersuchte Genom einer höheren Pflanze und hat in der Pflanzengenetik Modellcharakter. Der niedrige DNA-Gehalt von nur 120 Mb (BENNETT und SMITH, 1991) sowie der geringe Anteil an repetitiver DNA von nur 25% (LEUTWILER *et al.*, 1984; PRUITT und MEYEROWITZ, 1986) machen dieses Genom zu einem geeigneten Donor, um konservierte, repetitive Sequenzen in anderen Genomen nachzuweisen. Die repetitiven Elemente, die auf 10% hoch und 10% moderat amplifizierte (SCHMIDT *et al.*, 1995) Sequenzen zurückzuführen sind (LEUTWILER *et al.*, 1984; PRUITT und MEYEROWITZ, 1985), bieten eine gute Möglichkeit zur Analyse von Genom-relevanten, repetitiven Sequenzmotiven. Die größte der Komponente von etwa 8% stellt die tandemartig angeordnete Sequenzwiederholung der 18 S, 5,8 S, 26 S und 5 S rDNA Gene dar (MEYEROWITZ und PRUITT,



1985), die Paracentromer-Sequenzen pAL1/ATMR1, die etwa 1 – 1,5 % des gesamten Genoms ausmachen (MARTINEZ-ZAPATER *et al.*, 1986; MURATA *et al.*, 1994) sowie dispers verteilte Sequenzwiederholungen wie transposable Elemente vom Typus LTRs („long terminal repeats“), nicht-LTRs und MITEs („miniature inverted-repeat transposable elements“) (HIROCHIKA und HIROCHIKA, 1993; WESSLER *et al.*, 1995).

### ***Hybridisierungskinetik***

Kompetitions-*in situ*-Hybridisierungen (CISS), die mit C<sub>0</sub>t1-DNA zur Blockierung durchgeführt wurden, zeigen, daß die meisten der erzeugten Signale einen repetitiven Charakter besitzen, da diese mit der Cot1-Fraktion unterdrückt werden konnten. Eine in Vertebraten durchgeführte Bänderung mit C<sub>0</sub>t1-DNA-Sequenzen konnte auf menschlichen Chromosomen ebenfalls ein Bandenmuster erzeugen, das für eine Karyotypanalyse geeignet war (WANG *et al.*, 1995). In CISS-Hybridisierungen mit unmarkierten rDNA-Sequenzen konnten die Hauptsignale unterdrückt werden, womit gezeigt wurde, daß diese den rDNA-Genorten der Nukleolusorganisierenden Region (NOR) entsprechen. Unterschiedlich starke Signalintensitäten, die bei einer Verkürzung der mehrtägigen Hybridisierungsdauer oder bei Waschschrinen unter hohen Stringenzbedingungen auftraten, weisen zudem auf eine unterschiedliche Hybridisierungskinetik der Sequenzmotive hin. Dies kann sowohl auf einen unterschiedlichen Homologiegrad individueller Sequenzen zum hybridisierten Chromosom hinweisen, als auch auf unterschiedliche Anteile individueller Sequenzmotive in der cGISH.Ara-Sonde zurückzuführen sein. Aber auch schlecht zugängliche, chromosomale Epitope können als weitere Ursache für eine geringere Hybridisierungseffizienz bei kürzeren Hybridisierungszeiten in Betracht kommen.

### ***Karyotypanalyse mit cGISH.Ara***

Das cGISH.Ara-Verfahren ermöglicht eine molekulare Karyotypanalyse, auch wenn keine informativen DNA-Sonden für das untersuchte Genom zur Verfügung stehen oder C-Bänderungsverfahren zu keiner ausreichenden Differenzierung individueller Chromosomen führen. Die Anzahl der beobachteten Signale und Signalbanden pro Chromosomenarm zeigte keine direkte Korrelation zur Genomgröße. Dennoch konnte ein Auftreten von Signalbanden, die über beide Chromatiden verlaufen nur in größeren Genomen beobachtet werden (Abb. 12, 15, 23 und 26), während in den kleinen Genomen (mit Ausnahme der NOR-Signalbanden) nur singuläre Signale auftraten (Abb. 14, 17, 19, 20). Eine erhöhte Anzahl von Banden wurde insbesondere in den Kulturpflanzen, wie z.B. Getreidepflanzen, beobachtet. Im Weizen konnte in den

pericentrischen Regionen ein Bandenmuster, ähnlich den C- und N-Banden, nachgewiesen werden (ENDO und GILL, 1984; GILL *et al.*, 1991).

Analysen des Roggens und der Gerste zeigten, daß eine Unterscheidung aller 14 Chromosomen und ihrer Chromosomenarme möglich ist, wobei im Roggen 56 Signale und in der Gerste 61 Signale erzeugt wurden (Abb. 27). Die Signale, die ohne Signalverstärkung nachgewiesen wurden, zeigten selbst unter niederen Stringenzbedingungen eine hohe Spezifität und interferierten bei Kohybridisierungen nicht mit anderen DNA-Sonden. In Kombination mit der Roggen-spezifischen DNA-Sonden pSc119.2 und MWG 2314 der Gerste konnten 100 Banden im Roggen und 74 verschiedene Signale in der Gerste erzeugt werden. Eine Anwendung von cGISH.*Ara* in Kombination mit SSR („simple sequence repeats“), Satelliten-DNA und anderen repetitiven DNA Sonden könnte zu einer höheren Auflösung von physikalischen Chromosomenkarten führen, wie dies für Feinkartierung von „low“- und „single-copy“-Sequenzen unabdingbar ist. Chromosomale Aberrationen, wie Additionen, Deletionen, Translokationen und Inversionen können so mit höherer Präzision erkannt und kartiert werden.

### ***Nachweis von rDNA-Genorten***

Nach Hybridisierungen mit cGISH.*Ara* konnten die Haupt-rDNA-Genorte im Weizen (*Triticum aestivum*) auf den Chromosomen 1B und 6B sowie auch zwei kleinere Genorte auf den Chromosomen 5D und 7D leicht identifiziert werden (MUKAI *et al.*, 1991) (Abb. 12). Die 5S rDNA-Genfamilie kartiert in den distalen Chromosomenregionen der Homöologengruppe der Chromosomen 1 und 5 (MUKAI *et al.*, 1990). Im Roggen konnten die 18S–5,8S–26S rDNA-Genorte auf dem Chromosom 1R und die Genorte der 5S rDNA innerhalb der NOR auf dem kurzen Armen der Chromosomen 1RS (APPELS *et al.*, 1980), 3RS (ALONSO *et al.*, 1994; CUADRADO *et al.*, 1995a, 1995b) und 5RS (REDDY und APPELS, 1989) kartiert werden (Abb. 23). In der Gerste wurden ebenfalls die zwei Hauptorte der rDNA-Gene (18S–5,8S–26S) auf den Chromosomen 5 und 6 sowie bis zu vier weitere kleinere rDNA-Orte auf den Chromosomen 1, 2, 4 und 5 beschrieben (LEITCH and HESLOP-HARRISON, 1992; PEDERSEN und LINDE-LAURSEN, 1994). Die kleineren rDNA-Orte auf den Chromosomen 1 und 5 entsprechen den rRNA Genen der homöologen Chromosomen des Weizens und des Roggens, während hingegen die Signalorte der Homöologengruppe 2 und 4 in anderen *Triticeaen* nicht beschrieben wurden (Abb. 26). In dieser Arbeit konnten die rDNA-Hauptsignale und die kleineren rDNA-Genorte auf Chromosom 1 nachgewiesen werden. Die Fraktionslängen der kleineren rDNA-Orte der Chromosomen 2, 4 und 5 waren jedoch leicht verschieden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß diese

Unterschiede auf die Analyse unterschiedlicher Gerstensorten (Varietäten) zurückzuführen sind, oder weil mit der cGISH-Technik möglicherweise nicht alle rDNA-Genorte identifiziert werden können. Gerade inaktive, kleinere rDNA-Loci, die Pseudogene oder Sequenzen, die Homologien zu rDNA-Sequenzwiederholungen aufweisen, jedoch keine rDNA-Gene enthalten, sind schon früher in verschiedenen Tier- und Pflanzenspezies beschrieben worden (HUIJSER und HENNING, 1987, HAGEMANN *et al.*, 1993). Diese Orte könnten viele Gemeinsamkeiten haben und insbesondere in Wildtypen weiter verbreitet sein, als bisher angenommen (LINDE-LAURSEN *et al.*, 1992; BROWN *et al.*, 1993; PENDAS *et al.*, 1993). Die kleineren rDNA-Genorte könnten Relikte von NOR-Regionen eines ursprünglichen Karyotyps darstellen, die im Verlauf der Evolution eliminiert wurden. In dieser Arbeit konnten jedoch alle aktiven NOR-Regionen an den richtigen chromosomalen Positionen nachgewiesen werden. Die Positionen der vier 5S rDNA-Loci auf den Chromosomenarmen 2HS, 2HL, 4HL und 7Hs und die sechs 5S rDNA-„spacer“-Genorte auf den Chromosomenarmen 3HL, 4HL, 5HS, 5HL, 6HS, 6HL, die von FUKUI *et al.*, (1994) beschrieben wurden, konnten alle mit der cGISH-*Ara*-Technik mit Ausnahme eines terminalen Signals auf Chromosom 6HS markiert werden. Der Nachweis von 5S rDNA-Genorten, welche bedeutend kleiner sind als die der 18S–5,8S–26S rDNA-Sequenzwiederholungen, kennzeichnen das Potential dieser cGISH-Technik und deren breite Anwendungsmöglichkeit. Die genaue Zahl von NOR-Regionen in *Muscari armenaticum* ist bisher noch unbekannt, konnte aber den 3 Satellitenchromosomen zugeordnet werden (Abb. 14). In der Zwiebel (*Allium cepa*) ist ein Hauptbindungsort und bis zu 4 kleinere rDNA-Sequenzblöcke beschrieben worden (SATO, 1981, PANZERA *et al.*, 1996). In den durchgeführten Analysen wurde dagegen nur eine NOR-Region eines Chromosomenpaares markiert (Abb. 13). Berichte mit kontroversen Angaben über die Lokalisation der NORs, bzw. über nicht festgelegte Positionen (SCHUBERT und WOBUS, 1985), könnten für diese Diskrepanz verantwortlich sein.

In der Saubohne (*Vicia faba*) wurden die Genorte der 26 S rDNA sowie zwei 5S rDNA-Genorte auf den Satellitenchromosomen lokalisiert (Abb. 15) (SCHEUERMANN und KNÄLMANN, 1975; KNÄLMANN und BURGER, 1977; FUCHS *et al.*, 1998). Diese Beobachtung korreliert mit Ergebnissen von Immunomarkierungen, die 3 Nukleoli nachweisen konnten (HASENKAMPF, 1991; TANAKA *et al.*, 1999). *Agropyron elongatum* besitzt zwei Satellitenchromosomen (EVANS, 1962; HSIAO *et al.*, 1986), die in den durchgeführten Experimenten ebenfalls die stärksten Signalen zeigten (Abb. 16). In der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) sind zwei 18S–5,8S–26S rDNA und ein 5S rDNA-Genort beschrieben worden (SCHMIDT *et al.*, 1994; SCHONDELMAIER *et al.*, 1997). Diese konnten auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abb. 17). *Arabidopsis*

*thaliana* besitzt zwei Satelliten-Chromosomen, 2 und 4 (STEINITZ-SEARS und LEE-CHEN, 1970) und zwei weitere Centromer-nahe 5S rDNA-Genorte die kürzlich physikalisch in meiotischen Pachytänstadien kartiert wurden (MURATA *et al.*, 1997; FRANSZ *et al.*, 1998). Die zwei starken und zwei weniger intensiv markierten Chromosomen könnten den vier Chromosomen entsprechen, welche die rDNA-Gene tragen (Abb. 18).

### **Identifizierung von Telomersequenzen mit cGISH.Ara**

Die Telomer-spezifische Sequenzwiederholung (5'-TTTAGGG-3') von *Arabidopsis thaliana* ist in verschiedenen Pflanzenfamilien hoch konserviert (SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON, 1991; FUCHS *et al.*, 1995). Die Länge dieses repetitiven Sequenzmotives kann aber zwischen verschiedenen Spezies sowie auch innerhalb individueller Chromosomen variieren. Hybridisierungen mit Telomersequenzen aus *Arabidopsis* konnten nach Signalverstärkung alle Chromosomen von *Triticum aestivum* (MURATA *et al.*, 1992; WERNER *et al.*, 1992), *Vicia faba* (SCHUBERT *et al.*, 1992), *Beta vulgaris* (SCHMIDT *et al.*, 1997) und von *Secale cereale* (SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON, 1991; FUCHS *et al.*, 1995) markieren. Die cGISH.Ara-DNA-Sonde markierte ohne Signalverstärkung die Telomere auf einigen Weizenchromosomen (*Triticum aestivum*), auf fast allen Chromosomen von *Vicia faba* sowie von *Beta vulgaris*, *Agropyron elongatum* und *Secale cereale* mit Ausnahme des Chromosomenarms 5RL (Abb. 15, 16, 17 und 23). Dennoch kann letztendlich eine Beteiligung anderer repetitiver Sequenzen an den distalen Signalen nicht ganz ausgeschlossen werden. Die distalen Bereiche der Gerstenchromosomen sind mit Gerstengenom-spezifischen, subtelomeren Sequenzen (RÖDER *et al.*, 1993) und anderen tandemartigen DNA-Sequenzen, wie z.B. pHvMWG2314, angereichert, die zu der Tas330-(„*Triticeae* amplified sequence”)-Sequenzfamilie gehören und in *Triticeae* amplifiziert sind (BUSCH *et al.*, 1996). Die Telomer-spezifische Sequenzwiederholung 5'-TTTAGGG-3' kann jedoch nur nach einer oder mehreren Signalverstärkungen nachgewiesen werden (SCHWARZACHER und HESLOP-HARRISON, 1991; WANG *et al.*, 1991; COX *et al.*, 1993). Nach der Hybridisierung mit cGISH.Ara wurden jedoch keine auffälligen Telomersignale beobachtet (Abb. 26). Es kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, daß die Telomersignale von dem konservierten Sequenzmotiv 5'-TTTAGGG-3' stammen, aber in der Gerste ohne Signalverstärkung nicht nachweisbar sind. In der Zwiebel war die Telomersequenz vom *Arabidopsis*-Typ nicht nachweisbar (FUCHS *et al.*, 1995). Die Telomersequenz ist hier offensichtlich durch hoch-repetitive Satelliten-DNA (Ty1-*copia* Retroelemente und En/Spm-ähnliche, transposable Elemente) und/oder rDNA ersetzt um die Chromosomenenden zu stabilisieren (PICH *et al.*, 1996; PICH und SCHUBERT, 1998). Bei der Traubenhyazinthe (*Muscari*

*armenaticum*), die wie die Zwiebel zu der Familie der Scilloideae gehört, traten ebenfalls keine terminalen Hybridisierungssignale an Metaphasechromosomen auf (Abb. 14). Diese Beobachtung könnte durch die nahe Verwandtschaft von *Muscari* zur Familie der Alliaceae begründet sein, die möglicherweise alle eine alternative Organisation der Telomerregion aufweisen.

### ***Korrelation von cGISH.Ara- zu C-Banden***

Klassische cytogenetische Bänderungsverfahren wie die C- und die N-Bandentechniken sind die Methoden der Wahl um pflanzliche Chromosomen zu unterscheiden. Die erzeugten C-Banden spiegeln Blöcke von konstitutivem Heterochromatin wieder. Bei Pflanzen können quantitativ große Schwankungen bei den C-Banden auftreten, die sich aus unterschiedlichen Typen von Heterochromatin zusammensetzen. Die genaue Natur der DNA-Sequenzblöcke, die C- und N-Banden vermitteln und zwischen unterschiedlichen Pflanzenspezies konserviert sind, ist bis heute ungeklärt. Mindestens fünf verschiedene repetitive Sequenzfamilien sind in den konstitutiven Heterochromatinbereichen der Telomere, aber auch interstitiell im Roggen beschrieben und charakterisiert worden (BEDBROOK *et al.*, 1980; APPELS *et al.*, 1981). In Markierungsexperimenten mit der DNA-Sonde pSc74 (350 – 480 bp lang), pSc119.2 (120 bp) und pSc34 (610 bp) Sequenzfamilie konnten jedoch ebenfalls nicht alle C-Banden detektiert werden (HUTCHINSON und SEAL, 1983; MUKAI *et al.*, 1992). Dagegen sind mit cGISH.Ara die meisten terminalen C-Banden im Roggen nachweisbar (Abb. 27). Interstitielle Banden lagen an ähnlichen, jedoch nicht immer identischen Positionen der C-Banden. Dieses Ergebnis zeigt, daß mit der gesamtgenomischen *Arabidopsis*-DNA ein Nachweis von einigen repetitiven Sequenzmotiven, die in den C-Banden des Roggens vorkommen, möglich ist. Im Gegensatz dazu konnten die meisten konstitutiven Heterochromatinbereiche in *Vicia faba* nicht markiert werden, was auf eine zusätzliche Beteiligung anderer Sequenzmotive an den C-Banden schließen lässt.

### ***Korrelation von cGISH.Ara- zu N-Banden***

Über die N-Bandentechnik können Regionen, welche die Satelliten-DNA mit dem Sequenzmotiv  $(GAA)_m(GAG)_n$  enthalten, identifiziert werden (DENNIS *et al.*, 1980; GERLACH und PEACOCK, 1980; PEDERSEN *et al.*, 1996). Die erzeugten Banden sind zwischen verschiedenen Angehörigen des gleichen Genoms hoch konserviert. Bei einer sequentiellen C- und N-Bandenanalyse konnten zwei Heterochromatinklassen identifiziert werden: (a) Heterochromatinbereiche, die durch C- und N-Banden nachweisbar sind sowie (b) C-Banden-positive und N-Banden-negative Regionen (SCHLEGEL und GILL, 1984). Im Roggen konnten mit Hilfe der cGISH-Methode alle

drei N-Banden auf den Chromosomen 2R, 3R und 6R markiert werden. In der Gerste wurden dagegen 32 der insgesamt 38 N-Banden Signale (84%) beobachtet, die von FUKUI und KAKEDA (1990) und FUKUI *et al.* (1994) beschrieben wurden. Dies zeigt, daß die cGISH-Technik eine Identifizierung der meisten N-Banden ermöglicht, welche die  $(GAA)_m(GAG)_n$  Satelliten-DNA enthalten. Darüber hinaus erzeugen die Sequenzen aus *A. thaliana* zusätzliche Signale an weiteren, bisher nicht charakterisierten, chromosomalen Positionen und ermöglichen so neue Kartierungspunkte, die möglicherweise mit Regionen von Satelliten-DNAs oder anderen repetitiven Elementen übereinstimmen.

Für das Studium der Chromosomenkondensation sind im Roggen insbesondere die Telomerbereiche interessant. Diese sind im Gegensatz zu denen der Gerstechromosomen, wie in dieser REM-Analysen gezeigt werden konnte, verstärkt kondensiert. Dieses Telomer-nahe Heterochromatin, das häufig als konstitutives Heterochromatin beschrieben wird, enthält die meisten der Satelliten-DNAs einer Art und hat für die Karyotypisierung zahlreicher Pflanzengenome eine wichtige Bedeutung. Hinzu kommt, daß die Sequenzklasse des konstitutiven Heterochromatins maßgeblich am Strukturaufbau des Kerns beteiligt ist, wobei die Übergänge von Eu- und Heterochromatin als Orte des meiotischen „crossing-over“ angesehen werden (JONES, 1978). Diese können als „Fertilitätsbarrieren“ eine wichtige Bedeutung für die Diversität im Laufe der Evolution und für die rezente Artenbildung haben (YUNIS und YASMINEH, 1971), so daß eine Analyse und Verteilung dieser Sequenzmotive sehr aufschlussreich sein kann. Gerade konservierte, heterochromatische Regionen in Pflanzenchromosomen, die universell detektierbar sind, können eine wichtige Bedeutung für die Unterscheidung von Chromosomen sowie für die Erkennung der homologen Chromosomen in der Meiose haben. Desweiteren konnten Vergleiche von genetischen und physikalischen Karten zeigen, daß insbesondere die distalen Bereiche der Gräserchromosomen genreich sind, so daß diese relative räumliche Nähe zu Satelliten-DNA einen Einfluss auf Expression und Rekombination haben kann.

### ***Repetitive Sequenzen in Arabidopsis thaliana***

In cytogenetischen Analysen werden tandemartig organisierte, repetitive Sequenzwiederholungen oder kurze (1 – 10 Bp) Satelliten-DNA-Sequenzen eingesetzt, um Karyotypanalysen innerhalb nahe verwandter Pflanzenspezies durchzuführen (LEITCH *et al.*, 1991; MUKAI *et al.*, 1993). Die Ergebnisse zeigen, daß das Heterochromatin einen unterschiedlichen Ursprung, eine unterschiedliche Zusammensetzung und eine eigene Dynamik besitzen kann (BENNETZEN, 2000). Über die Verteilung und Konservierung innerhalb von

entfernt verwandten Spezies ist wenig bekannt. SIMOENS *et al.* (1988) beschrieben Sequenzähnlichkeiten von repetitiven Elementen aus dem *Arabidopsis*-Genom, die mit einer Übereinstimmung von  $10^{-6}$  ( $P = 3 \times 10^{-6}$ ) zu anderen Pflanzen, Mäusen und dem Menschen, nur einen geringen Konservierungsgrad zwischen dem Tier- und dem Pflanzenreich aufweisen. Wie dagegen Versuche mit dem dispers amplifizierten, repetitiven Sequenzmotiv pAR21 aus *Arabidopsis thaliana* zeigen konnten, ist ein cytogenetischer Nachweis auch in phylogenetisch weit entfernten Spezies wie den *Triticeae*n möglich. Dieses Ergebnis zeigt, daß *Arabidopsis* und andere Pflanzengenome außer rDNA- und Telomer-Sequenzen noch weitere konservierte, repetitive DNA-Sequenzen gemeinsam haben.

### ***Retrotransposon-ähnliche Sequenzen***

Eine weitere Klasse von eingestreuten Sequenzwiederholungen stellen die transposablen Elemente und deren Abkömmlinge dar (FLAVELL, 1986). Retrotransposons sind weit verbreitet und in allen Pflanzen vorhanden, wenngleich sie sich in der Sequenz, der Anzahl der Kopien und Verteilung innerhalb der Chromosomen stark unterscheiden können (LANGDON *et al.*, 2000). Die verschiedenen Vertreter der retrotransposablen Elemente können sowohl LTRs („long terminal repeats“), nicht-LTRs (HIROCHIKA und HIROCHIKA, 1993) und MITEs, kleine invertierte, transposable Sequenzwiederholungen sein, die zwischen den Genen liegen (WHITE *et al.*, 1994; WESSLER *et al.*, 1995) und die Hauptmenge der repetitiven DNA ausmachen (SANMIGUEL *et al.*, 1996). Die Genomgröße und der Anteil an repetitiven Sequenzen stehen in enger Beziehung, wobei Einzelsequenzen von einigen hundert Basenpaaren Länge auch in Pflanzen mit großem Genom, wie dem Weizen, selten sind (FLAVELL, 1980; SCHMIDT und HESLOP-HARRISON, 1998). Die Ausbreitung von Retroelementen gilt als prinzipieller Mechanismus für die Vergrößerung von Genomen höherer Pflanzen (WESSLER *et al.*, 1995) und hat sowohl für die genetische Variation in der Genomevolution (WESSLER *et al.*, 1995) sowie bei der Organentwicklung und der Gewebe-spezifischen Organisation eine wichtige Bedeutung (KIDWELL und LISCH, 1997).

Über die Organisation einzelner Vertreter von Retrotransposons in pflanzlichen Chromosomen ist wenig bekannt. Das *Arabidopsis thaliana*-Genom besitzt die geringste Anzahl (4%) dieser repetitiven Sequenzen (MEYEROWITZ, 1994), wobei die meisten dieser Retroelemente in niedriger Kopienzahl vorhanden sind und im Genom verstreut vorkommen (KONIESZYN *et al.*, 1991; WRIGHT *et al.*, 1996; BEVAN *et al.*, 1998). Eine Ausnahme davon stellen die Ty1-*cop*ia-ähnlichen Elemente dar. Sie kommen in unterschiedlichen Blöcken zusammen mit der Paracentromer-spezifischen Familie pAL1/pATMR1 (MARTINEZ-ZAPATER *et al.*, 1986; MURATA *et al.*, 1994) und dem *Athila*-Retroelement (PÉLISSIER *et al.*, 1995, 1996; BRANDES *et al.*, 1997)

mit 150 Kopien vor, das meist mit dem Hauptsatelliten assoziiert ist (PÉLISSIER *et al.*, 1996). Aber auch in größeren Genomen wie dem Mais, dem Roggen und der Gerste konnten eingestreute amplifizierte Blöcke von Retroelementen gefunden werden (PEARCE *et al.*, 1996a, 1996b; WAUGH *et al.*, 1997). Von den 9 analysierten Spezies wurden bei 3 Spezies die chromosomale Verteilung von Ty1-*copia*-ähnlichen Elementen untersucht. Das in der Gerste häufig vorkommende, aktiv transkribierte, *copia*-ähnliche Retroelement BARE-1, das mit einem Vorkommen von  $3 \times 10^4$  eine der Hauptkomponenten des Gerstengenoms darstellt, zeigt eine gleichmäßige Verteilung, wobei Telomer- und NOR-Bereiche ausgespart bleiben (SUONIEMI *et al.*, 1996).

In *Beta vulgaris* (SCHMIDT *et al.*, 1995), *Vicia faba* (PEARCE *et al.*, 1996a) und *Allium cepa* (PEARCE *et al.*, 1996b; PICH und SCHUBERT, 1998) konnte ein disperses Verteilungsmuster auf allen Chromosomen mit Ausnahme von Centromer- und NOR-Regionen beobachtet werden (Abb. 13, 15 und 17). Erst vor kurzem wurde ein neues Retrotransposon der Ty3-*gypsy* Familie beschrieben, das innerhalb verschiedener Pflanzen konserviert und insbesondere in den Centromeren von Getreide integriert ist. Dieses Element konnte auch in niedriger Kopienzahl im Genom der Ackerschmalwand nachgewiesen werden (LANGDON *et al.*, 2000). Andere *gypsy*-ähnliche LTR Elemente, wie z.B. das *monkey*-Element (BALINT-KURTI *et al.*, 2000) sind in den NOR-Regionen konzentriert und wurden dort in Verbindung mit rRNA-Genen nachgewiesen.

In der cGISH-Analyse wurden auf 4 der 5 *Arabidopsis*-Chromosomen Signale im distalen Bereich und/oder der Zentromerregion beobachtet (Abb. 18). Dieses Hybridisierungsmuster ist charakteristisch für die Verteilung der rDNA-Sequenzen und den relativ häufig vorkommenden, Ty1-*copia*-ähnlichen Elementen (THOMPSON *et al.*, 1997). Das *Arabidopsis*-Chromosom 1 wies bevorzugt Signale in den parazentrischen Regionen auf, die Sequenzwiederholungen des repetitiven pAL1-Elementes enthalten. Untersuchungen konnten zeigen, daß die pAL1 Sequenzen durch andere repetitive Elemente unterbrochen werden, wobei häufig Mikrosatelliten nachgewiesen wurden (BRANDES *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen wurden in FISH-Analysen an menschlichen Chromosomen bestätigt, die ebenfalls im Centromerbereich hoch-repetitive DNA der C<sub>0</sub>t1-Fractionen nachweisen konnten (WANG *et al.*, 1995).

Eines der *Arabidopsis*-Chromosomen wies nach der Hybridisierung mit der cGISH-*Ara*-Technik eine vollständige Markierung auf, was auf disperse, repetitive Sequenzen der Sonde zurückgeführt werden kann (Abb. 18). Die unmarkierten Bereiche der anderen Chromosomen



könnten ein Hinweis darauf sein, daß nicht alle genomischen Sequenzen gleichmäßig in der cGISH.*Ara*-Sonde vorhanden sind. Diese unvollständige Repräsentanz könnte bei der relativ kurzen Markierungszeit über „nick“ Translation auftreten, wenn DNase-sensitive Bereiche so fragmentiert werden, daß kurze Sequenzstücke bei der Aufreinigung verloren gehen. Aber auch DNase-geschützte Bereiche könnten bei der kurzen Markierungsreaktion unvollständig markiert werden. Eine vergleichbare, unvollständige Markierung individueller Chromosomen konnte ebenfalls in GISH-Analysen mit genomischer Roggen-DNA beobachtet werden.

Durch das nicht disperse Signalverteilungsmuster der cGISH.*Ara*-Sonde auf mono- und dikotylen Pflanzen (Abb. 12 - 17, 23 und 26) sowie dem Nachweis der repetitiven Sequenz pAR21 aus *Arabidopsis thaliana* auf Chromosomen von *Triticale*n (Abb. 28) wird deutlich, daß Retrotransposons in phylogenetisch weit entfernten Spezies unter heterologen Bedingungen schwierig nachzuweisen sind. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem von BRANDES *et al.* (1997) und KUBIS *et al.* (1998), die PCR-Analysen durchführten um konservierte, „reverse“ Transkriptase-Gene in unterschiedlichen Pflanzenspezies zu vermehren. Dabei konnte auf dem Aminosäureniveau ein Homologiegrad von 31 – 64% ermittelt werden. Southern-Analysen ergaben eine enge Korrelation zwischen dem Verwandtschaftsgrad verschiedener Spezies und der Divergenz der Retrotransposons. Einige der transposablen Elemente, die in *Arabidopsis thaliana* in niedriger Kopienzahl vorhanden sind, könnten daher konserviert und in anderen Pflanzenspezies im Laufe der Evolution amplifiziert und/oder modifiziert worden sein. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß sich einige der nachgewiesenen Signalbanden, die zwischen *Arabidopsis* und anderen Pflanzenarten konserviert geblieben sind, aus Blöcken von Transposon-ähnlichen Elementen oder anderen, bislang noch unbekanntem, tandemartigen, repetitiven Sequenzmotiven herleiten lassen, die während der Genomevolution relativ konserviert geblieben sind.

Die nach der Hybridisierung mit cGISH.*Ara* klar abgegrenzten Signalbanden widersprechen der Hypothese von FLAVELL (1997), daß je älter eine repetitive DNA-Familie ist, desto mehr Variationen und Bindungsorte innerhalb einer Spezies zu erwarten sind. Wahrscheinlicher erscheint dagegen die Vermutung, daß eine kleine Anzahl von konservierten Satelliten-DNAs, die in heterochromatischen Segmenten integriert sind, im Laufe der Evolution erhalten bleiben und so als „Bibliothek“ benützt werden. Einige Elemente könnten amplifiziert, andere dagegen eliminiert worden sein. Solche quantitativen Veränderungen wurden auch bei Satelliten-Sequenzen beobachtet, die im Verlauf der Spezialisierung so Spezies-spezifische Sequenzmotive

ausgebildeten (MESTROVIC *et al.*, 1998). Daß diese Sequenzmotive auch funktionell für die Chromosomen eine wichtige Bedeutung haben können, wurde durch den Nachweis von retrotransposablen Elementen an den Telomeren von *Drosophila melanogaster* erbracht. Dort konnte gezeigt werden, daß diese Elemente bei fehlenden Telomersequenzen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Chromosomenenden übernehmen können.

### ***Nachweis von Einzelkopiesequenzen an meiotischen Chromosomen***

Der Nachweis von Niedrigkopie („low copy“) oder in Einzelkopie vorliegenden Gensequenzen („single copy“) in großen Genomen, die einem hohen Anteil an repetitiven Sequenzen aufweisen, ist meist schwierig. Hybridisierungen der Einzelgensequenz cTpA aus Spinat (OELMÜLLER *et al.*, 1996) waren auf mitotischen und meiotischen Metaphasestadien großer Chromosomen nicht möglich, da die DNA-Sonde nicht oder nur unspezifisch auf den Chromosomen hybridisierte. Eine solche „Unspezifität“ könnte durch kurze DNA-Fragmente hervorgerufen werden, die bei der Markierung über „nick“-Translation entstehen und dadurch Homologien zu dispers verteilten, repetitiven Elementen des Gersten- und Roggengenoms aufweisen. Im Gegensatz dazu war ein Signalnachweis auf Pachytän-Chromosomen der Zuckerrübe möglich, wenngleich die Hybridisierungseffizienz der 1400 Bp langen DNA-Sonde mit ca. 20% deutlich unter der von repetitiven Sequenzen lag (Abb. 30). Als vorteilhaft für den Hybridisierungserfolg könnten sich folgende Faktoren erweisen:

- Pachytänstadien weisen meist weniger zytoplasmatische Schichten auf, die ein Eindringen der DNA-Sonde verhindern;
  - Aufgrund des geringen Kondensationsgrad sind die Chromosomen in der Prophase 10 bis 25-fach länger und weniger kondensiert als in der Metaphase. Dies erleichtert möglicherweise die Zugänglichkeit der Sonde zur Zielsequenz und führt ausserdem zu genaueren Ergebnissen bei Kartierungen;
  - Kleinere Genome, wie das der Zuckerrübe mit etwa 500 Mb, weisen einen deutlich geringeren Anteil an repetitiven Sequenzen im Vergleich zu den großen Genomen auf, so daß Einzelgensequenzen nur in geringerem Ausmaß durch repetitive Sequenzen maskiert werden.
- Diese Beobachtung wird unter anderem auch von MURATA und MOTOYOSHI (1995) und PETERSON *et al.* (1999) bestätigt, die zeigen konnten, daß meiotische Prophase-Chromosomen für einen Nachweis von Einzelkopie Sequenzen besonders geeignet sind. Auf pflanzlichem Gebiet sind Hybridisierungen mit künstlichen bakteriellen Chromosomen (WOO *et al.*, 1994; HANSON *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1995) vor allem in kleinen Genomen gelungen, die nur einen relativ geringen Anteil an repetitiven Sequenzen aufweisen. Aber auch in komplexeren

Genomen, wie z.B. des Mais, wurden Kartierungen von DNA-Sonden im Bereich zwischen 4 – 8 kB beschrieben, während bei stark kondensierten menschlichen Metaphase-Chromosomen eine hochauflösende Kartierung von DNA-Sonden bislang auf 2 – 5 Mb beschränkt ist.

Trotz hohem wissenschaftlichen Potential sind bis heute nur wenige *in situ*-Hybridisierungen an meiotischen Chromosomen durchgeführt worden. Die meisten Kartierungen erfolgten an Pachytän-Spreitungen um topographische Karten zu erstellen und Abstände von genetischen Markern zu bestimmen, wobei von Hybridisierungen an Pflanzen nur vereinzelt berichtet wurde (MOENS und PEARLMAN, 1989; HASENKAMPF, 1989; SCHERTHAN *et al.*, 1992). Dies könnte zum einen an der aufwendigeren Präparation der Stadien liegen, aber auch an der mangelhaften Identifizierungsmöglichkeit der Chromosomen, die mangels Konstriktionen und variabler heterochromatischer Segmente in der Meiose ohne molekulare Marker kaum möglich ist. Hinzu kommt, daß Hybridisierungen auf meiotischen Chromosomenspreitungen mit repetitiven DNA-Sonden im Vergleich zu mitotischen Stadien häufig mehr „unspezifische“ Signale aufweisen (eigene Beobachtung). Dies könnte auf den dekondensierten Zustand zurückgeführt werden, in dem auf den Chromosomen mehr potentielle Bindungsstellen verfügbar sind und zu eingestreuten Signale zwischen den Hauptsignalen führen, die den Eindruck erzeugen „nicht spezifisch“ zu sein.

## Strukturanalysen im REM

Bei Vergleichen von identischen Chromosomenspreitungen der Licht- (LM) (Abb. 13, 34, 35, 39, 40, 41, 83, 88 und 291) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) (Abb. 43, 46, 47, 51, 53, 95, 100 und 302) zeichnen sich schon bei geringer Vergrößerung deutliche Vorteile der REM-Analyse ab:

- Die dreidimensionale Oberflächendarstellung im REM ermöglicht bei der Betrachtung den Verlauf einzelner Chromosomen innerhalb des Satzes zu erkennen und lässt so eine Unterscheidung zu, welche Chromosomen „oben“ oder „unten“ liegen. Fehlinterpretationen, wie sie bei lichtmikroskopischer Darstellung in der Meiose auftreten können, wenn Chromosomen paaren oder „nur“ eng benachbart liegen, werden dadurch verringert.
- Der Durchmesser von eu- und heterochromatischen Bereichen variiert im REM wesentlich geringer, als bei lichtmikroskopischen Betrachtungen. Diese Unterschiede könnten auf die Chromatizität von kontrastreichen, heterochromatischen Strukturen im Phasenkontrast zurückzuführen sein, die aufgrund von Chromatinverdichtungen stärker hervortreten als euchromatische Bereiche.

- Deutliche Vorteile zeichnen sich auch durch das erheblich bessere Auflösungsvermögen des Rasterelektronenmikroskopes ab, die selbst bei geringer Vergrößerung Chromatinfibrillen von einem Durchmesser  $>50$  nm darstellen können. Im Lichtmikroskop ist die Darstellung von Fibrillen durch das geringe Auflösungsvermögens auf Strukturen bis maximal 280 nm begrenzt.

### ***Chromosomenpräparation***

Für die hochauflösende Ultrastrukturanalyse von Chromosomen im Rasterelektronenmikroskop ist die Konservierung der Chromatinstrukturen von entscheidender Bedeutung. Die Pollenmutterzellen der weitgehend synchronen Meiosestadien wurden daher mit „milden“ Aufbereitungstechniken, wie reduzierter Enzymkonzentration und Waschschrritten in Ethanol, präpariert. Daneben wurde auch auf eine Vorbehandlung der Zellen mit Colzemid, APM und HU verzichtet, die zu Veränderungen des Paarungsverhaltens führen kann (ROTH und PARCHMAN, 1971). Eine allgemeine Einschränkung erfährt die Chromosomenpräparation durch die Ausbildung von Oberflächenschichten, welche die Chromosomenspreitungen und deren Strukturdetails im REM maskieren (ALLEN und O'CONNOR, 1989; SUMNER und ROSS, 1989; SUMNER, 1991, 1996). Für pflanzliche Chromosomen wurde dieses Problem durch die Anwendung der Tropf-Kryo-Technik deutlich reduziert, so daß Ultrastrukturuntersuchungen bis zur 10 nm-Fibrille in allen Kondensationsstadien der Mitose (MARTIN *et al.*, 1994; MARTIN *et al.*, 1996) und Meiose möglich waren. Diese Technik ist sowohl für die Präparation großer (Roggen, Lilie), als auch kleiner meiotischer Chromosomen (Zuckerrübe) geeignet. Im allgemeinen weisen meiotische Chromosomen im Vergleich zu mitotischen nach der Präparation verstärkt cytoplasmatische Schichten auf und sind deshalb für Strukturanalysen im REM schwerer zugänglich. Im Vergleich zu Imprägnierungen mit Osmiumtetroxid (SUMNER und ROSS, 1989) konnten bei einer „Besputterung“ mit Platin, die auf ein notwendiges Mindestmaß von 2 – 3 nm reduziert wurde, keine größeren Artefakte oder Schrumpfung an den Chromosomen beobachtet werden. Diese Dicke wurde auch als ausreichend betrachtet, um bei einer Beschleunigungsspannung von 5 – 15 kV ein gutes Signalbild zu erzeugen, ohne daß Feinstrukturen maskiert wurden oder Strahlenschäden auftraten (WENGENROTH und WANNER, persönliche Mitteilungen).

### ***Chromosomenfixierung***

Vergleichende Untersuchungen zur Fixierung und Präparation meiotischer Chromosomen zeigten, daß die Präparationmethode von PMZ in Abhängigkeit vom Genom jeweils leicht modifiziert werden muss. Der Einfluss der Präparationsmethode auf die Ausbildung von störenden Oberflächenschichten konnte durch den ebenfalls durchgeführten Präparationsvergleich unterschiedlich großer Chromosomen in „3:1“-Fixativ (Ethanol/Eisessig) gezeigt werden: Meiotische Chromosomen des Roggens (Abb. 103 - 126) und der Zuckerrübe (Abb. 203 - 213) zeigten nach der „3:1“-Fixierung eine Ultrastruktur, die eine Darstellung von

Chromatinstrukturen bis zur 30 nm-Fibrille ermöglichte, während die gleiche Präparationsmethode bei Lilienchromosomen zu einer glatten Oberflächenstruktur führte (Abb. 247 - 250). Damit wird deutlich, daß die Proteine in Abhängigkeit von der Präparationsmethode Spezies-spezifisch unterschiedlich präzipitieren und die Feinstrukturanalyse durch cytoplasmatische Kontamination erschweren.

### **„3:1“-Fixierung**

Das „3:1“-Fixativ (Ethanol-Eisessig-Gemisch) gilt als klassisches, cytogenetisches Fixans, das seit den frühen 30iger Jahren zur Fixierung von Pflanzenchromosomen verwendet wird. Aufgrund seiner dehydrierenden, Protein-fällenden Wirkung werden, wie SDS-Analysen zeigen, Proteine gut fixiert (BURKHOLDER und DUCZEK, 1982). Seine gute Gewebedurchlässigkeit ermöglicht eine schnelle Fixierung und erleichtert die Zugänglichkeit von DNA-Sonden wie die *in situ*-Hybridisierungsexperimente mit unterschiedlichen Fixantien in dieser Arbeit zeigen konnten. Die primäre Fixierung von Chromosomen mit „3:1“-Fixativ wird jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert. Sie soll unter anderem DNA-Brüche (MEZZANOTTE *et al.*, 1988; SUMNER und ROSS, 1989) und/oder den Verlust von Nukleoproteine, wie das Histon H1 verursachen (DICK und JOHNS, 1968). Strukturanalysen an unterschiedlich fixierten, tierischen und pflanzlichen Chromosomen, zeigen jedoch übereinstimmend, daß der strukturelle Chromosomenaufbau und die Organisation der Fibrillen in geknäuelte oder parallele Anordnungen nach einer „3:1“-Fixierung erhalten bleibt (ALLEN und O'CONNOR, 1989; HARRISON *et al.*, 1982; SCHUBERT *et al.*, 1993; WHELAN und KOKKO, 1992; WANNER und FORMANEK, 2000). Vergleichende Kontrollexperimente an meiotischen Chromosomen der Lilie zeigen nach einer Fixierung mit Protein-vernetzenden Fixantien wie Glutar- oder Formaldehyd (Ergebnisse nicht gezeigt) eine vergleichbare Organisation der 10 nm- und 30 nm-Fibrille, wie sie auch nach einer „3:1“-Fixierung nachgewiesen werden (WANNER *et al.*, 1991). Verschiedene Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille wie Knötchen, Schlaufen, Verdrillungen und Fusionen werden dabei unabhängig vom Fixans („3:1“-Fixativ, Ethanol, Glutaraldehyd) und der Präparationsmethode (Quetschpräparation, Chromosomentropfpräparation) bei meiotischen Chromosomen beobachtet (Abb. 66, 104, 124, 128, 259, 260, 268, 270 und 277), so daß im Gegensatz zu FUKUI *et al.* (1997) und IWANO *et al.*, (1997) diese Strukturen nicht als Artefakte der „3:1“-Fixierung interpretiert werden können. Unterschiede in den Fixierungsmethoden zeigten sich dennoch bei der Chromosomenstruktur und der Chromatinorganisation, die nach einer Glutaraldehydfixierung dreidimensional besser erhalten blieb und im Vergleich zur „3:1“- bzw. Ethanol-Fixierung deutlich aufgelockert war (Abb. 258 und 277). Als Nachteil erweist sich eine leichte Maskierung der Feinstrukturen durch die Glutaraldehyd-Fixierung, welche eine detaillierte Ultrastrukturanalyse aller Fibrillen verhinderte (Abb. 284 - 266). Insgesamt ist die Präparationen von Glutaraldehyd-fixierten Pollenmutterzellen im Vergleich zur konventionellen Chromosomentropfpräparation zeitlich aufwendiger, da die Chromosomen nur durch Quetschen freigesetzt werden können. Daher ist diese Methode für eine routinemäßige Anwendung weniger

geeignet. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine saure Fixierung in Ethanol-Eisessig die Chromatinorganisation im Chromosom generell aufrechterhält und zu keinen größeren, ultrastrukturellen Veränderungen führt (SUMNER und ROSS, 1989; DICK und JOHNS 1968; IWANO *et al.*, 1997).

### ***Isolierungspuffer (IDe)***

Die neu etablierte Präparationsmethode mit dem Isolierungspuffer (IDe), die in Anlehnung an BURKHOLDER und MUKHERJEE (1970) entwickelt wurde, zeichnet sich aufgrund kurzer Fixierungszeiten, fehlender Enzymbehandlung und milder Waschschrte in Ethanol, als schnelle und schonende Präparationsmethode für Chromosomen von Pollenmutterzellen der Lilie aus. Als Vorteil erweist sich das besondere Puffersystem, das dem Ionenmilieu des zu untersuchenden Objektes leicht angepasst werden kann. Das leicht saure Milieu führte zu einer Destabilisierung des Zellulosegerüsts, wodurch ein Großteil der PMZ während des Auftropfens, bzw. nach dem „Gefrierbruch“ auf dem Objektträger gespreitet wird. Im Gegensatz zur „3:1“-Fixierung (Abb. 247 - 251) ist damit eine schichtfreie Präparation aller Stadien sowie eine Darstellung auch von 10 nm-Fibrillen möglich (Abb. 270, 272, 277 - 281). Außer chromosomalen Strukturen bleiben in den frühen Prophasen auch solche der Kernmembran (Porenkomplex, Lamina), Kernmatrix und der Nukleolus-organisierenden Region (NOR) konserviert (Abb. 269, 271, 273, 275 und 286). Die Kernmatrix hat die Aufgabe, die DNA in Schleifendomänen für Transkription und Replikation zu organisieren. Sie beträgt etwa 10% der gesamten Kernproteine und stellt einen zentralen Bestandteil des Kerns dar. Der Nukleolus ist als fibrilläres Netzwerk mit dem Chromatin assoziiert. Die sichtbaren fibrillären Strukturen, die den Nukleolus umgeben können auf Transkripte oder auf Fibrillare zurückgeführt werden, wie sie auch in der Kernmatrix des Krallenfrosches und des Huhnes gefunden werden (OCHS und SMETANA, 1991). Fibrillare sind in der Mitose an der Chromosomenperipherie nachgewiesen worden. Nach der Reintegration haben diese möglicherweise in den sich neu bildenden Tochterzellen eine wichtige Funktion in der Organisation der NOR-Regionen (OCHS und SMETANA, 1991; FOMPROIX *et al.*, 1998).

### **Ultrastrukturanalysen mitotischer Chromosomen**

Mitotische Interphasen wurden schon zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts als eine lockere Vereinigung von mehr oder weniger individueller Fäden betrachtet, die zu einem elementaren Chromosomennetzwerk zusammengesetzt sind. Im Gegensatz zu TEM-Analysen, bei denen in Interphasekernen nur Bereiche hoher bzw. geringerer Elektronendichte, dargestellt werden können (BEREZNEY *et al.*, 1995), wird bei REM-Darstellungen der strukturelle Aufbau von eu- und heterochromatischen Domänen sowie von interchromosomalen Zwischenräumen deutlich (Abb. 55). Schon bei geringer Vergrößerung kann in den Interphasen ein komplexes Netzwerk aus individuellen Chromatinfibrillen und Verdichtungsbereichen (ALLEN, 1989) sichtbar gemacht werden (Abb. 56). Ein Teil der Chromatinverdichtungen korreliert dabei mit den

lichtmikroskopisch nachweisbaren, heterochromatischen Chromodomänen (Abb. 31 und 43). Insbesondere polar orientierte, globuläre Chromatinverdichtungen (Abb. 31 und 43), die in der mitotischen Interphase des Roggens an der Kernperipherie auftreten, können mit den subtelomeren DNA-Sonden pSc119.2 und der cGISH.*Ara*-Sonde *in situ* markiert und als Telomerbereiche identifiziert werden (Abb. 55). Zwischen den heterochromatischen Domänen wurden zahlreiche, verbindende Fibrillen beobachtet, welche auf mögliche Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Chromosomen hindeuten. Zahlreiche Hohlräume, wie sie von CREMER *et al.*, (1995) als interchromosomales Kanalsystem für Interaktions- und Transporträume postuliert wurden, konnten in allen Interphasestadien in unterschiedlichen Größen nachgewiesen werden (Abb. 55 und 56).

Die Ausbildung dünner Prophase-Chromosomen wurde schon 1903 von GRÉGOIRE und WYGAERTS, sowie von NĚMEC und DIGBY (1910) als eine Verdichtung von netzförmigen Chromosomen zu einem dünnen Faden beschrieben. Wie die vorliegende REM-Untersuchungen zeigen, erfolgt die Isolierung einzelner Chromosomenfäden im Verlauf eines transversal ausgerichteten Kondensationsprozesses. Dabei bilden die Chromosomen zuerst einen unregelmäßigen, zickzackförmig verlaufenden Faden von ungleicher Dicke. Diese Unregelmäßigkeit wird durch zahlreiche Verbindungen (Konnektoren) zwischen den individuellen Chromosomen, die nur im REM nachweisbar sind, verstärkt (Abb. 46). Sie sind für das schlechte Spreitungsvermögen der Chromosomen in diesem Stadium zumindest mitverantwortlich. Im Verlauf der Prophase nehmen diese Verbindungen ab und der Chromosomenfaden wird zu einem gleichmäßigen, zylindrischen Körper organisiert. In Hochauflösung werden charakteristische Segmente von Chromomeren und eingestreuten, längorientierten Fibrillen sichtbar, wie sie für alle Prophasestadien typisch sind (MARTIN *et al.*, 1995, WANNER und FORMANEK, 2000).

Im Verlauf der Kondensation zur Metaphase setzt eine deutliche Verkürzung und Verdickung des Chromosomenfadens ein, wobei primäre und sekundäre Konstriktionen erstmals ausgeprägt werden. Diese verstärkte Kondensation bedingt ebenfalls eine Verdichtung von Chromomeren (Abb. 58, 60, 62, 70, 72 und 74), wobei einzelne Fibrillen zwischen den eng benachbarten Chromomeren auftreten (Abb. 64 - 66). Diese deuten auf Interaktionen zwischen den individuellen Chromomeren hin. Solche „Verknüpfungen“ könnten zu einem Abflachen und „Verschmelzen“ von Chromomeren in der Metaphase führen, die wiederum die Ausbildung einer einheitlich glatten Chromosomenoberfläche begünstigen. Diese glatte Oberflächenstruktur ist für alle maximal kondensierten Stadien der Ana- und Telophase charakteristisch.

In der Telophase ballen sich die übrigen Chromosomen zusammen und bilden eine kompakte Gruppe, in der einzelne Chromosomen kaum unterschieden werden können. Diese Zusammenballung, die von GRÉGOIRE und WYGAERTS (1903) als „tassement polaire“ bezeichnet

wurde, tritt in fixiertem und unfixiertem Material auf. Während MARTENS (1929) diese Konformation als Artefakt beschrieben hat, konnte in dieser REM-Analyse gezeigt werden, daß diese auf Verbindung zwischen den Chromosomen (Abb. 52 und 53), als Ausdruck eines beginnenden Dekondensationsprozesses betrachtet werden können, bei dem die Chromosomen wieder in Kontakt treten.

### ***Kondensations- und Dekondensationsmuster im Roggen und in der Gerste***

Vergleichende Ultrastrukturanalysen der etwa gleich großen, mitotischen Chromosomen des Roggens (*Secale cereale*) und der Gerste (*Hordeum vulgare*) zeigen, daß der Prozess der Chromosomenkondensation nicht universell gesteuert ist. Während in der Gerste ein polarer, am Centromer beginnender Kondensationsprozess nachgewiesen wurde (Abb. 67 - 74), der von MARTIN *et al.* (1996) als allgemeiner Kondensationsmodus für Pflanzenchromosomen beschrieben wurde, kann im Gegensatz dazu beim Roggen ein gleichförmiger Kondensationsprozess in der Mitose (Abb. 43 - 54) und der Meiose (Abb. 55 - 62) beobachtet werden, der alle chromosomalen Bereiche mehr oder weniger gleichmäßig einbezieht. Analog zur Kondensationsphase wird bei der Dekondensation von der Telo- bis zur Interphase in der Gerste eine frühe Dekondensation im distalen Bereichen (MARTIN *et al.*, 1996) und im Roggen eine gleichmäßige bis interstielle Auflockerung beobachtet (Abb. 53). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß

- die Chromosomenkondensation nicht universell und uniform gesteuert ist,
- der Kondensationsverlauf Genom-spezifisch moduliert werden kann und
- Kondensations- und Dekondensationsmodus innerhalb eines Genoms nach dem gleichen Prinzip ablaufen.

Dies lässt auf eine Beteiligung Genom- bzw. Chromosomensegment-spezifischer Faktoren schließen, die das Kondensationsmuster mitbeeinflussen. Als mögliche Kandidaten kommen repetitive Sequenzen wie Satelliten-DNAs in Betracht, welche im Roggen und in der Gerste unterschiedlich kartieren. Während die distalen Bereiche des Roggens große Blöcke heterochromatische Segmente (C-Banden-positiv) aufweisen (ENDO und GILL, 1984; GILL *et al.*, 1991), liegen in der Gerste die heterochromatische C-Banden bevorzugt proximal (Abb. 27).

### ***Assoziation der Schwesterchromatiden***

Neben Variationen im Kondensationsmuster wurden bei mitotischen Chromosomen des Roggens und der Gerste auch Unterschiede im Assoziationsverhalten der Schwesterchromatiden beobachtet: Während die Schwesterchromatiden der Roggen-Chromosomen bereits in der frühesten Prophase eng gepaart sind (Abb. 57 - 59, 63 und 64), assoziieren die der Gerste erst im Verlauf des Kondensationsprozesses (Prometaphase) miteinander (Abb. 69, 71 - 74). Dieses unterschiedliche Assoziationsverhalten korreliert auffallend mit dem Kondensationsmuster der Telomerbereiche der jeweiligen Genome, so daß eine Beteiligung konstitutiver, repetitive DNA-Sequenzen am Prozess der Kondensation und der Assoziation von Schwesterchromatiden nicht



ausgeschlossen werden kann. Mit der vergleichenden *in situ*-Hybridisierung mit genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* (cGISH.*Ara*) konnten Hauptsignale in den früh kondensierenden Bereichen (im Roggen distal, in der Gerste proximal) erzeugt werden, was auch auf eine mögliche Beteiligung konservierter, repetitiver Elemente hinweist. Ähnliche Hinweise ergaben auch Untersuchungen an Maus-Chromosomen, die eine Beteiligung von Satelliten-DNA bei der Assoziation von Schwesterchromatiden nachweisen konnten (LICA *et al.* 1986).

### **Vergleichende Ultrastrukturanalyse mitotischer und meiotischer Chromosomen des Roggens**

Die Zellzyklusdauer der Mitose und Meiose des Roggens unterscheiden sich deutlich: Während die Zellteilung der Mitose 11,5 Stunden dauert (KALTSIKES, 1971), wird der Meiose I-Zyklus in 48 Stunden, der Meiose II-Zyklus dagegen in nur 5,6 Stunden durchgeführt (ROUPAKIAS und KALTSIKES, 1977). Der Prozess der Chromosomenkondensation in der Meiose I ist damit deutlich verlängert und nimmt zeitlich etwa 85% der gesamten Meiose ein. Diese Verlängerung ist möglicherweise durch den kritischen Prozess der Homologenerkennung, Rekombination und Trennung der homologen Chromosomen bedingt. Der Zellzyklus der Meiose II, in dem die Chromatiden getrennt werden, ist im Vergleich zur Mitose deutlich verkürzt. Dies kann auf das kurze Interkinesestadium zurückgeführt werden, in dem Meiose II-Chromosomen im Gegensatz zur Mitose keine S-Phase durchlaufen.

REM-Analysen von meiotischen Chromosomen des Roggens zeigen in Übereinstimmung mit mitotischen Chromosomen von Pflanzen (WANNER *et al.*, 1991; MARTIN *et al.*, 1995; MARTIN *et al.*, 1996; Iwano *et al.*, 1997), Insekten (PELLING und ALLEN, 1993) und Säugetieren (HARRISON *et al.*, 1982) eine universelle Organisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen (Abb. 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 122, 124 und 128). Die meisten der 10 nm- und 30 nm-Fibrillen zeigten nach der Platinblau-Kontrastierung deutliche BSE-Signale und werden als Elementarfibrille (lineare Anordnung der Nukleosomenkette) und Solenoid (helikale Anordnung der Elementarfibrille) interpretiert (WANNER und FORMANEK, 1995) (Abb. 129 - 182). Diese Organisationsformen entsprechen einer 9-fachen bei der Elementarfibrille und einer 40-fachen Komprimierung des DNA-Fadens beim Solenoid (WANNER und FORMANEK, 2000). Einige der 10 nm - 30 nm Fibrillen blieben nach der DNA-spezifischen Kontrastierung mit Platinblau unmarkiert, so daß diese als Proteinfibrillen, bzw. „Matrixfibrillen“ (WANNER und FORMANEK, 2000) interpretiert werden (Abb. 209, 210, 219 - 220).

Messungen der Fibrillendurchmesser von meiotischen Chromosomen des Roggens zeigen, daß der Durchmesser der sogenannten 30 nm-Fibrillen von 30 nm - 43 nm in der Meiose variieren kann. Ähnliche Variationen wurden u.a. auch bei Analysen der Seegurke (*Thyone briareus*) beobachtet und von SMITH *et al.* (1990) auf ein alternatives 30 nm-Modell („doppelhelikales“

Nukleosomenmodell) mit zentral angeordneten, miteinander vernetzten „linker“-Sequenzen, zurückgeführt. Aufgrund der variablen „linker“-Längen kann nach Meinung der Autoren ein unterschiedlicher Durchmesser der 30 nm-Fibrille leichter erklärt werden als bei einem vergleichsweise regelmäßigen, helikalen Aufbau, wie er dem „Solenoid“-Modell zugrunde liegt. Aber auch Histonmodifikationen, wie Acetylierungen (TURNER, 2000), Methylierungen (OAKELEY *et al.*, 1997; JASENCAKOVA, 2001) oder Meiose-spezifische Histonanaloge (HASENKAMPF, 1998), könnten als mögliche Faktoren an einem variablen Durchmesser beteiligt sein.

Die im Chromosom dominant vorkommende 30 nm-Fibrille ist meist geknäuelnd und bildet häufig knötchenförmige Strukturen von etwa 70 nm Durchmesser (Abb. 104, 106, 108, 116, 124, 126 und 128). Diese Sekundärstrukturen werden als periphere Spitzen von Chromatinschlaufen oder Rosetten interpretiert, die etwa 30.000 – 80.000 Basenpaare (dies entspricht einer 30 nm – 80 nm langen 30 nm-Fibrille) enthalten (ADOLPH und KREISMAN, 1983; ADOLPH *et al.*, 1986). Durch die Ausbildung weiterer kleinerer Schlaufen können rosettenartige Muster entstehen, die den im REM nachweisbaren, knötchenförmigen Strukturen entsprechen würden (REZNIK *et al.*, 1991). Mehrere dieser Schlaufen zusammen (30 – 60) bilden ein Chromomer (WANNER und FORMANEK, 2000), das mit einem Durchmesser von 100 nm – 400 nm auf der Oberfläche mitotischer und meiotischer Chromosomen im REM nachweisbar ist. Chromomere wurden unabhängig von der Fixierung bei der Gerste, der Saubohne und dem Menschen nachgewiesen und werden daher als grundlegende Struktureinheit der Chromosomen betrachtet (WANNER und FORMANEK, 1995; 2000; IWANO *et al.*, 1997). Diese strukturellen Chromomere müssen jedoch von den im Lichtmikroskop sichtbaren, heterochromatischen Segmenten, häufig ebenfalls als Chromomere oder Chromodomänen bezeichnet, unterschieden werden. Repetitive Sequenzmotive, die den größten Anteil am Genom höherer Pflanzen haben, sind maßgeblich am Aufbau der Chromomere und damit letztendlich an der Chromosomenstruktur, beteiligt (FLAVELL 1986). Zusammen mit kurzen Abschnitten längsorientierter, paralleler Fibrillen prägen sie wesentlich den Charakter mitotischer (Abb. 58 und 70) und früher Stadien meiotischer Chromosomen (Abb. 106, 108, 112 und 109). Diese Segmentierung stellt vermutlich eine universelle Organisationsform des Chromatins dar (UTSUMI, 1982, HANKS, 1983, UTSUMI 1985, WANNER und FORMANEK, 2000).

REM-Analysen zeigen, daß Chromomere innerhalb eines Chromosoms meist unregelmäßig angeordnet sind, ohne daß eine symmetrische oder helikale Organisation erkennbar ist (Abb. 60, 62, 65, 66, 70, 72 und 74). In ersten REM-Untersuchungen des mitotischen Zellzyklus von MARTIN *et al.*, (1996) wurden Chromomere als „Zopfstrukturen“ bzw. „dachziegelartige“ Strukturen beschrieben. Diese Beobachtung, die ein Verwinden von Chromatinsträngen zu Zopfstrukturen impliziert, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Im Verlauf der Chromosomenkondensation schwankt die Anzahl der Chromomere bei den verschiedenen

Zellzyklen von Mitose, Meiose I und Meiose II beträchtlich (Tabelle 4 und 5). Bislang ungeklärt ist, inwieweit die Zellzyklusdauer, und die damit verbundene Kondensationszeit einen Einfluss auf eine geordnete Faltung der Chromatinfibrillen zu Chromomeren hat.

In den alternierenden, euchromatischen Segmenten können überwiegend parallele 30 nm-Fibrillen und nur vereinzelt, geknäuelte Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 58, 60, 106, 278 und 310). Euchromatische Domänen haben, wie Untersuchungen an Angiospermen zeigen, an der Strukturierung von Chromosomen einen deutlich geringeren Anteil (< 1%). Bereiche mit längsorientierten Fibrillen werden mit Zunahme der Kondensation von Chromomeren maskiert, so daß diese nur noch in den Konstriktionsbereichen nachweisbar sind (MARTIN *et al.*, 1996; WANNER und FORMANEK, 2000). Eine weitere Fibrillenklasse von 10 nm – 20 nm Durchmesser, die ebenfalls meist in Längsorientierung im Chromosom vorkommt, zeigt kein Rückstreusignal nach der Platinblau-Kontrastierung und wird deshalb als Proteinfibrille interpretiert (Abb. 209, 210, 219 und 220). Solche Proteinfilamente können unabhängig von der Fixierung („3:1“-Fixierung, IDe-Puffer, Glutaraldehyd-Fixierung) und der Präparationsmethode (Quetsch-, Tropfpräparation) nachgewiesen. Unklar ist, ob diese Fibrillen den DNA-Bindende Proteinen, die in der Organisation mitotischer (und vermutlich auch meiotischer) Chromosomen eine bedeutende Stellung einnehmen, wie z.B. SMC-Proteine, Aktin, Myosin Matrix- oder „scaffold“-Proteinen entsprechen (LESTOURGEON *et al.*, 1975; WANNER und FORMANEK, 2000). Diese Strukturfilamente könnten durch Ausbildung von Proteinbrücken, vergleichbar zu Aktin- und Myosin-Filamenten entfernte DNA-Fibrillen miteinander verbinden (GASSER, 1995) und damit zur Organisation des Chromatins im Verlauf des Zellzyklus beitragen (LESTOURGEON *et al.*, 1975; WANNER und FORMANEK, 2000).

### **Strukturanalyse meiotischer Chromosomen**

Prämeiotische Interphasekerne weisen mit einem Durchmesser von 15 µm einen im Vergleich zur Mitose (10 µm) deutlich vergrößerten Durchmesser auf. Die komplexe Vernetzung von Fibrillen in Interphase und Leptotän zeigt dabei Ähnlichkeiten zu mitotischen Kernen, ohne daß jedoch größere periphere Chromatinverdichtungen auftreten, wie sie für (vergleichbare) mitotische Stadien charakteristisch sind (Abb. 31 und 79). Im Leptotän setzt sich der diffuse Charakter der Chromosomen fort, so daß hier im Gegensatz zur Mitose individuelle Chromosomen nicht als fädige Strukturen nachgewiesen werden können (Abb. 32 und 80). Diese Beobachtungen deuten auf strukturelle Veränderungen in der Architektur und Organisation früher meiotischer Stadien hin und können auf erste, komplexe Interaktionen zwischen den homologen Chromosomen zurückgeführt werden. Der Durchmesser meiotischer Chromosomen (Meiose I und Meiose II) ist in allen Prophasen im Vergleich zu mitotischen Stadien deutlich reduziert (Tabelle 3). Unter der Voraussetzung, daß sich mitotische und meiotische Interphase-Chromosomen in einem vergleichbaren Dekondensationszustand befinden, kann dies als Hinweis gewertet werden, daß

die Chromosomen in der frühen meiotischen Prophase verstärkt transversal kondensiert werden. Dabei wurde im REM auch ein Abflachen von Chromomeren beobachtet (Abb. 106, 108 und 109). Eine sehr frühe chromosomale Umstrukturierung, insbesondere der heterochromatischen Bereiche, die sich noch vor der Paarung der homologen Chromosomen ereignen soll, könnte Ursache für diesen Effekt sein. Ein solcher Prozess, der während der Erkennung und Assoziation der Homologen stattfinden soll, wurde auch von KLECKNER *et al.* (1985) postuliert. Dieser könnte in der Meiose für die Präsentation von homologen Sequenzen und die Synapsis der Homologen eine wichtige Bedeutung haben.

Die chromosomale Segmentierung in Chromomere und Längsfibrillen nimmt im Verlauf der Kondensation in der Meiose I bedeutend schneller ab als in vergleichbaren mitotischen Stadien (Abb. 106, 108, 109 und 112). Längsfibrillen, die in der frühen Prophase I gut sichtbar sind, konnten in den späten Prophasen der Meiose I (Diplotän und Diakinese) nicht mehr beobachtet werden (Abb. 68 und 60). Es kann sein, daß Längsfibrillen nicht mehr oder nur noch in geringerem Maße in kondensierten Stadien ausgeprägt werden. Proteinase K-Behandlung der Chromosomen zeigten jedoch, daß nach Auflockerung der Chromosomen erneut Längsfibrillen auftreten. Wahrscheinlich sind in den Meiose I-Stadien parallele Anordnungen vergleichbar zur Mitose vorhanden, werden aber auf Grund verstärkter Kondensation durch geknäuelte Fibrillen oder Proteine maskiert.

Der Kondensationsmodus der Roggen-Chromosomen läuft in der Meiose (Abb. 81 - 96) und Mitose (Abb. 57 - 62) gleichförmig ab. Einzige Ausnahme stellt das späte Diplotän- bis frühe Diakinesestadium dar, bei dem starke Schwankungen des Chromosomendurchmesser auftreten (Abb. 94 und 113). Diese Variationen können auf eine unterschiedlich starke Kondensation innerhalb individueller chromosomaler Segmente zurückgeführt werden, die im Zuge eines verstärkten Kondensationsprozesses auftreten (der Durchmesser nimmt in diesen Stadien von 500 nm bis zu 1,2 µm zu) (Abb. 205 und 206). Aber auch fibrilläre Verbindungen, die zwischen benachbarten, nicht-homologen Chromosomen in der Prophase ausgebildet und bis zur Metaphase erhalten bleiben, könnten einen gleichmäßigen Kondensationsprozess verhindern (Abb. 113 und 115).

Von der Diakinese bis zur Metaphase I wurde eine starke Verkürzung der Chromosomen beobachtet, die gleichzeitig mit einer deutlichen Verdickung der Chromosomen einhergeht (Abb. 49, 50, 95 und 96). Obwohl Volumenberechnungen anhand der leicht abgeflachten, zylindrischen Chromosomen nicht exakt sind, zeigt eine grobe Abschätzung, daß die Volumina individueller Chromosomen im Vergleich zur Mitose in der Meiose I um 50% und in der Meiose II um 40% reduziert sind. Diese verstärkte Chromatinkondensation könnte insbesondere in der Meiose I eine Ursache für die glatte Oberflächentextur der Chromosomen sein, die ähnlich dem „Verschmelzen“ mitotischer Chromomere zur Ausbildung einer glatten Oberflächen der

Chromosomen führt. Diese spezielle Oberflächenstruktur könnte dazu beitragen den Chromosomen viskoelastische Eigenschaften zu vermitteln und Chromosomenbrüchen, die aufgrund verstärkter Zugkräfte der Spindelfasern bei der Trennung der Homologen in der Meta- und Anaphase I auftreten, entgegenzuwirken.

Die glatte Chromosomenoberfläche von Metaphase I-Chromosomen kann jedoch auch auf eine „Kontamination“ meiotischer Chromosomen mit Proteinen beruhen, die präparationsbedingt mit den Meiose-Chromosomen präzipitiert werden. Eine Behandlung meiotischer Chromosomen mit Proteinase K (WANNER und FORMANEK, 2000) führte in allen Stadien zu einer deutlichen Auflockerung der Chromosomen (Abb. 183 - 228). Schon eine relativ „milde“ Proteinase Behandlung von nur einer Minute demaskierte die Chromosomenoberfläche der Metaphase I-Chromosomen, so daß Feinstrukturen bis zur 10 nm-Fibrille sichtbar wurden. Wie Untersuchungen zeigen, bleibt die Nukleosomenstruktur nach Fixierung in Glutar- oder Formaldehyd und anschließender Behandlung mit Proteinase K erhalten, wobei das Protein/DNA-Verhältnis des Chromatins nicht mehr als 0,8% – 1,0% reduziert wird (DOENECKE, 1978). Dies deutet darauf hin, daß für die Ausbildung der glatten und kompakten Oberflächenstrukturen von Meiose-Chromosomen, insbesondere in den kondensierten Stadien der Meta- und Anaphase I, Chromatin-assoziierte Proteine des Cyto- oder Karyoplasma mitverantwortlich sind (Abb. 117 - 120, 212 - 222).

Da cytoplasmatische Schichten verstärkt in der Meiose I auftreten, könnte dies auch auf Unterschiede in der Protein- und RNA-Menge von Pollenmutterzellen und meristematischen Wurzelspitzengewebe zurückgeführt werden, die zusammen mit den Chromosomen fixiert werden. Bislang ist wenig über die quantitative und qualitative Proteinzusammensetzung bzw. Zellzyklus-spezifische Unterschiede mitotischer und meiotischer Zellen bekannt (LE GAL *et al.*, 1992). Bei mitotischen Zellen konnte jedoch gezeigt werden, daß die RNA-Syntheserate ihr Maximum während der S-Phase hat und in der Prophase um 50% abnimmt. Beim Übergang von der Prometa- zur Metaphase wird die RNA-Synthese auf 10% reduziert und ist in der Ana- und Telophase nicht mehr nachweisbar (SALEM *et al.*, 1998). Eine Kontamination der Chromosomenoberfläche durch RNA-Transkripte erscheint also nicht relevant. Wahrscheinlicher ist, daß Proteinschichten durch Kernkomponenten entstehen, die zusammen mit den Chromosomen fixiert und als perichromosomale Hülle von der Elternzelle auf die Tochterzellen übertragen werden. So konnten Proteine des Mikrotubulin-organisierenden Zentrums (MTOC) auf meiotischen, pflanzlichen Prophase-Chromosomen nachgewiesen werden (SCHMIT *et al.*, 1996). Bei Untersuchungen mitotischer Chromosomen konnte gezeigt werden, daß diese perichromosomalen Schichten noch eine Vielzahl anderer Kern-, Nukleolus- und Ribonukleoproteine (RNPs), wie z.B. Perichromin, Peripherin, Perichro-Monukleolin, Ki-67-Antigen, B23 Protein, Fibrillarin, p103, p52, ribosomale Proteine (S1), snoRNAs (U3 RNAs), pre-rRNAs und rRNAs beinhalten können (MEDINA *et al.*, 1995; HERNANDEZ-VERDUN und

GAUTIER, 1994). Ein Teil dieser Proteine wurde an der Peripherie der Chromosomen von der Prometaphase bis zur frühen Telophase nachgewiesen (DUNDR *et al.*, 1997), die so als „Passagierproteine“ auf die Tochterzelle transferiert werden. Dies ermöglicht z.B. eine schnelle Ribosomenbiogenese, ohne daß eine Neusynthese auf dem Niveau des Nukleolus gestartet werden muss (MEDINA *et al.*, 1995). Solche Passagier-ähnlichen Proteinen könnten daher auch für die Meiose I eine wichtige Rolle spielen, da das transkriptionsaktive Interphasestadium (Interkinese) sowie das Meiose II-Stadium deutlich verkürzt sind.

### ***Rabl- und Bouquetformation***

Die polare Orientierung der Centromer- und Telomerbereiche in *Rabl*-Konfiguration gilt als allgemeine Charakteristik mitotischer Chromosomen und kann in allen Inter- und Prophasen des Weizens, Roggens, der Gerste und des Hafers beobachtet werden (DONG und JIANG, 1998). Dennoch scheint diese Chromosomenorganisation nicht universell zu sein, da sie in anderen Getreidepflanzen wie Hirse, Reis und Mais nicht nachweisbar ist (DONG und JIANG, 1998). Obwohl die *Rabl*-Konfiguration mitotischer Chromosomen des Roggens (Abb. 44 - 47 und 57) und der Gerste (Abb. 69) nach der Tropfpräparation gut erhalten bleibt (MARTIN *et al.*, 1996), konnte in der Meiose des Roggens (Abb. 92 und 93), der Lilie (Abb. 249, 282 und 284) und der Zuckerrübe (Abb. 290 und 291) kein Hinweis auf eine vergleichsweise polare Orientierung der Centromere gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen von MOORE (1998) überein, der postulierte, daß die Dominanz der Centromerregion durch konservierte Centromer-nahe Sequenzen (CCS1), die auch im Roggen vorkommen, bei der Evolution des Meiose-Zyklus verloren gingen. Stattdessen soll der Centromerbereich an einer Umorganisation der Chromosomen im Kern beteiligt sein (MOORE *et al.*, 1997), wobei diesem eine neue, wichtige Funktion bei der Assoziation und Erkennung der Homologen zugeschrieben wird. Diese Hypothesen werden durch FISH-Analysen mit der Centromer-spezifischen DNA-Sonde (pAWrc) des Roggens bestätigt, die im Zygotän eine frühe Assoziation der homologen Centromere ohne eine polare Orientierung nachweisen konnten.

Bei lichtmikroskopischen Analysen wird im Zygotän eine Zusammenlagerung und Anheftung der Telomere an eine lokal begrenzte Region der inneren Kernmembran beschrieben, die allgemein als *Bouquet*-Konformation bezeichnet wird. Diese Organisation ist für Säugtiere (BASS *et al.*, 1997), Hefe sowie niedere und höhere Pflanzen charakteristisch (VONWETTSTEIN *et al.*, 1984; DAWE, 1994; DERNBURG *et al.*, 1995). Die polare Ausrichtung hat möglicherweise für die Erkennung und Paarung homologer Chromosomen eine wichtige Funktion und soll eine erste Annäherung der homologen Chromosomen erleichtern. (SCHERTHAN *et al.*, 1995, 1996; Loidl *et al.*, 1990). Diese spezielle Telomerkonformation findet in der Hefe unabhängig von Rekombination und Synapsis statt (TRELLES-STICKEN *et al.*, 1999). Im Weizen wurde im Leptotän eine Assoziation und Gruppierung der Homologen im subtelomeren Bereich beobachtet (MARTINEZ-PEREZ *et al.*, 1999). Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen mit Telomer-spezifischen

Sonden zeigten im Mais und in der Maus, daß im Leptotän die Telomere dispers im Kern organisiert sind, im Zygotän sich im *Bouquet* gruppieren und im Pachytän erneut dispers verteilt werden (BASS *et al.*, 1997). Erst wenn die Homologen sich in einem Bouquet ausrichten, kann eine Gruppierung von Telomeren an der Kernperipherie beobachtet werden (BASS *et al.*, 2000).

Wie die Untersuchungen des Meiose I-Zyklus des Roggens zeigen, sind bei den Chromosomentropfpräparationen individuelle Telomere weder im Licht- (Abb. 80 und 81) noch im Rasterelektronenmikroskop (Abb. 92, 93, 135 und 141) nachweisbar. Dies kann als ein indirekter Hinweis für eine gegenseitige Anheftung der Telomere bzw. subterminaler Bereiche gewertet werden, wie sie auch nach einer Platinblau-Kontrastierung nachgewiesen wurde (Abb. 143 und 144). Sie bleiben so im Chromosomenknäuel verborgen und sind im Gegensatz zu mitotischen Spreitungen nicht sichtbar. Diese Beobachtungen zeigen damit, daß nicht nur Telomerassoziationen zwischen homologen Chromosomen und Schwesterchromatiden, sondern auch zu anderen homologen, interstitiellen Sequenzen möglich sind und so eine Darstellung von „freien“ Telomeren verhindern. Für die Initiierung der Chromosomenpaarung und eine Gruppierung der Telomere sind sowohl Sequenzmotive aus dem subtelomeren Bereich sowie Proteine, wie das Protein Taz1 der Hefe, in der Meiose wichtig (COOPER *et al.*, 1998). Als mögliche Kandidaten für die ersten homologen Kontakte kommen sowohl Einzelsequenzen als auch repetitive Sequenzmotive wie z.B. pSc119.2 oder konservierte Elemente der cGISH.*Ara*-Sonde in Frage, die im Roggen sowohl distal als auch interstitiell kartieren.

Aktuelle Untersuchungen an Hefemutanten, die keine Rekombination durchlaufen, zeigen jedoch auch, daß die Ausbildung eines *Bouquets* für die Rekombination nicht zwingend erforderlich ist (TRELLES-STICKEN *et al.*, 1999), so daß das *Bouquet* möglicherweise nur einen Kontrollpunkt für die Initiation der Synapsis darstellt (BASS, 1997). Diese könnte darauf hinweisen, daß die Gruppierung der Telomeren weniger ausschlaggebend ist als eine spezielle Chromatinkonformation, die bislang in allen untersuchten Spezies nachweisbar war.

### ***Konstriktionen***

Meiotische Chromosomen des Meiose I- und II-Zyklus (Abb. 95, 96, 115, 117, 119, 125, 163 und 168) weisen im Gegensatz zur Mitose (Abb. 61, 66 und 323) selbst in den kondensierten Stadien weder primäre (Centromer) und sekundäre Konstriktionen (NOR) auf, noch die, für diese Regionen charakteristischen, parallelen Fibrillen (RATTNER, 1987). In der Metaphase I ist im Gegensatz zur Mitose der Chromosomendurchmesser im Centromerbereich deutlich vergrößert, was auf eine Umstrukturierung in dieser Region hinweist (Abb. 117 und 167). Diese Beobachtung zeigt, daß eine Funktionalität der Centromer- oder des NOR-Region allein durch den Informationsgehalt der DNA-Sequenzen und Proteinkomponenten, als von der morphologischen Ausprägung von Konstriktionen abhängt. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß bei unbehandelten, im Vergleich zu behandelten (Eiswasser,

Hydroxharnstoff, bzw. APM) Wurzelspitzen keine oder nur schwach ausgeprägte Konstriktionen im Centromerbereich auftreten.

In der Metaphase I werden bei der REM-Analyse in der Centromerregion herausgezogene Fibrillen und Chromatinstränge sichtbar, die als Bestandteil der Kinetochorregion interpretiert werden (Abb. 117, 118, 159 und 164). Herausgezogene Fibrillen im Centromerbereich wurden in geringem Maße auch bei unbehandelten, mitotischen Meta- und Anaphasen beobachtet. Diese können durch große Zugkräfte bedingt sein, die auf die Kinetochor-Region wirken, wenn die Chromosomen nach der Anheftung am Spindelfaserapparat zu den entgegengesetzten Polen gezogen werden. Diesen Spindelfaserkräfte wirken Torsionskräfte, verursacht durch die gepaarten Telomerbereiche, entgegen. Das Fehlen von Konstriktionen in Centromer und NOR kann daher funktionell zur Stabilisierung der Chromosomen dienen, wenn diese im Verlauf der ersten meiotischen Teilung starken Dehnungskräften ausgesetzt sind. Schon in der Mitose konnten Messungen zeigen, daß die Zugkräfte der Mikrotubuli, die auf die Chromosomen beim Transport zu den Polen wirken, 10.000-fach größer sind als bei freien Chromosomenbewegungen (NICKLAS, 1983). Über physikalischen Auswirkungen dieser Kräfte auf mitotische (CLAUSSEN *et al.*, 1994; NICKLAS *et al.*, 1998) und meiotische Chromosomen ist wenig bekannt und wurde bislang nur anhand von Chromosomen-Ringkonfigurationen bei komplexheterozygoten Oenotheren diskutiert (HEJNOWICZ und FELDMAN, 1999).

Die strukturellen Hinweise bei der durchgeführten REM-Analyse auf eine Umstrukturierung des Centromerbereiches in der Meiose I konnten durch FISH-Analysen mit der Centromer-spezifischen DNA-Sonde pAWrc am Roggen bestätigt werden. Zu Beginn der Diakinese, wenn die individuellen Homologen noch in einer „Seite-an-Seite“-Position liegen, findet eine Umstrukturierung innerhalb des Centromeres statt: Die Centromerbereiche der Schwesterchromatiden orientieren sich gemeinsam in Richtung eines Pols (Abb. 241). Der ursprünglich zentrische Centromerbereich wird tangential und monozentrisch verlagert (Abb. 238 - 242). Dies deutet auf eine enge Zusammenarbeit beider Schwesterchromatiden hin, die zusammen eine unipolare Centromer- bzw. Kinetochorregion ausbilden. Dagegen war in den Pro- (Abb. 245) und Metaphasen (Abb. 246) der Meiose II bei FISH-Analysen ein zentrisches Doppelsignal sichtbar, was auf eine frühe, strukturelle Trennung der Centromerbereiche der Schwesterchromatiden zurückzuführen ist. Eine gemeinsame Orientierung der Kinetochore, wie sie bei FISH-Analysen in Meiose I-Stadien des Roggens sichtbar wurde, konnte auch bei Immunomarkierungen mit CENP-E, einer hoch konservierten Centromer-spezifischen Proteinsequenz, im Schwein nachgewiesen werden (LEE *et al.*, 2000). Untersuchungen in *Drosophila* zeigten gleichfalls, daß in der Metaphase I eine Morphogenese der Kinetochorregion stattfindet. Auch beim Fadenwurm (*Coenorhabditis elegans*) konnte im Verlauf der Meiose eine Umstrukturierung der Kinetochor-Region von einer multiplen zu einer monozentrischen Spindelansatzstelle beobachtet werden (WICKY und ROSE, 1996). Durch die Ausbildung einer



gleichgerichteten, gemeinsamen Kinetochorregion können Schwesterchromatiden zum gleichen Spindelpol gezogen werden (DARLINGTON und GOLDSTEIN, 1981). Hinweise auf eine strukturelle Umorganisation in den Prophase I-Stadien, wie sie von KLECKNER (1995) für eine frühe Zusammenarbeit der homologen Centromere gefordert wurde, konnte im Zygotän und Pachytän anhand langgestreckter Signalbanden bestätigt werden. Diese Umgestaltung der Centromerregion weist auch auf eine Dualität der Schwesterchromatiden hin, die von einem bilaminaren Kinetochortypen zu einer doppelscheibenförmigen Struktur umgewandelt werden können. Im Gegensatz zu TEM-Analysen wurden bei dieser REM-Studie jedoch keine Hinweise auf eine scheibenförmige Organisation an den lateralen Seiten der Schwesternchromatiden oder dichtere Chromatinpackung gefunden, wie sie für Kinetochore höherer Pflanzen beschrieben wurde (PLUTA *et al.*, 1990). Aktuelle TEM-Studien an Säugetieren konnten dagegen eine direkte Anheftung der Spindelfasern an heterochromatische Strukturen der Chromosomenoberfläche nachweisen, ohne daß eine elektronendichte Platte im Centromerbereich nachweisbar war (MCEWEN *et al.*, 1998).

Molekulare Faktoren, die zu einer Umstrukturierung des Centromers führen, sind bis heute unbekannt. So bleibt auch ungeklärt, ob die Ausbildung eines einzelnen, funktionellen Kinetochors innerhalb eines Chromosoms als aktiver Prozess anzusehen ist oder passiv durch gleichgerichtete Zugkräfte des Spindelapparats verursacht wird. DNA-Sequenzmotive der Centromerregionen sind bis auf kurze Mikrosatelliten-Sequenzwiederholungen (GA)<sub>n</sub> der Kinetochorregion stark heterogen. Einige Proteinkomponenten, wie z.B. CENP B, sind zwischen Mensch und Pflanze hoch konserviert und spielen bei der Ausbildung von Sekundärstrukturen des Kinetochors und für dessen Funktion eine wichtige Rolle (VAN HOOSER *et al.*, 2001, EARNSHAW *et al.*, 1989). Unterschiede bei den strukturellen Komponenten meiotischer Centromerbereiche wurden bislang nur bei der Histon-Zusammensetzung beobachtet. Die Histone H2B oder H4, sowie Histon-verwandte Proteine, die wie das menschliche CENP-A oder CDE, die Funktionen als H3-Analoga übernehmen können, sind mögliche Kandidaten, um strukturelle Veränderung der Chromatinorganisation in diesem Bereich zu beeinflussen (PLUTA *et al.*, 1995).

### ***Schwesterchromatidenassoziation***

Die stabile Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden in der Meiose ist mehr als nur eine einfache Näherung von Chromatiden, sondern beruht, wie Ultrastrukturanalysen und Platinblau-Markierungen zeigen konnten, auf einer komplexen Interaktion von Fibrillen (Abb. 59, 60 und 62). Diese Assoziation der Schwesterchromatiden bleibt auch nach einer Proteinase K-Behandlung (Abb. 193 - 206) und Denaturierung der Chromosomen (Abb. 316) erhalten und kann so als zusätzlicher Hinweis auf stabilisierende Interaktionen zwischen Chromatinfibrillen gewertet werden (KLEIN, 1999). Die Kohäsion von Schwesterchromatiden wird in der Meiose I erst mit dem Übergang von der Anaphase I zur Telophase I im distalen Bereich teilweise

aufgehoben (Abb. 169). Untersuchungen an Grashüpfern (*Chorthippus jucundus*) konnten zeigen, daß durch Phosphorylierung von Proteinen (MPM-2 Phosphoproteinen) die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden im Telomerbereich der späten Metaphase I aufgehoben wird (SUJA *et al.*, 1999). Als weiterer möglicher Faktor kommen Phosphorylierungen von H3-Histonen in Betracht, die aktuell mit der Assoziation der Schwesterchromatiden in der Meiose in Verbindung gebracht werden (HOUBEN *et al.*, 2000).

## Meiose und homologe Rekombination

Die Ergebnisse dieser ersten Ultrastrukturanalyse eines kompletten Meiose I- und II-Zyklus im REM zeigen, daß das klassische Bild von der Chromatinorganisation und vom meiotischen Prozess eine sehr vereinfachte Darstellung ist. Wie neuere molekulare Untersuchungen darlegen, können erhebliche Unterschiede bei den meiotischen Vorgängen innerhalb verschiedener Organismen bestehen, so daß es schwierig ist „universelle“ Unterschiede und Gemeinsamkeiten auszuarbeiten. So konnte gezeigt werden, daß die zeitliche Abfolge individueller Ereignisse bei der Chromosomenerkennung und Paarung in verschiedenen Spezies erheblich variieren kann (SHAW and MOORE, 1998; TRELLES-STICKEN *et al.*, 1999). Da hier keine vollkommene Analogie bezüglich der Einzelheiten möglich ist, um die zugrunde liegenden Mechanismen der meiotischen Rekombination aufzuklären, mag dies eine Ursache dafür sein, warum bislang nur vereinzelt detaillierte, cytogenetische Untersuchungen an meiotischen Chromosomen durchgeführt wurden. Hinzu kommt, daß einige Stadien, wie Interkinese, Ana- und Telophase II selten bei einer Antherenernte (zwischen 8 und 16 Uhr) gefunden werden.

Schwierigkeiten bei der Interpretation können jedoch auch durch die außerordentliche Komplexität des meiotischen Prozesses, hinsichtlich der Chromosomenkonformation und biochemischer Ereignisse, bedingt sein. Neuere Modelle über die homologe Rekombination gehen im wesentlichen auf die Hypothese der Vorselektion zurück (STERN *et al.*, 1975). Der Schritt der Homologenpaarung wird heute in vier unterschiedliche physiologische Phasen unterteilt:

- präsynaptisches Stadium, bei dem verschiedene, physiologische Schritte (Phasen) notwendig sind, damit sich homologe DNA-Abschnitte finden können,
- Aneinanderlagerung der Homologen (Konjugation) und Stabilisierung der gepaarten Bivalenten über den synaptonemalen Komplex (SC),
- Rekombination, die das Ausschneiden und das Wiedervereinigen rekombinierter DNA-Stränge beinhaltet, sowie
- die Ausbildung von Chiasmata und „crossing-over“-Strukturen, wenn sich die gepaarten Homologen (Bivalente) trennen.

Dieser Stadienunterteilung in die o.g. vier physiologischen Phasen wird die, seit der Jahrhundertwende eingeführte (VON HAECKER, 1897, WINIWARDER, 1900) und allgemein

verbreitete Unterteilung in 6 cytogenetische Phasen (Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän, Diakinese und Metaphase), gegenübergestellt. Die Übergänge von einem Stadium zum nächsten sind dabei oft fließend, so daß eine Deutung der verschiedenen Stadien häufig mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist.

Die Vorstellungen über den Prozess der Homologenerkennung und Rekombination sind bis heute überwiegend von cytologischen Beobachtungen (LM und TEM) und biochemischen Analysen geprägt. REM-Analysen wurden bislang, mit Ausnahme von 2 Arbeiten, die Pachytän-Stadien der Ratte, des Menschen und des Roggens bei geringer Vergrößerung zeigen (SUMNER, 1896; BARLOW, 1996), nicht durchgeführt.

### ***Assoziation, Konjugation und Synapsis***

Obleich cytogenetische Ereignisse zeitlich von den individuellen meiotischen Stadien entkoppelt sein können, zeigen alle sich sexuell vermehrenden Organismen eine gewisse Übereinstimmung beim „physikalischen Vorgang“ der Meiose (SHAW und MOORE, 1998). Mit Ausnahme der Sprosshefe, bei der die Assoziation der Homologen schon in der prämeiotischen Interphase stattfindet, wird bei Säugetieren und auch in höheren Pflanzen eine erste Annäherung der homologen Chromosomen in den frühen meiotischen Prophase I-Stadien beobachtet (ARAGON-ALCAIDE *et al.*, 1997).

Wie REM-Aufnahmen von Interphase- und frühen Leptotänstadien zeigen, ist das Chromatin prämeiotischer Kerne feinstrukturierter als das der Mitose, in der größere, heterochromatische Domänen auftreten (Abb. 43, 55 und 91). Diese geringe Strukturierung des Chromatins wird auf chromosomale Umstrukturierungen zurückzuführen sein, die den beginnenden Prozess der Homologensuche und Erkennung widerspiegeln. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, daß der Prozess der Chromosomenaneinanderlagerung eine spezialisierte Kern- und Chromatinarchitektur in den frühen Stadien bedingt (DAWE *et al.*, 1994; ZICKLER und KLECKNER, 1998). Mit Ausnahme von wenigen Fällen, in denen eine prämeiotische Paarung nachgewiesen wurde (MAQUIRE, 1976), findet die Paarung der homologen Chromosomen meist in den frühen meiotischen Prophasestadien statt (SCHERTAN *et al.*, 1996; LOIDL, 1990; BASS *et al.*, 1997). Eine Bewegung der Chromosomen im Kern, wie sie bei pflanzlichen und tierischen Zellen nachgewiesen wurde (SCHERTHAN *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1999), ist insbesondere in der Meiose für die Paarung und die Rekombination der Homologen sehr wichtig.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde schon diskutiert, ob die Anziehung (Assoziation) nicht die Gesamtheit der Chromosomen, sondern nur „Unterabteilungen“ betrifft, aus denen die Chromosomen zusammengesetzt sind. Diese kommen beim Konjugationsprozess nebeneinander zu liegen und sollen die Affinität der Homologen nachhaltig beeinflussen (FEDERLEY, 1928). Eine spezielle Chromosomenmorphologie könnte die Homologenerkennung erleichtern. So

konnte lichtmikroskopisch gezeigt werden, daß Heterochromatin in der Meiose I eine weitgehende Restrukturierung erfährt und damit einen wichtigen Einfluss auf das „alignment“ der Chromosomen hat (STACK, 1984).

In mehreren Untersuchungen wurde beobachtet, daß Veränderungen an den Chromosomen häufig schon vor der Synapsis auftreten (STACK, 1984; KARPEN, 1996), die möglicherweise für eine Sequenz-abhängige Suche nach Homologie bei höheren Eukaryonten widerspiegelt. Bei meiotischen Chromosomen der Lilie und des Mais (DAWE *et al.*, 1994) wurde bei der Initiation der Paarung im Präzygotän eine globale Umstrukturierung des Chromatins beschrieben, die u.a. zu einer Elongation von heterochromatischen Knoten, Abnahme heterochromatischer Bereiche und Erhöhung der Oberflächenkomplexität führt. Mit Hilfe der dreidimensionalen Lichtmikroskopie konnte bei meiotischen Zygotänstadien der Lilie eine Volumenabnahme heterochromatischer Chromomere um 50% beobachtet werden (DAWE *et al.*, 1994). STACK (1984) berichtete dagegen von einer generellen Abnahme von Chromomeren im Pachytän. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den strukturellen Untersuchungen am Roggen, die ebenfalls eine deutliche Transformation der Chromomere von einer kugeligen Form in der Mitose (Abb. 58,60, 62) in eine langgestreckte Form in der Prophase I (Abb. 105, 106, 108 und 109) nachweisen konnten. Diese Abflachung könnte in der Meiose für die Synapsis der Homologen (Präsentation von homologen, möglicherweise repetitiven Sequenzen, Erkennung und Konjugation homologer Abschnitte) eine wichtige Bedeutung haben.

Der Chromosomenkonjugation kommt für die nachfolgende Synapsis eine wichtige biologische Bedeutung zu. Dabei sind einige wichtige strukturelle Fragen bislang ungeklärt, wie: Verschmelzen homologe Chromosomen bei der Synapsis vollkommen miteinander oder gehen sie dabei nur eine lockere periphere Verbindung ein? Führt die Konjugation zu strukturellen Umbauten innerhalb der Chromosomen? Beeinflusst die Ausbildung des Synaptonemalen Komplexes (SC) die Chromatinorganisation benachbarter Chromatinregionen? Wie vergleichende REM-Analysen von Pachytänstadien des Roggens, der Lilie und der Zuckerrübe zeigen konnten, ist die Paarung der Homologen so vollständig, daß die homologen Chromosomen miteinander zu einem „einheitlichen“ Chromosom verschmelzen (Abb. 108, 109, 112, 277, 278 und 310). Der Durchmesser der gepaarten Homologen ist dabei deutlich kleiner als der einzelner, individueller Chromosomen (Diagramm 1). Dies zeigt, daß die Assoziation mehr ist als nur eine periphere Aneinanderlagerung der Chromosomen, sondern als vollständige Synapsis größere Chromatinbereiche bei der Konjugation einbezieht, so daß weitläufige Umstrukturierungen innerhalb des Paarungsbereiches wahrscheinlich sind.

Modellvorstellungen zeigen, daß die Synapsis, von den Chromosomenenden beginnend über den gesamten Chromosomenarm, ähnlich wie bei einem Reisverschluß, verläuft. Hinweise dafür wurden in den REM-Analysen nicht gefunden. Es entstand eher der Eindruck, daß sich eine

Initiierung der Paarung an mehreren Stellen zufällig ereignet. Diese Beobachtung unterstützt das „random walk“-Modell, welches die Assoziation der Homologen auf eine Chromosomendynamik zurückführt, die durch zufällige Kontakte infolge von Diffusion entstehen (FUNG *et al.*, 1998).

Im Zygotän waren im REM zwischen den homologen Chromosomen fibrilläre Elemente von 10 nm und 30 nm im Durchmesser nachweisbar (Abb. 106 und 278), die als erstes sichtbares Ereignis der Assoziation und Aneinanderlagerung der Homologen interpretiert werden (VON WETTSTEIN *et al.*, 1984; SCHERTHAN *et al.*, 1994). Diese Fibrillen können auf Proteinstrukturen (KLECKNER 1993, 1994), DNA-DNA oder DNA-Protein-Wechselwirkungen (FISH in Hefe) beruhen, die auf der Suche nach homologen Sequenzen sind (WEINER UND KLECKNER, 1994). REM-Analysen von Zygotän- und Pachytänstadien des Roggens zeigten, daß diese Verbindungen auch nach einer Behandlung mit Proteinase K zwischen den homologen Chromosomen erhalten bleiben (Abb. 193 und 204). Die meisten dieser Elemente konnten mit Platinblau kontrastiert und so als DNA-haltige Fibrillen nachgewiesen werden (Abb. 143, 146, 151 und 152). Andere verbindende Elemente von 10 nm – 15 nm Durchmesser zeigten keine Markierung, so daß diese als Proteinfibrillen interpretiert wurden. Dies zeigt, daß ein Großteil der interchromosomalen Verbindungen auf Chromatinfibrillen beruhen, während Proteinfibrillen geringer beteiligt sind.

Erste Chromatininteraktionen zwischen homologen und nicht-homologen Chromosomen des Zygotäns (Abb. 105 und 106) könnten auf eine frühe Homologenerkennung durch Einzelgensequenzen hindeuten. Hinweise auf eine Homologenerkennung durch Gensequenzen ergaben sich durch die Beobachtung, daß homologe Chromosomen bei einer Transkription leichter zur Paarung kommen (COOK, 1997). Diese frühen Paarungsbereiche korrelieren im REM teilweise mit Regionen längsorientierter Fibrillen, die mit den im LM sichtbaren, euchromatischen („Gen-reichen“) Chromosomendomänen übereinstimmen (Abb. 106 und 137). Dennoch bedarf es weiterer, detaillierter Analysen, um diese These zu stützen. Diese strukturellen Ergebnisse werden indirekt durch Untersuchungen unterstützt, die zeigen konnten, daß sich Paarungen in euchromatischen Bereichen nach dem Pachytän schneller auflösen als im Heterochromatin, welches noch länger gepaart bleibt (DERNBURG *et al.*, 1996).

### ***Synaptonemaler Komplex***

Spezielle Spreitungstechniken und Proteinmarkierungen mit kolloidalem Silber konnten bei TEM-Analysen von Pachytänstadien pflanzlicher und tierischer Chromosomen zeigen, daß der synaptonemale Komplex aus einer dreigeteilten Struktur besteht: zwei lateralen Elementen, die von den beiden homologen Chromosomen gebildet werden und einer zentralen Region, die leiterprossenartig zwischen den Achsen liegt. Die zentrale Region ist der Ort an dem Genkonversion und „crossing-over“ stattfindet. Die Ausprägung von regelmäßigen

Querverbindungen zwischen den Chromosomen ist jedoch variabel. Während sie bei vielen Insekten und Pflanzen auftritt, kann sie bei Säugetieren, wie der Ratte, nicht beobachtet werden, sondern nimmt hier eine amorphe Gestalt an (SCHMEKEL und DANEHOLD, 1995).

Der Hauptteil des SC besteht aus Proteinen (81%), während RNA (12%) und DNA (7%) einen deutlich geringeren Anteil daran haben (DONEV und DJONDJUROV, 1999). Einige SC-Proteine wurden charakterisiert, wie das SCP1 in der zentralen SC-Region bei Säugetieren, ZIP1 bei der Hefe (SYM *et al.*, 1993) und Core-1-Proteine, die mit SC-Strukturen assoziiert sind (DOBSON *et al.*, 1994). Diese halten offensichtlich die Homologen zusammen (SYM *et al.*, 1993). Einige bilden dabei möglicherweise eine amphipatische  $\alpha$ -Helix aus, die mit der „coiled-coil“-Region des Myosin vergleichbar ist (SCHMEKEL und DANEHOLT, 1995). Proteine wie ZIP2, RecA sind dagegen nur an der Initiation der Synapsis beteiligt und haben für die Ausbildung des synaptonemalen Komplexes in der Hefe eine wichtige Bedeutung (REISS, *et al.*, 1996; CHUA and ROEDER, 1998). Andere Proteinkomponenten wie Red1 und Hop sind mit den lateralen und achsialen Elemente der beiden homologen Chromosomen assoziiert (HOLLINGSWORTH *et al.*, 1990; SCHMITH und ROEDER, 1997).

Hinweise auf eine regelmäßige, parallele Ausrichtung von Chromatinfibrillen im Pachytän, die innerhalb des SCs in Schlaufen um eine proteinhaltige Kernregion angeordnet sein soll (HENG *et al.*, 1996) konnten weder bei den großen Chromosomen (Roggen, Lilie) noch kleinen Chromosomen (Zuckerrübe) beobachtet werden (Abb. 106, 108, 145, 146, 177, 178, 304 und 307). Insbesondere bei den gering kondensierten Pachytänstadien der Zuckerrübe war eine komplexe, unregelmäßige Fibrillenstruktur zwischen den beiden Homologen sichtbar. Es bleibt daher fraglich, ob diese parallelen SC-Strukturen wie sie im TEM beobachtet wurden, nicht auf präparationsbedingte Artefakte, bedingt durch die spezielle Spreitungstechnik mit denaturierenden Detergenzien zurückzuführen sind. Strukturelle Artefakte, die aufgrund transversaler Dehnungskräfte an den Chromatinstrukturen auftreten, müssen daher bei einer Interpretation mit in Betracht gezogen werden. Bei der Präparation meiotischer Chromosomen für diese Strukturanalyse wurde in dieser Arbeit auf vergleichbare, denaturierende Behandlungsschritte und Spreitungstechniken verzichtet, so daß diese möglicherweise den *in vivo* Zustand besser repräsentieren.

Im Gegensatz zur lichtmikroskopischen Beobachtung (SCHMEKEL und DANEHOLD, 1995) zeigen hochauflösende REM-Analysen von Pachytänstadien der Lilie, des Roggens und der Zuckerrübe übereinstimmend, daß die Paarung der Homologen unvollständig ist (Abb. 107, 108, 145, 146, 304 und 307). Dies könnte, wie neuere Arbeiten bei reziproken und nicht-reziproken Rekombinationen darlegen konnten, darauf zurückzuführen sein, daß nicht alle Segmente einen SC ausbilden oder Bereiche zu unterschiedlichen Zeitpunkten an der Synapsis teilnehmen (ALLERS und LICHTEN, 2001). In den Paarungsabschnitten, bei denen die Chromosomenachsen,

wie z.B. beim Roggen, weniger als 200 nm entfernt liegen, ist die Verknüpfung zwischen den homologen Chromosomen so eng, daß weder eine Unterscheidung individueller Chromosomen, noch ein Einblick in den strukturellen Aufbau des SC möglich war (Abb. 108 und 109). Für Untersuchungen von Paarungsstrukturen waren Zygotän- und Diplotänstadien besser geeignet, da hier die homologen Chromosomen soweit von einander entfernt lagen, daß sie den den Blick auf verbindende, transversale 10 nm- und 30 nm Fibrillen ermöglichten (Abb. 112 und 114).

Verschiedene Modelle wurden vorgestellt, um Auslöser und Regulation des „crossing-over“, das im SC stattfindet, zu erklären. Einige Forscher gehen davon aus, daß der erste Kontakt auf einem instabilen Kontakt von Duplex-DNA beruht (WEINER und KLECKNER, 1994), der später durch die Synapsis und Rekombination stabilisiert wird (LOIDL, 1994). Andere halten die Transkription aktiver Genbereiche auf den homologen Chromosomen für den Auslöser der Paarung (COOK, 1997). So konnte gezeigt werden, daß die meiotische Rekombination in den meisten Organismen, wie auch in der Hefe, nach einem Doppelstrangbruch der DNA startet (ROEDER, 1995) und nachfolgend über die Ausbildung der *Holliday*-Struktur (SCHWACHA und KLECKNER, 1995) auf dem Chromatinstrang weitergeführt wird. Eine Darstellung dieser Strukturen über EM-Techniken ist jedoch aufgrund des zu geringen Auflösungsvermögens und der Komplexität der chromosomalen Paarungsstrukturen bislang nicht möglich

Molekulare Analysen konnten kurze, tandemartige, repetitive DNA-Sequenzen in Verbindung mit dem synaptonemalen Komplex nachweisen (DONEV und DJONDJUROV, 1999). Obwohl die genetische Instabilität dieser Sequenzklasse schon länger bewiesen wurde (BOIS und JEFFREYS *et al.*, 1988; JEFFREYS, 1999), ist bislang noch kein direkter Bezug zu einer biologischen Funktion hergestellt worden. Neuere Untersuchungen in der Hefe zeigten indirekt, daß Mikrosatelliten (kurze Sequenzwiederholungen von 2 – 5 Bp) bei der Rekombination einen Effekt auf Konversionen und Ausbildung multipler „crossing-over“-Ereignisse haben (GENDREL *et al.*, 2000). Aber auch Proteine wie das RAP1 („repressor activator protein“) aus *Saccharomyces cerevisiae*, das an heterochromatische Bereiche bindet und in der Aufrechterhaltung von Telomeren und Transaktivierung von „stillgelegten“ (transkriptionsinaktiven) chromosomalen Domänen beteiligt ist, scheint am Prozess der homologen Rekombination beteiligt zu sein (MORSE, 2000). So konnte eine RAP1-abhängige Verstärkung der Rekombinationsrate an einer Region nachgewiesen werden, die für Hyperrekombination bekannt ist (GILSON *et al.*, 1994).

Diese Beobachtungen stehen jedoch in einem gewissen Widerspruch zu Untersuchungen von STACK (1984), der in heterochromatischen Bereichen weniger „crossing-over“-Ereignisse beobachtet hat; dieser Effekt wurde auf die enge Chromatinpackung in den heterochromatischen Bereichen zurückgeführt, die ein Eindringen von Rekombinationsenzymen verhindern sollen. Diese Beobachtung steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden REM-Analyse, die zeigen konnte, daß auch in den heterochromatischen Bereichen eine Assoziation der

homologen Chromosomen erfolgt, also ein Eindringen von Enzymen grundsätzlich möglich ist. Da jedoch in den meiotischen Prophasen heterochromatischer Domänen seltener im LM beobachtet werden, könnte dies eine mögliche Ursache für eine Fehlinterpretation sein.

### ***Rekombinationsnodule (RN)***

Rekombinationsnodule (RNs) werden als kleine elektronendichte Strukturen charakterisiert, die mit dem SC assoziiert sind. Sie zeigen eine Korrelation mit „crossing-over“-Ereignissen in unterschiedlicher Häufigkeit (CARPENTER, 1975; SHERMAN und STACK, 1995; ANDERSON *et al.*, 2001). Je nach Zeitpunkt des Auftretens werden sie als „frühe“ oder „späte RNs“ klassifiziert. Im späten Pachytän konnten Chromomere an einigen Stellen zusammen mit gepaarten Homologen beobachtet werden, die zentral auf der Paarungsregion des SC nachweisbar waren (Abb. 109, 278, 309 und 310) und mit den beschriebenen RNs korrelieren könnten (STACK und ANDERSON, 1986; VON WETTSTEIN *et al.*, 1984). Die Funktion der frühen RN ist bislang nicht geklärt. Das Vorkommen der späten RNs, wurde dagegen mit Rekombinationsereignissen korreliert.

### ***Chiasmata***

Die Ausbildung von Chiasmata in der Diakinese und Metaphase ist der (lichtmikroskopisch) sichtbare strukturelle Beweis, daß homologe Rekombination stattgefunden hat. Wie Analysen im REM zeigen, handelt es sich hierbei um eine stabile Verknüpfung homologer Chromosomen, wobei strukturell nur Teile einer Chromatide miteinbezogen werden (Abb. 115 und 116). Beim Übergang zur Metaphase wird diese Verbindung zwischen den gepaarten Bivalenten so verstärkt, daß Telomer- und Subtelomerbereiche individueller homologer Chromosomen miteinander „verschmelzen“ und nicht mehr unterschieden werden können (Abb. 117, 211, 212 und 313). Diese Verbindung, die nach einer Proteinase K-Behandlung erhalten bleibt, zeigt deutlich, daß diese Verknüpfung nicht alleine auf Proteinverbindungen beruhen kann, sondern auf eine komplexe Interaktion von DNA-Fibrillen zurückzuführen ist.

### ***Nicht-homologe und intrachromosomale Interaktionen***

Der Prozess der homologen Rekombination wurde lange als primärer Mechanismus für genetischen Transfer angesehen, um Biodiversität zu ermöglichen. Chiasmata, die im Diakinesestadium auftreten, werden als sichtbarer, struktureller Beweis gewertet, daß homologe Rekombination stattgefunden hat (VON WETTSTEIN, 1984). In der durchgeführten REM-Strukturanalyse wurden im Pachytän bis zur Diakinese gleichfalls Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen an interstitiellen Bereichen nachgewiesen, die auf nicht-homologen Gentransfer und Genkonversionen schließen lassen (Abb. 107, 109, 111 - 113). Diese fibrillären Verbindungen, die mit Platinblau im REM als DNA-haltige Fibrillen nachgewiesen wurden (Abb. 135, 136, 143, 151 und 152), könnten Chiasmata von nicht-homologen Rekombinationsereignissen darstellen, die sich analog zu homologen Rekombinationsereignissen ausprägen. Diese bleiben bis zur Diakinese erhalten. Fädige Verbindungen zwischen nicht-homologen



Chromosomen wurden erstmals schon 1929 beobachtet und skizziert (BABCOCK und CLAUSEN, 1929; CLAUSEN, 1929). Damals wurden diese Strukturen als Übergang einer Chromatide in das andere homologe Chromosom interpretiert. In den letzten Jahren wurde diesen Fibrillen weniger Aufmerksamkeit geschenkt, so daß es keine neueren Interpretationen für diese Beobachtungen gibt. Durch die Verbindungen zwischen den Chromosomen läßt sich auch das geringe Spreitungsvermögen erklären, welches lichtmikroskopisch bei Chromosomen des Diplotän- bis Diakinesestadiums beobachtet wurde.

Synapsen zwischen nicht-homologen Chromosomen wurden mit Hilfe überzähliger chromosomaler Segmente auch bei Grashüpfern (*Chorthippus jucundus*) beschrieben (DEL CERRO und SANTOS, 1997). Molekulare Untersuchungen in der Meiose der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zeigen, daß Rekombinationsereignisse, die auf einem nicht-reziproken Gentransfer beruhen, mit einer Häufigkeit von 0,5% auftreten können. Diese Häufigkeit entspricht in etwa der, die sich zwischen allelen Genen ereignet (JINKS-ROBERTSON und PETES, 1985). Rekombination zwischen Satelliten-ähnlichen Sequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen könnte eine Ursache für einen ungleichen Gentransfer sein. Solche Sequenzen sind häufig nahe der Centromer- oder Telomerregionen (HOLMQUIST und DANCIS, 1979) und im Roggen möglicherweise auch interstitell lokalisiert. Dieser Mechanismus, der ebenso für den Roggen beschrieben wurde, wird als Auslöser für Robertson'sche Translokationen in Verbindung gebracht und spielt eine wichtige Rolle in der Evolution unterschiedlicher Karyotypen und der Entwicklung neuer Spezies.

Nicht-homologe Interaktionen wurden bei der REM-Analyse im Pachytän auch intrachromosomal beobachtet, die häufig zu einer schlaufenförmigen Anordnung des gepaarten Homologenpaars führten (Abb. 109). Diese Verbindungen weisen auf intrachromosomale Rekombinationsereignisse hin, die in der Hefe und in Zellkulturen von Tabak mit einer Häufigkeit von  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  auftreten (HANIN *et al.*, 2000; KAVANAGH *et al.*, 1999). Diese Ereignisse, die zur Ausbildung neuer Allele führen, können auch an der Entstehung von tandemartigen Wiederholungen benachbarter Sequenzen beteiligt sein (PETERHANS *et al.*, 1990). Ein ungleicher, genetischer Transfer wird auch als ein möglicher Mechanismus für Genominstabilität betrachtet, der für intrachromosomale Umbauten von Satelliten-DNA im Menschen verantwortlich ist (SUDUPAK, 1993). Wie vergleichende Kartierungen in Hirse und Mais zeigten, ist die Divergenz der Genome wesentlich häufiger durch Duplikationen, Inversionen oder intrachromosomale Translokationen bedingt, als durch interchromosomale Transferereignisse (WHITKUS *et al.*, 1992).

### **Segregation**

Die Konjugation homologer und nicht-homologer Chromosomen in Diplotän und Diakinese hat nicht nur eine wichtige Bedeutung für die Rekombination, sondern auch für die nachfolgende

Segregation der Chromosomen (DERNBURG *et al.*, 1996). Die Auswirkungen der Chromosomenpaarungen auf die Segregation wurde anhand von Effekten heterochromatischer Segmente des Chromosoms 4 von *Drosophila melanogaster* untersucht, die dupliziert wurden (HAWLEY und THEURKAUF, 1993; HAWLEY *et al.*, 1993a). Je mehr Heterochromatin vorhanden war, desto größer war der beobachtete Grad an nicht segregierenden Chromosomen („non disjunction“). Andererseits konnte gezeigt werden, daß bei zu geringem Homologiegrad des Heterochromatins keine Assoziation zwischen den homologen Chromosomen stattfindet. Wie Untersuchungen an monosomen Chromosomen zeigen, kann stattdessen eine Paarung zwischen den nicht-homologen Chromosomen erfolgen, wenn Homologie zu deren heterochromatischen Bereichen besteht (KARPEN *et al.*, 1996). Dabei wurde eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl und dem Homologiegrad des Heterochromatins beobachtet (DERNBURG *et al.*, 1996). Diese heterochromatische Konjunktion führt zu einer Stabilisierung von Einzelchromosomen und zu einer nachfolgenden korrekten Segregation, auch wenn keine Rekombination stattgefunden hat.

## Meiose II-Zyklus

Der Meiose II-Zyklus wird aufgrund der Segregation der Schwesternchromatiden als ein zur Mitose analoger Zellzyklus betrachtet. Strukturell wurden jedoch bei REM- (Abb. 121 - 126 und 171 - 178) und FISH-Analysen (Abb. 244 -246) zahlreiche Unterschiede in der Chromatinorganisation im Vergleich zur Mitose nachgewiesen wie:

- keine Chromomere in der Interkinese, Prophase II- und Metaphase II-Stadien,
- Separation der Chromatiden bereits in der frühen Prophase,
- „klebrige“ Chromosomen, die in der Prophase abflachen und leicht knicken,
- keine Konstriktionen in Centromer- und NOR-Regionen, bzw. keine parallele Fibrillenorganisation in diesen Bereichen und
- verstärkte Kondensation in der Metaphase II.

Die beobachteten Unterschiede können als ein Indiz gewertet werden, daß der Meiose II-Zyklus als ein strukturell eigenständiger Zellzyklus betrachtet werden kann, der darauf spezialisiert ist, eine geordnete Chromatidensegregation zu ermöglichen. Dieser unterliegt anderen genetischen und strukturellen Anforderungen als der in der Mitose. Die frühe Separation der Chromatiden zeigt die Bedeutung, die diesem Prozess zukommt. Einige strukturelle Charakteristika von Meiose II-Chromosomen (keine Chromomere, Konstriktionen, verstärkte Kondensation) sind mit Meiose I-Chromosomen vergleichbar, so daß ein Einfluss von Meiose I-spezifischen Faktoren denkbar ist, die noch im Meiose II-Zyklus wirksam sind.

Im Gegensatz zur Meiose I wurden die Chromosomen in der Meiose II maximal kondensiert ohne daß eine glatte Chromosomenoberfläche auftrat. Dies zeigt, daß eine „Verschmelzung“ von

Chromatinfibrillen an der Chromosomenoberfläche nicht alleinig auf den engen Kontakt der Fibrillen zurückzuführen ist, sondern von weiteren Zellzyklus-spezifischen Faktoren abhängt. Die fibrilläre Oberfläche kann möglicherweise auch auf einen frühen Dekondensationsprozess zurückgeführt werden, der schon zu Beginn der Anaphase II einsetzt.

### **Ultrastrukturanalyse großer und kleiner meiotischer Chromosomen**

Vergleichende REM-Analysen großer (Roggen, Lilie) (Abb.117, 165, 167, 277 und 278) und kleiner meiotischer Chromosomen (Zuckerrüben) (Abb. 125 und 126) zeigen in Übereinstimmung zu mitotischen Chromosomen, eine Chromatinorganisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen und Anordnung der Fibrillen in Knäuel, Chromomere und parallele Segmente. Diese Organisation kann daher als universell betrachtet werden. Zahlreiche Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrillen, wie Schlaufen, knotige Elemente und Verdrillungen der 30 nm-Fibrille konnten gleichfalls unabhängig vom Genom nachgewiesen werden. Die Ausprägung von Chromomeren war allgemein auf Prophasestadien der Meiose I beschränkt (Abb. 137, 145 und 278). Im Gegensatz zur Mitose traten primäre und sekundäre Konstriktionen weder in Pro- noch in Metaphasen der Meiose auf, so daß dies ebenfalls als strukturelle Charakteristik meiotischer Chromosomen betrachtet werden kann (Abb. 117, 163 und 312).

Unterschiede in der Organisation großer und kleiner Chromosomen konnten jedoch in der Packungsdichte der Fibrillen und Ausprägung von Chromomeren beobachtet werden. Vergleichende Ultrastrukturanalysen zeigten, daß die Größe der Chromomere variierte und nicht direkt mit der Chromosomengröße korrelierbar war (Tabelle 5). Chromomere großer Genome (Roggen, Lilie), die einem variablen Durchmesser von etwa 100 nm – 400 nm aufwiesen waren im Vergleich zu dem kleinen Genom der Zuckerrübe) mit 80 nm – 200 nm nicht proportional vergrößert. Dagegen wurde eine direkte Korrelation bei der Anzahl von Chromomeren zur Genomgröße nachgewiesen. Die Chromatinstrukturen der großen Chromosomen (Lilie und Roggen) waren deutlich kompakter organisiert, so daß im Paarungsbereich kein Einblick in die Organisation des synaptonemalen Komplexes möglich war (Abb. 108, 145, 151 und 278). Dagegen waren die kleinen Chromosomen der Zuckerrübe, mit einer Genomgröße von 500 Mb und einen Anteil von nur 40% repetitiven Sequenzen, für Strukturanalysen besser geeignet. Im REM zeigten diese im Vergleich zum Roggen und zur Lilie eine deutlich aufgelockerte Chromosomenstruktur (Abb. 304, 306 und 307).

Aufgrund des geringen Kondensationsgrad der Zuckerrüben-Chromosomen waren im Pachytän auch Einblicke in den Paarungsbereich homologer Chromosomen möglich (Abb. 304 und 306). Dabei zeigte sich, daß die Homologen insbesondere über die Assoziation heterochromatischer Segmente gepaart sind, während in Bereichen mit längsorientierten Fibrillen die Assoziation deutlich aufgelockert erschien. Innerhalb des Paarungsbereichs wurde eine ebenso komplexe,

netzartige Verbindung von 10 nm- und 30 nm-Fibrillen sichtbar, wie sie auch im Roggen und in der Lilie nachgewiesen wurden. Parallele Strukturen, wie sie für SC-Spreitungspräparate von TEM-Analysen charakteristisch sind, konnten in keinem der Genome dargestellt werden. Dennoch hat die Strukturanalyse kleiner Chromosomen, trotz der Einschränkung durch die schwierigere Präparation, ein großes Potential für die Untersuchung meiotischer Vorgänge, da aufgrund der geringen Anteile repetitiver Sequenzen die Chromatinfibrillen weniger stark kondensiert oder durch Überlagerungen von Chromomeren maskiert werden (Abb. 318 und 320).

### **Hochauflösende DNA-Kartierung (EMISH) im REM**

Der *in situ*-Nachweis von DNA-Sequenzen im REM (EMISH) stellt eine wichtige Voraussetzung für topographischen Kartierung von Sequenzen dar, um die bestehende Diskrepanz zwischen genetischen und physikalischen Genkarten aufzuklären. Von großem Vorteil erweist sich das hohe Auflösungsvermögen, das bei hochauflösenden Kartierungen im REM, im Vergleich zur Lichtmikroskopie um mehr als 2 Potenzen unterschritten wird. Während die Auflösungsgrenze für DNA-Sonden im LM in Abhängigkeit von der Wellenlänge des sichtbaren Lichts bei 100 kB in Interphasekernen und bei 260 nm – 300 nm für Chromatinstrukturen (TRASK *et al.*, 1989, 1991; JIANG *et al.*, 1996) liegt, konnten bei den EMISH-Analysen mit cGISH.*Ara* und der Centromer-spezifischen Sonde pAWrc selbst in kondensierten Metaphasestadien Signalbanden in Abständen von 100 nm und einzelne Signale im Nanometerbereich unterschieden werden, die im Lichtmikroskop nicht darstellbar sind.

Seit dem ersten Nachweis von DNA-Sequenzen an Chromatinstrukturen (MANNING *et al.*, 1975) sind bislang nur vereinzelt Kartierungen im REM an mitotischen (FERGUSON *et al.*, 1986; NARAYANSWAMI und HAMKALO, 1991; MARTIN *et al.*, 1995; HERRMANN *et al.*, 1996) und meiotischen Chromosomen (SOLARI und DRESSER, 1995; BARLOW, 1996) durchgeführt worden. Wie vergleichende Untersuchungen zeigen konnte ist der Hybridisierungserfolg bei der EMISH-Analyse von der Signaleffizienz und einer guten Konservierung der dreidimensionalen Chromosomenstruktur abhängig (Abb. 316 und 317). Hinzu kommt, daß die Zugänglichkeit der Epitope, an denen die DNA-Sonden binden, nicht von Kontaminationen durch Cytoplasmassichten maskiert werden dürfen (SUMNER, 1996). Wie Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt haben, erfährt die Methode eine weitere Einschränkung durch die geringe Nachweiseffizienz von Avidin-(Gold)-Signale, die mit nur 10% bei repetitiven Sequenzen im Vergleich zu FISH-Analysen deutlich reduziert ist (nicht veröffentlichte Ergebnisse). Dies erschwert den Nachweis von Sequenzmotiven niedriger Kopienzahl bzw. von Einzelkopiesequenzen und verhindert deren routinemäßige Kartierung in Hochauflösung.

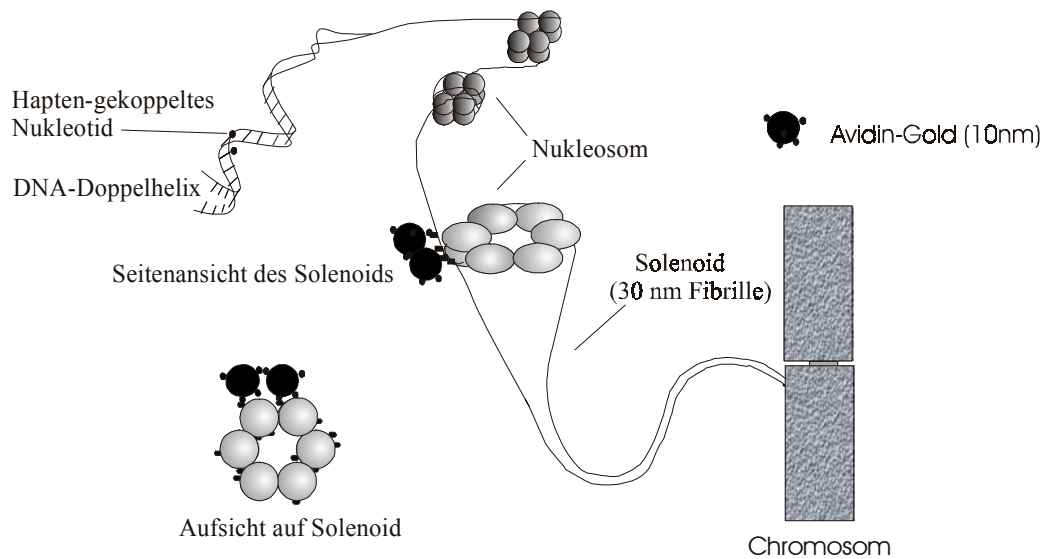
Die geringe Effizienz wurde bislang durch Signalverstärkungen ausgeglichen, die über Antikörperkaskaden im „sandwich“-Verfahren durchgeführt wurden (PINKEL *et al.*, 1986;

MARTIN *et al.*, 1995). Durch diese Antikörperkaskade wird jedoch eine Signalverstärkung erzielt, die nicht proportional zur nachgewiesenen DNS-Zielsequenz ist. Dieses „indirekte“ Detektionssystem erweist sich ferner als nachteilig, da bei einer 6-fachen Signalverstärkung und einer durchschnittlichen Molekülgröße des Avidins bzw. des Antikörpers von 2 – 10 nm, die Signale der Goldmoleküle in einer Entfernung von bis zu 60 nm von der Zielsequenz nachgewiesen werden, so daß keine direkte Signalzuordnung an individuellen Fibrillen möglich ist.

Für hochauflösende Kartierungen im REM ist jedoch ein direkter Nachweis an individuellen Fibrillen unabdingbar, um DNA-Sequenzen *in situ* nachzuweisen. Durch Modifizierung des Hybridisierungs- und Detektionsprotokolles konnte erstmalig eine „direkte“ Markierung von individuellen DNA-Fibrillen nach einer *in situ*-Hybridisierung mit Hilfe von Gold-konjugiertem Avidin ohne weitere Signalverstärkung durchgeführt werden (Abb. 323 - 325). Im Vergleich zu FISH-Analysen oder der von MARTIN *et al.* (1995) durchgeführten „sandwich“-Methode war die Signaleffizienz jedoch reduziert. Versuche mit unterschiedlichen Fixativen zeigten, daß verschiedene Parameter die reduzierte Signaleffizienz verursachen:

- Einfluß der Chromosomenfixierung auf die Hybridisierungseffizienz, die aufgrund einer starken, Protein-vernetzenden Wirkung von Glutaraldehyd, im Vergleich zu Formaldehyd oder zur „3:1“-Fixierung (Ethanol/Eisessig) beobachtet wurde (Diagramm 2 ),
- geringe Nachweiseffizienz von Avidin-Gold (10nm)-Kolloiden nach der Detektion im REM trotz erfolgreicher Biotin-Avidin-Bindung (Abb. 316 und 317),
- sterische Probleme, die sich bei der Detektion mit Goldkolloiden (10nm) aufgrund der Solenoidstruktur ergeben können, so daß mehr als 1/3 der potentiellen Bindungsstellen (im Innern der Solenoide liegenden Epitope) für Avidin-Gold unzugänglich sind (Abbildung 326), und
- technische Einschränkungen der Rasterelektronenmikroskopie auf Grund der geringen Eindringtiefe des Elektronenstrahls, so daß ein Signalnachweis von Sekundärelektronen auf Oberflächen-nahe Epitope beschränkt ist.

Trotz erster Erfolge wird deutlich, daß weitere Versuchsreihen nötig sind, um einen Signalnachweis für Immunogold-Markierungen zu verbessern und störende Parameter zu eliminieren. Verbesserungen könnten hier neue Fixierungsprotokolle (z.B. Formaldehydfixierung) sowie die Verwendung kleinerer Goldmoleküle von 1 nm Durchmesser bringen, die bislang nur bei Immunomarkierungen im TEM eingesetzt wurden.



**Abbildung 327:** Schematische Darstellung des Avidin (Gold)-Detektionssystems mit ungefähren Größenverhältnis von Nucleosom und Avidin-Gold (10nm)-Molekülen.

### ***Chromatinorganisation im Chromosom***

Die Strukturanalysen im REM zeigen, daß eine völlige Aufklärung der Chromatinorganisation von großen Chromosomen des Roggens und der Lilie, aufgrund ihrer Größe und Komplexität, selbst in gering kondensierten Meiosestadien bislang nicht vollständig möglich ist. Dennoch zeichneten sich Gemeinsamkeiten in der Organisation großer und kleiner, mitotischer und meiotischer Chromosomen ab:

- universelle Organisation in 10 nm- und 30 nm-Fibrillen,
- Sekundärstrukturen der 30 nm-Fibrille (Schlaufen, Verdrillungen, knotige Elemente Fusionen),
- Organisation der 30 nm-Fibrille in Chromomere, Knäuel und parallele Stränge,
- Auftreten von Proteinfibrillen von 10 nm - 30 nm Durchmesser.

Unterschiede traten insbesondere auf bei der

- Ausbildung von Chromomeren, die in Abhängigkeit vom Kondensationsstatus und vom Zellzyklus in unterschiedlicher Häufigkeit und Größe auftraten; in der Mitose als globuläre Chromomere, die in großer Anzahl von der Pro- bis zur Metaphase vorkommen, in Meiose I- und II-Stadien nur vereinzelt und abgeflacht in den frühen Prophasestadien auftreten,
- Kondensationsverlauf der Genom-spezifisch moduliert wurde: im Roggen gleichmäßig und in der Gerste polar,
- verstärkte Kondensation von heterochromatischer Bereiche, die im Roggen distal und in der Gerste an proximal liegen,
- Unterschiede in der Ausprägung von interstitiellen, parallelen Fibrillen, die in der Mitose bis zur Prometaphase, in der Meiose I und II dagegen nur in den frühen Prophasen auftreten,
- Assoziation der Schwesterchromatiden, die in der Mitose des Roggens vollständig, in der Gerste erst im Verlauf der Kondensation in der Metaphase assoziieren und

- Ausprägung von Konstriktionen im Centromer und im NOR, die in der mitotischen Metaphase stets, im Meiose I- und II-Zyklus nicht auftreten.

Diese Untersuchungen zeigen deutlich, daß es keinen einheitlichen Kondensationsmodus für mitotische und meiotische Chromosomen gibt. Die Chromosomenkondensation kann in den verschiedenen Genomen sowohl zeitabhängig, Zellzyklus- und Chromosomensegment-spezifisch unterschiedlich moduliert werden.

### ***Proteinfaktoren***

Zahlreiche Proteine wurden bislang isoliert und charakterisiert, die einen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die Chromatinkondensation haben. Einige Proteine sind in die Organisation der Chromatinfibrillen, Assoziation von Schwesterchromatiden oder in die Chromosomenkondensation involviert, wie z.B. Topoisomerasen, SMC-Proteine, Aktin und Myosin, sowie Kohesine (GOLDSTEIN *et al.*, 1977; RUNGGER *et al.*, 1979; HIRANO und MITCHISON, 1991; HOLMES und COZZARELLI, 2000; LAVOIE *et al.*, 2002;). Dabei zeigte sich, daß im Verlauf der ganz frühen Kondensationsstadien die Topoisomerase I wichtig, jedoch nicht unbedingt notwendig für die Kondensation des Chromatins ist. Wiederum andere Proteine sind in die Chromosomenkondensation oder Aufrechterhaltung des Kondensationsstatus involviert, wie die SMC-Proteinfamilie („stability of minichromosomes“), zu der die XCAP-C und XCAP-E Proteine gehören (GASSER, 1995). Diese kommen als Heterodimere vor und sind nur schwer von kondensierten Chromosomen lösbar. Bei meiotischen Chromosomen konnten Proteine, die an der Ausbildung des „scaffold“ beteiligt sind, wie z.B. Topoisomerase II, MATH- und SC-II Proteine als Bestandteile eines Komplexes von Transkriptions- und Regulationsproteinen isoliert werden (FISCHER *et al.*, 1993; MENGISTE *et al.*, 1999; GANGLOFF *et al.*, 1999). Dies deutet auf eine enge Beziehung zwischen Chromosomenkondensation und genetischen Prozessen hin (ZHU *et al.*, 2000).

Aber auch Modifikationen von Histonen, insbesondere Hypomethylierungen und Phosphorylierungen können die Chromatinstruktur und die Chromosomenkondensation nachhaltig beeinflussen (HOUBEN *et al.*, 1999). Wie Untersuchungen an mitotischen und meiotischen Chromosomen zeigen, findet beim Kondensationsprozess eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster des Histons H3 statt. Dabei konnte in den spät replizierenden (= früh kondensierenden), heterochromatischen Regionen eine verstärkte Phosphorylierung von H3-Histonen beobachtet werden. Histonmodifikationen sind daher mögliche Kandidaten bei der Initiation der Chromosomenkondensation (VAN HOOSER *et al.*, 1998), aber auch für die Assoziation von Schwesterchromatiden in Mitose und Meiose I-Stadien (SIKA, 1999; MANZANERO und HOUBEN, 2000; HOUBEN *et al.*, 2000). Daneben können auch Histonanaloge Proteine, wie z.B. Meiotin-1, eine Meiose-spezifische Variante des Histons H1 aus der Lilie, am Kondensationsprozess meiotischer Chromosomen beteiligt sein und zu deren veränderten Kondensationsverhalten beitragen (RIGGS, 1997; TANAKA *et al.*, 1999).

## Chromosomenmodelle

Als eine hilfreiche Ergänzung zur Strukturanalyse erwies sich die Platinblau-Kontrastierung von DNA-Fibrillen im REM. Aufgrund der selektiven DNA-Bindekapazität dieser anorganischen Platinverbindung und hoher Rückstrettiefe war im kondensierten Zustand eine Analyse der DNA-Verteilung, bei einer aufgelockerten Chromosomenstruktur eine Unterscheidung von DNA- und Proteinfibrillen (FORMANEK und WANNER, 199X; WANNER und FORMANEK, 2000), möglich. Vergleiche identischer Chromosomenspreitungen im Licht- und im Rasterelektronenmikroskop ergaben dabei eine gewisse Korrelation von DAPI-positiven Banden mit den starken BSE-positiven Signalen des Platinblaus, so daß heterochromatische Bereiche auch als Orte höherer Chromatindichte betrachtet werden können (Abb. 145 und 146). Diese Beobachtungen wurden auch durch TEM-Analysen bestätigt, die in den heterochromatischen Bereichen ebenfalls Chromatinverdichtungen von 200 nm im Durchmesser nachweisen konnten (BORLAND *et al.*, 1988).

Wie REM-Analysen mitotischer (Abb. 58, 60, 62 - 66) und meiotischer Chromosomen (Abb. 103 - 228) (Ultrastruktur und Platinblau-Kontrastierungen) zeigen, ergibt sich im Verlauf der Kondensation kein Hinweis auf eine regelmäßige Periodizität von Chromatinsstrukturen, wie sie für das „radiale Schlaufenmodell“ (ADOLPH und KREISMAN, 1985), das „Mehrfachschraubenmodell“ („multiple coiling model“) (TANIGUCHI und TAKAYAMA, 1986) oder das aktuell diskutierte, „helikale“ Chromosomenmodelle („scaffold model“) (FILIPSIKI, 1990; LAEMMLI, 1994; STACK und ANDERSON, 2001) gefordert werden.

Die Idee von einer schraubenförmigen Organisation von Chromatinfibrillen im Chromosom, die den meisten Modellen zugrunde liegt, ist nicht neu, sondern geht auf lichtmikroskopische Untersuchungen zurück, bei denen Veränderungen der chromatischen Komponenten zu einem zick-zack- oder schraubenförmigen Band (Chromonem) beobachtet wurden. Dieses Phänomen kann auf eine periodisch wiederkehrende Chromatizität der Grundsubstanz zurückgeführt werden, die nicht bei allen Chromosomen oder nur in frühen Kondensationsstadien nachweisbar ist (SHARP-JARETZKY, 1931). In den REM-Analysen der Lilie konnte ebenfalls eine schraubige Windung des Chromosoms nach Glutaraldehyd-Fixierung (Abb. 254 - 260), nicht jedoch nach „3:1“-Fixierung (Abb. 247 - 250) oder Behandlung mit IDE-Puffer (Abb. 277 - 285) beobachtet werden, so daß ein Einfluß unterschiedlicher Fixantien auf diese spezielle Chromosomen-Morphologie bei der Interpretation wahrscheinlich ist.

Die Beobachtungen dieser REM-Analyse, bei der selbst in frühen Meiosestadien keine spiralen- oder schlaufenförmige Strukturen nachgewiesen wurde, stehen im Widerspruch zu den populären, regelmäßigen Chromosomenmodellen. Dies wird insbesondere deutlich, wenn man das häufig zitierte „radiale Schlaufenmodell“ betrachtet, das eine Verankerung regelmäßiger,

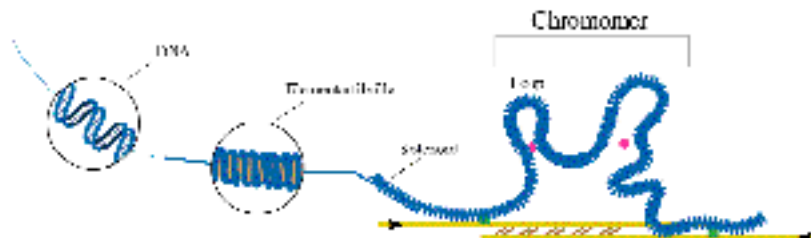


super-solenoidaler Chromatinschlaufen an ein „scaffold“-Gerüst beschreibt, mit den Ergebnissen dieser Studie vergleicht (REZNIK *et al.*, 1991). Für dieses Modell werden Schlaufen in der Größenordnung von 60 000 Bp postuliert (dies entspricht in etwa einer 600 nm langen 30 nm-Fibrille), die 18 mal pro Umdrehung eine chromosomale Minibande ausbilden soll (PIENTA und COFFEY, 1984). Dieses Modell, das den Aufbau eines Chromosoms der mitotischen Metaphase mit einem gleichmäßigen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  – 1,6  $\mu\text{m}$  zu erklären vermag, ist unzulänglich den kontinuierlichen Kondensationsverlauf meiotischer Chromosomen zu beschreiben, der von 300 nm bis auf 2  $\mu\text{m}$  zunimmt (Diagramm 1). Wie Messungen von Meiose I-Chromosomen zeigen, nimmt der Durchmesser kontinuierlich von 300 nm auf 2  $\mu\text{m}$  zu, ohne daß Unregelmäßigkeiten innerhalb der Chromosomenstruktur auftreten. Ein schraubenförmig angeordnetes „scaffold“ muss jedoch zwangsläufig in Pro- und Metaphasen entsprechend mehr oder weniger „spiralisiert“ werden. Widersprüche ergeben sich auch, wenn die oben diskutierten Modelle mit den gering kondensierten Pachytänstadien der Zuckerrübe verglichen werden. In euchromatischen Regionen offenbarte sich ein Chromosomenaufbau aus vier 30 nm-Fibrillen (dies entspricht maximal 2 helikalen Windungen) der im deutlichen Widerspruch zu den oben diskutierten Modellen steht (Abb. 304 und 310).

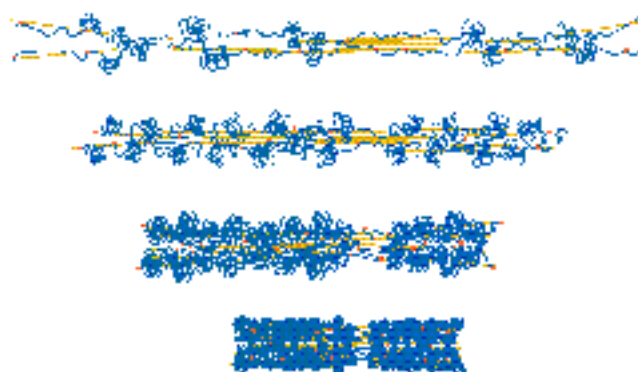
Wie die vorliegende Studie zeigt, ist das Chromatin von Meiose I-Chromosomen vergleichbar mit der Mitose komplex und unregelmäßig „organisiert“ (WANNER und FORMANEK, 2000). Die Kondensation der Chromosomen von der Pro- zur Metaphase kann daher eher als eine Chromatinverdichtung (Aggregation) als eine Spiralisierung angesehen werden. Dies wird insbesondere auch im Telomerbereich deutlich, der eine einheitliche, dichte Fibrillenstruktur aufweisen, ohne daß eine helikale Substruktur auftritt. Diese Beobachtung wird auch durch Volumenmessungen mitotischer Chromosomen bestätigt, die zeigen konnten, daß das Chromatinvolumen innerhalb des Chromosoms im Verlauf der Kondensation zunimmt (SCHAPER *et al.*, 2000). Dabei hat die Kondensation der 30 nm-Fibrille innerhalb von Chromomeren mit einem Faktor von 66 einen wesentlichen Anteil an der Chromosomenorganisation (WANNER und FORMANEK, 2000). Die Restrukturierung von Chromomeren, die im Verlauf des Zellzyklus zu einem Metaphase-Chromosom kondensiert werden, macht bei der Komprimierung des DNA nur noch einen Faktor von 15 an der Gesamtkondensation aus (WANNER und FORMANEK, 2000).

Die Ergebnisse der Strukturanalyse großer und kleiner meiotischer Chromosomen sprechen ebenfalls für ein unregelmäßiges „Faltungsprinzip“ chromosomaler Substrukturen, wie es auch von DU PRAW (1966), HADLACZKY (1986) und BURKHOLDER (1988) und von WANNER und FORMANEK (2000) postuliert wurde. Aufgrund des flexibleren Chromosomenaufbaus sind diese Modelle in der Lage, die dynamischen Veränderungen im Verlauf der Kondensation und Restrukturierung des Chromatins innerhalb des Chromosoms zu erklären, ohne daß die äußere Chromosomentopographie im wesentlichen verändert wird. In dem erst kürzlich veröffentlichten „neuen“ Chromosomenmodell (Matrix-Fibrillen-Modell) von WANNER und FORMANEK (2000)

werden Chromomere, als Grundelemente der Chromosomenstruktur verstanden, die über kontraktile, längsorientierte Matrixfibrillen im Verlauf des Zellzyklus kondensiert werden. Diese Chromatinorganisation ermöglicht eine gleichmäßige Chromosomenkondensation mit variablen Durchmesser, ohne daß größere Unregelmäßigkeiten oder Verdichtungen an der Chromosomenoberfläche auftreten (Abb. 327 und 328).



**Abbildung 327: Chromatinorganisation und Bildung von Chromomeren nach dem Matrix-Fibrillen-Modell:** Der DNA-Faden (2 nm) wird mit Hilfe von Nucleosomen zu einer Elementarfibrille (10 nm-Fibrille) kondensiert, die dann helikal zu einem Solenoid (30 nm-Fibrille) organisiert ist. Stabilisierende Proteinfaktoren (rosa) und Matrix-Bindeproteine (grün) fördern die Ausbildung von Chromatinschleifen. Mehrere Schleifen (etwa 50 in der Geste) werden zu einem Chromomer mit einem Durchmesser von 200 – 300 nm kondensiert. (Abbildung aus: WANNER und FORMANEK, 2000).



**Abbildung 328: Schematische Darstellung der Chromosomenkondensation nach dem Matrixfibrillen-Modell:** Die 30 nm Fibrillen (blau) sind an die Matrixfibrillen (gelb) angeheftet. Im Verlauf der Kondensation werden die Chromomeren mit Hilfe der Matrixfibrillen dynamisch zu einem Chromosom organisiert (Abbildung aus: WANNER und FORMANEK, 2000).

Ein subchromosomaler Aufbau aus kleinen Struktureinheiten, wie sie Chromomere und Matrixfibrillen darstellen, bietet ferner den Vorteil individueller reguliert (moduliert) und dynamisch an die jeweiligen Veränderungen im Verlauf der Zellzyklen von Mitose und Meiose angepasst werden zu können. Umstrukturierungen, wie sie in den heterochromatischen Segmenten oder Konstriktionsbereichen in der Meiose beobachtet werden, könnten ohne großflächige Auswirkungen auf andere Segmente erfolgen und im Gegensatz zu einem regelmäßigen, helikalen Chromosomenaufbau flexibel organisiert werden. Dies würde auch physikalische Kräfte, die innerhalb der individuellen Chromosomen durch die Homologenpaarung, Ausbildung des SC, Chiasmata und der Ausbildung von Verbindungen zwischen nicht-homologen Chromosomen entstehen können, deutlich reduzieren.

## Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt das enorme Potential von Ultrastrukturanalysen im REM, die im Gegensatz zu LM- und TEM-Techniken erstmalig Unterschiede in der Kondensation mitotischer und meiotischer Chromosomen darstellen konnten. Weiterführende vergleichende, strukturelle Untersuchungen an unterschiedlich großen Genomen werden in Zukunft hilfreich sein, Gemeinsamkeiten beim Chromosomenaufbau auszuarbeiten. Kontrollierte Dekondensations- und Denaturierungsversuche mit verschiedenen Proteinase, Detergenzien, kaotrophen Salzen oder spezifischen Antikörpern können zudem zur weiteren Aufklärung der Chromatinorganisation im Chromosom und in Kombination mit der Platinblau-Kontrastierung zu detaillierten Untersuchungen an den Orten des genetischen Austausches beitragen. Für hochauflösende Kartierungen von DNA-Sequenzen im REM sind dabei universelle DNA-Sonden wie cGISH.*Ara* unabdingbar, um eine Identifizierung individueller Chromosomen zu ermöglichen.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Karyotypanalysen pflanzlicher Chromosomen mit Hilfe molekularer Techniken über *in situ*-Hybridisierung und Strukturanalysen mitotischer und meiotischer Chromosomen im Verlauf des Zellzyklus licht- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

1. Es konnte gezeigt werden, dass eine molekulare Bänderung mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierung mit komplexen, repetitiven DNA-Sonden, wie bakterielle, künstliche Chromosomen (BAC's) oder repetitive Sequenzmotive, aufgrund der dispersen und ubiquitären Verteilung innerhalb nahe verwandter Getreidegenome nicht möglich ist. Bei *Triticale*-Linien (ABDR) konnten Translokationsereignissen mit Hilfe von GISH- bzw. von heterologen FISH-Experimenten mit der Gersten-spezifischen DNA-Sonde MWG 2314 und der D-Genom-spezifischen Sonde pAS1 dargestellt werden.
2. Eine neu etablierte, vergleichende, genomische Hybridisierung mit Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (cGISH.Ara) erwies sich als schnelle und universelle Methode für eine Karyotypanalyse unterschiedlicher mono- und dikotyle Pflanzen (*Lilium longiflorum*, *Allium cepa*, *Muscari armenicum*, *Triticum aestivum*, *Vicia faba*, *Beta vulgaris*), der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und der Rotalge (*Rhodella violacea*). Dabei konnten in der Gerste (*Hordeum vulgare*) 56 Signale und im Roggen (*Secale cereale*) 65 Signale erzeugt werden. In Kombination mit der DNA-Sonde pSc119.2 war eine Feinkartierungen im Roggen mit mehr als 100 Signalbanden ohne unspezifischen Signalhintergrund möglich.
3. Hybridisierungen mit der repetitiven Sequenz pAR21 aus *Arabidopsis* bestätigten den konservierten Charakter einzelner repetitiver Sequenzen, die phylogenetisch entfernte Genome neben rDNA- und Telomersequenzen gemeinsam haben können.
4. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde die Strukturdiversität unterschiedlicher mitotischer und meiotischer Chromosomen untersucht, wobei erstmalig die Chromosomenkondensation im Verlauf eines kompletten Meiose-Zyklus (*Secale cereale*) dargestellt wurden. Dabei konnte ein universeller Aufbau aus 10 nm- und 30 nm-Fibrillen beobachtet werden.
5. Im Gegensatz zur Mitose wurden bei meiotischen Chromosomen des Roggens deutliche Unterschiede bei der Ausprägung von parallelen und geknäulten Fibrillen (Chromomere), fehlende Konstriktionen, verstärkte Chromosomenkondensation und Schwesterchromatiden-assoziaton festgestellt.

6. Eine Umstrukturierung wurde gleichfalls bei FISH-Analysen mit der Centromer-spezifischen DNA-Sonde pAWrc aus dem Roggen beobachtet. Dabei zeigte sich in der Meiose I, im Gegensatz zur bipolaren Ausrichtung in der Mitose, eine tangential und monopolare Verlagerung der Centromere. In der Meiose II war dagegen eine frühe polare Orientierung der Centromerbereiche sichtbar, die mit der frühen Segregation der individuellen Chromatidarme in der Prophase II einhergeht. Diese beobachteten Strukturdiversitäten deuten auf eine Zellzyklus-spezifische Modulation der Chromatinorganisation und Kondensation in Mitose- bzw. in Meiose I- und Meiose II-Zyklen hin.
7. Bei den Darstellungen von Meiose-spezifischen Paarungsstrukturen konnten im Gegensatz zu TEM-Analysen netzartige SC-Strukturen im Paarungsbereich homologer Chromosomen sowie zahlreiche Interaktionen zwischen nicht-homologen Chromosomen und intrachromosomal nachgewiesen werden. Die Paarung der Homologen im Pachytän war in heterochromatischen Segmenten vollständig, in euchromatischen Segmenten häufig unvollständig. Chiasmata konnten als komplexe Verschmelzung homologer Chromosomen in den distalen Bereichen nachgewiesen werden.
8. Für die Darstellung großer meiotischer Chromosomen der Lilie (*Lilium longiflorum*) im REM wurde eine neue schonende Präparationsmethode mit Isolierungspuffer (IDE) entwickelt, die im Gegensatz zur „3:1“-Fixierung eine Darstellung von Strukturdetails bis zur 10 nm-Fibrille ermöglichte.
9. Vergleichende Strukturanalysen an großen Chromosomen der Lilie und kleinen Chromosomen der Zuckerrübe im Pachytän bestätigten im Wesentlichen die strukturellen Ergebnisse von Roggen-Chromosomen. Unterschiede wurden jedoch im Kondensationsgrad der Chromosomen beobachtet, wobei die kleinen Chromosomen im Vergleich zu denen der Lilie und des Roggens lockerer gepackt waren und weniger Chromomere aufwiesen. Diese Eigenschaft könnte für den erfolgreichen Nachweis der Einzelgensequenz cTpA verantwortlich sein, die im Pachytänstadium der Zuckerrübe *in situ* kartiert werden konnte.
10. Um die noch bestehenden Diskrepanz zwischen der molekularen und strukturellen Genomanalyse zu schließen wurden repetitive DNA-Sonden (cGISH.*Ara*, pAWrc) auf mitotischen Metaphase-Spreitungen des Roggens nach *in situ*-Hybridisierung im REM nachgewiesen. Durch Modifikation des Protokolls war gleichfalls erstmalig ein direkter Signalnachweis der DNA-Sonde pAWrc auf individuellen Chromatinfibrillen ohne weitere Signalverstärkung möglich.

## 6. Literaturverzeichnis

**ADOLPH, K.W. and KREISMAN L.R.** (1983). LR Surface structure of isolated metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* **147**, 155-166.

**ADOLPH, K.W. and KREISMAN L.R.** (1985). Relationship of the surface structure of metaphase chromosomes to the higher order organization of chromatin fibers. *Scan Electron Microsc* **2**, 869-877.

**ADOLPH, K.W., CHEN, S.M. and LAEMMLI, U.K.** (1977). Role of non-histon proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* **12**, 805.

**ADOLPH, K.W., KREISMAN, L.R. and KUEHN, R.L.** (1986). Assembly of chromatin fibers into metaphase chromosomes analyzed by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. *Biophys J* **49**, 221-231.

**AGARD, D.A. and SEDAT, J.W.** (1983). Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* **302**, 676-681.

**ALKHIMOVA, A.G., HESLOP-HARRISON, J.S., SHCHAPOVA, A.I. and VERSHININ, A.V.** (1999). Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. *Chromosome Res* **7**, 205-212.

**ALLEN T.D., JACK, E.M. and HARRISON, C.J.** (1988). The three dimensional structure of human metaphase chromosomes determined by scanning electron microscopy, in Adolph K.W. (Ed.), *Chromosomes and Chromatides* **2**, 51-72, CRC Florida.

**ALLEN, T.D.** (1989). The organization and substructure of chromatin fibres in the interphase nucleus as studied by scanning electron microscopy. *Scanning Microsc Suppl* **3**, 77-85.

**ALLEN, T.D. and O'CONNOR, P.M.** (1989). The use of scanning electron microscopy for investigations into the three dimensional organisation of the interphase nucleus. *Scanning Microsc* **3**, 287-296.

**ALLEN, T.D., BENNION, G.R., RUTHERFORD, S.A., RAMALHO, A., KISELEVA, E. and GOLDBERG, M.W.** (1996). Accessing nuclear structure for field emission, in lens, scanning electron microscopy (FEISEM). *Scanning Microsc. Suppl* **10**, 149-163.

**ALLEN, T.D., JACK, E.M., HARRISON, C.J. and CLAUGHER, D.** (1986). Scanning electron microscopy of human metaphase chromosomes. *Scan Electron Microsc* **1**, 301-308.

**ALLERS, T. and LICHTEN, M.** (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47-57.

**ALONSO-BLANCO, C., PENDÁS, A.M., GARCIA-SUAREZ, G., ROCA, A., GOICOECHEA, P.G. and GIRALDEZ, T.** (1994). Physical mapping of 5S rDNA reveals a new locus on 3R and unexpected complexity in a rye translocation used in chromosome mapping. *Chromosoma* **103**, 331-337.

**ALTMANN, R.** (1889). *Arch Anat und Physiol*, 409-411.

- AMBROS, P.F., MATZKE, M.A. and MATZKE, A.J.M.** (1986). Detection of a 17 Kb unique sequence T-DNA in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* **94**, 11-18.
- ANANIEV, E.V., PHILLIPS, R.L. and RINES, H.W.** (1997). A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7704-7711.
- ANDERSON, L.K., STACK, S.M. and SHERMAN, J.D.** (1988). Spreading synaptonemal complexes from *Zea mays*. I. No synaptic adjustment of inversion loops during pachytene. *Chromosoma* **96**, 295-305.
- ANDERSON, L.K., HOOKER, K.D. and STACK, S.M.** (2001). The distribution of early recombination nodules on zygotene bivalents from plants. *Genetics* **159**, 1259-1269.
- APPELS R., DENNIS, E.S., SMYTH, D.R. and PEACOCK, W.J.** (1981). Two repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* **84**, 265-277.
- APPELS, R., DENNIS, E.S., SMYTH, D.R. and PEACOCK, W.J.** (1981). Two repeated DNA sequences from the heterochromatic regions of rye (*Secale cereale*) chromosomes. *Chromosoma* **84**, 265-277.
- APPELS, R., GERLACH W.L., DENNIS E.S., SWIFT, H. and PEACOCK W.J.** (1980). Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* **78**, 265-277.
- ARAGÓN-ALCAIDE, L., MILLER, T., SCHWARZACHER, T., READER, S. and MOORE, G.** (1996). A cereal centromeric sequence. *Chromosoma* **105**, 261-268.
- ARAGON-ALCAIDE L., READER, S., BEVEN, A., SHAW, P., MILLER T. and MOORE, G.** (1997). Association of homologous chromosomes during floral development. *Curr Biol* **7**, 905-908.
- ARENTS, G. and MOUNDRIANAKIS, E.N.** (1993). Topography of the histone octamer surface: Repeating structural motives utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 10480-10493.
- BAC, A.L., ZEUTHEN, J. and CRICK, F.H.C.** (1977). Higher-order structure of human mitotic chromosomes. *Proc. Natl Acad Sci USA* **74**, 1995.
- BACCARINI, J.** (1908). *Nuovo Giorn Bot Ital* N.S. **15**, 189-204.
- BADAEVA, E.D., FRIEBE, B. and GILL, B.S.** (1996). Genome differentiation in *Aegilops*. I. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species. *Genome* **39**, 293-306.
- BALINT-KURTI, P.J., CLENDENNEN, S.K., DOLEZLOVA, M., VALARIK, M., DOLEZEL, J., BEETHAM, P.R. and MAY, G.D.** (2000). Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa*. *Mol Gen Genet* **263**, 908-915.
- BARBOSA-CISNEROS, O., FRAIRE-VELAZQUEZ, S., MORENO, J. and HERRERA-ESPARZA, R.** (1997). CENP-B autoantigen is a conserved protein from humans to higher plants: identification of the aminoterminal domain in *Phaseolus vulgaris*. *Rev Rhum Engl Ed* **64**, 368-374.

- BARLOW, A.L.** (1996). Electron microscopic *in situ* hybridization (EMISH) against synaptonemal complex-associated chromatin. *Chromosome Res* **4**, 248-249. ₂
- BARLOW, A.L., JENKINS, G. and AP GWYNN, I.** (1993). Scanning electron microscopy of synaptonemal complexes. *Chromosome Res* **1**, 9-13.
- BASS, H., MARSHALL, W., SEDAT, J., AGARD, D. and CANDE, W.** (1997). Telomeres cluster de novo before the initiation of synapsis: a three dimensional spatial analysis of telomere position before and during meiotic prophase. *J Cell Biol* **137**, 5-18.
- BASS, H.W., RIERA-LIZARAZU, O., ANANIEV, E.V., BORDOLI, S.J., RINES, H.W., PHILLIPS, R.L., SEDAT, J.W., AGARD, D.A. and CANDE, W.Z.** (2000). Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* **113**, 1033-1042.
- BAUMANN, J.G. J., WIGANT, J. BORST, P. and VAN DUIJN, P.** (1980). A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Exp Cell Res* **138**, 485-490.
- BECKER, J.H.** (1974). Mitotic recombination maps in *Drosophila melanogaster*. *Naturwiss* **61**, 441-448.
- BEDBROKK, J.R., JONES, J., O'DELL, M., THOMPSON, R.D. and FLAVELL, R.B.** (1980). A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* **19**, 545-560.
- BEDNAR, J., HOROWITZ, R.A., DUBOCHET, J. and WOODCOCK, C.L.** (1995). Chromatin conformation and salt-induced compaction: three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *J Cell Biol* **131**, 1365-1376.
- BENETT, M.D. and SMITH, J.B.** (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Tarans R Soc Lond B* **274**, 227-274.
- BENETT, M.D. and SMITH, J.B.** (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Tarans R Soc Lond B* **334**, 309-345.
- BENNETT, M.D.** (1982). Nucleotide basis of the spatial ordering of chromosomes in eukaryotes and the implications of the order for genome evolution and phenotypic variation. In: Dover G.A., Flavell R.B. eds. *Genome evolution*. Academic Press, London, 239-261.
- BENNETT, M.D.** (1993). Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Ann Bot (London)* **72**, 239-247.
- BENNETZEN, J.L.** (2000). The many hues of plant heterochromatin *Genome Biology Com* **1**, Reviews 107.
- BERENZNEY, R., MORITILLARO, M.J., MA, H., WEI, X. and SAMARABANDU, J.** (1995). The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* **162**, 1-65.
- BERGEY, D.R., STELLY, D.M., PRICE, H.J. and MCKNIGHT, T.D.** (1989). *In situ* hybridization of biotinylated DNA probes to cotton meiotic chromosomes. *Stain Technol* **64**, 25-37.



- BEVAN, M., BANCROFT, I. BENT, E. ET AL.** (1998). The E.U. Arabidopsis Genome Project 1998. Analyses of 1.9 Mb of contiguous sequences from chromosome IV of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **391**, 485-488.
- BIRNBOIM, H.C. and DOLBY, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513-1542.
- BIRNBOIM, H.C. and DOLY, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1542.
- BOCK, C., DUSCHANEK, I. and MARTIN, R.** (1999). A simple drying method for field emission scanning electron microscopy for chromosomes. *Biotech Histochem* **74**, 244-247.
- BOIS, P. and JEFFREYS, A.J.** (1999). Minisatellite instability and germline mutation. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1636-1648.
- BORLAND, I., HARAUZ, G., BAHR, G. and VAN HEEL, M.** (1988). Packing of the 30 nm chromatin fibre in the human metaphase chromosome. *Chromosoma* **97**, 159-163.
- BOSEN, H. and NAGL, W.** (1978). Short duration of the mitotic and endomitotic cell cycle in the heterochromatin-rich monocot *Allium carinatum*. *Cell Biol Int Rep* **2**, 565-571.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SCOLNICK, M. and DAVIS, R.W.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J.Hum.Genet* **3**, 314-321.
- BRANDES, A., HESLOP-HARRISON, J.S., KAMM, A., KUBIS, S., DOUDRICK, R.L. and SCHMIDT, T.** (1997). Comparative analysis of the chromosomal and genomic organization of Ty1-copia-like retrotransposons in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. *Plant Mol Biol* **33**, 11-21.
- BRANDES, A., THOMPSON, H., DEAN, C. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1997). Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res* **5**, 238-246.
- BROWN, G.R., AMARASINGHE, V., KISS, G. and CARLSON, J.E.** (1993). Preliminary karyotype and chromosomal localization of ribosomal DNA sites in white spruce using fluorescence in situ hybridization. *Genome* **36**, 310-316.
- BUCKLER, E.S. 4<sup>TH</sup>, PHELPS-DURR, T.L. BUCKLER, C.S., DAWE, R.K., DOEBLEY, J.F. and HOLTSFORD, T.P.** (1999). Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics* **153**, 415-426.
- BUORNGIONRNO-NARDELLI, M. and AMALDI, F.** (1969). Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. *Nature* **225**, 946-947.
- BURKE, D.T., CHARLES, G.R. and OLSON, M.V.** (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **806-812**.
- BURKHOLDER, G.D.** (1988). The analysis of chromosome organization by experimental manipulation. In: Gustafson J.P. and Appels, R. (Hrsg.), : Chromosome structure and function. Plenum Press, New York.

- BURKHOLDER, G.D. and DUCZEK, L.** (1982). The effect on the chromosome banding techniques on the histone and non-histone proteins of isolated chromatin. *Can J Biochem* **60**, 328.
- BURKHOLDER, G.D. and MUKHERJEE, B.B.** (1970). Uptake of isolated metaphase chromosomes by mammalian cells in vitro. *Exp Cell Res* **61**, 413-422.
- BUSCH, W., HERMANN, R.G. and MARTIN, R.** (1995). Refined physical mapping of the Sec-1 locus on the satellite of chromosome 1R of rye *Secale cereale* L.. *Genome* **38**, 889-893.
- BUSCH, W., MARTIN, R., HERRMANN, R.G. and HOHMANN, U.** (1994). Sensitivity enhancement of fluorescence in situ hybridization on plant chromosomes. *Chromosome Res* **2**, 15-20.
- BUSCH, W., MARTIN, R., HERRMANN, R.G. and HOHMANN, U.** (1995). Repeated DNA sequences isolated by microdissection. I. Karyotyping of barley *Hordeum vulgare* L.. *Genome* **38**, 889-893.
- CAO, L. and KLECKNER, N.** (1991). Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* **20**, 1239-1256.
- CARPENTER, A.T.** (1975). Electron microscopy in *Drosophila melanogaster* females: II. The recombination nodule - a recombination associated structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 3186-3189.
- CHARGAFF, E., BUCHOWICZ, J., TURLER, H. and SHAPIRO, H.S.** (1965). A direct test of antiparallelism in complementary sequences of calf thymus deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**, 145-147.
- CHRISTENHUSS, R., BUCHER, T. and PFEIFFER, R.A.** (1967). Visualisation of human somatic chromosomes by scanning electron microscopy. *Nature* **216**, 379-382.
- CHUA, P.R. and ROEDER, G.S.** (1998). Zip2, a meiosis-specific protein required for the initiation of chromosome synapsis. *Cell* **93**, 349-359.
- CLARKE, L. and CARBON, J.** (1985). The structure and function of yeast centromeres. *Ann Rev Genet* **19**, 29-56.
- CLAUSSEN U., MAZUR, A. and RUBTSOV, N.** (1994). Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* **66**, 120-125.
- COLLINS, N.C., WEBB, C.A., SEAH, S., ELLIS, J.G., HULBERT, S.H. and PRYOR A.** (1998). The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant Micr Interact* **11**, 968-978.
- COMINGS, D.E. and OKADA, T.A.** (1970). Mechanisms of chromosome pairing during meiosis. *Nature* **227**, 451-456.
- COOK, P.R.** (1997). The transcriptional basis of chromosome pairing. *J Cell Sci* **110**, 1033-1040.
- COOPER, J.P., WATANABE, Y. and NURSE, P.** (1998). Fission yeast Taz1 protein is required for meiotic telomere clustering and recombination. *Nature* **392**, 828-831.

- COX, A.V., BENNETT, S.T., PARAKONNY, A.S., KENTOLN, A., CALLIMASSIA, M.A. AND BENNETT, M.D. (1993).** Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Ann Bot* London **72**, 239-247.
- CREMER, T., KRETH, G., KOESTER, H., FINK, R.H., HEINTZMANN, R., CREMER, M., SOLOVEL, I., ZINK, D. and CREMER, C. (2000).** Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**, 179-212.
- CUADRADO, A. and JOUVE, N. (1995).** Fluorescent *in situ* hybridization and C-banding analyses of highly repetitive DNA sequences in the heterochromatin of rye *Secale montanum* Guss. and wheat incorporating *S. montanum* chromosome segments. *Genome* **38**, 795-802.
- CUADRADO, A., CEOLONI, C. and JOUVE, N. (1995a).** Variation in highly repetitive DNA composition of heterochromatin in rye studied by fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* **38**, 1061-1069.
- CUADRADO, A., JOUVE, N. and HESLOP-HARRISON, J.S. (1995b).** Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in 6x triticale and rye: identification of a new rye locus. *Genome* **38**, 623-626.
- CZARNOTA, G.J., BAZETT-JONES, D.P., MENDEZ, E., ALLFREY, V.G. and OTTENSMEYER, F.P. (1997).** High resolution microanalysis and three-dimensional nucleosome structure associated with transcribing chromatin. *Micron* **28**, 419-431.
- DARLINGTON, C.D. and SHAW, G.W. (1959).** *Heredity* **13**, 89.
- DASKAL, Y., MACE, M.L., WRAY, W. and BUSCH, H. (1976).** Use of direct current sputtering for improved visualization of chromosome topography by scanning electron microscopy. *Exp Cell Res* **100**, 204.
- DAVIE, J.R. (1995).** The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int Rev Cytol* 191-250.
- DAVIE, J.R. and CHADEE, D.N. (1998).** Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 203-213.
- DAWE, R.K., SEDAT, J.W., AGARD, D.A. and , CANDE, W.Z. (1994).** Meiotic chromosome pairing in maize is associated with a novel chromatin organization. *Cell* **76**, 901-912.
- DE GROOTH, B.G. and PUTMAN, C.A. (1992).** High-resolution imaging of chromosome-related structures by atomic force microscopy. *J Microsc* **18**, 239-247.
- DE JONG, H.J., FRANSZ, P. and ZABEL, P. (1999).** High resolution FISH in plants - techniques and applications. *Trends Plant Sci* **4**, 258-263.
- DEL CERRO A.L. and SANTOS, J.L. (1997).** Chiasma redistribution in the presence of different sized supernumerary segments in a grasshopper: dependence on nonhomologous synapsis. *Genome* **40**, 682-688.

- DENNIS, E.S., DUSMUIR, P. and PEACOCK, W.J.** (1980). Segmental amplification in satellite DNA: restriction enzyme analysis of the major satellite of *Macropus rufogriseus*. *Chromosoma* **79**, 179-198.
- DENNIS, E.S., GERLACH, W.J. and CEACOCK W.J.** (1980). Identical polypyrimidine-purine satellite DNAs in wheat and barley. *Heredity* **44**, 349-366.
- DERNBURG, A.F. BROMAN, K.W., FUNG, J.C., MARSHALL, W.F., PHILIPS, J., AGARD, D.A. and SEDAT, J.W.** (1996). Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell* **85**, 745-759.
- DERNBURG, A.F., SEDAT, J.W. and HAWLEY R.S.** (1996). Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* **86**, 135-146.
- DHILLON, S.S. and MIKSCH, J.P.** (1983). DNA, RNA, protein and heterochromatin changes during embryo development and germination of soybean *Glycine max. L.* *Histochem J* **15**, 21-37.
- DICK, S. and JOHNS, E.W.** (1968). The effect of two acetic acid containing fixatives on the histone content of calf thymus deoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue. *Exp Cell Res* **51**, 626-632.
- DIETER-WURM, I., SABAT, M. and LIPPERT, B.** (1992). Model of platinated DNA triplex: Watson-Crick and metal modified Hoogsteen pairing. *J Am Chem Soc* **114**, 357-359.
- DOBSON, M.J., PEARLMAN, R.E., KARAIKAKIS, A., SPYROPOULOS, B. and MOENS, P.B.** (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* **107**, 2749-2760.
- DOENECKE, D.** (1978). Digestion of chromosomal proteins in formaldehyde treated chromatin. Hoppe Seylers. *Z Physiol Chem* **359**, 1343-1352.
- DONALD, T.M., HOUBEN, A., LEACH, C.R. and TIMMIS, J.N.** (1977). Ribosomal RNA genes specific to the B chromosomes in *Brachycone dichromosomatica* are not transcribed in leaf tissue. *Genome* **40**, 674-681.
- DONEV, R.M. and DJONDJUROV, L.P.** (1999). Macromolecular and ultrastructural organization of the mitotic chromosome scaffold DNA. *Cell Biol* **18**, 97-105.
- DONG, F. and JIANG, J.** (1998). Non-*Rabl* patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Res* **6**, 551-558.
- DU MANOIR, S., SPEICHER, M.R., JOOS, S., SCHROCK, E., POPP, S., DOHNER, H., KOVACS, G., ROBERT-NICOUD, M., LICHTER, P. and CREMER, T.** (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Human Genet* **90**, 590-610.
- DU PRAW, E.** (1966). Evidence for a folded-fiber organization in human chromosomes. *Nature London* **209**, 577.

- DU PRAW, E.J.** (1966). Macromolecular organization of nuclei and chromosomes. A folded fiber model based on whole mount electron microscopy. *Nature* **206**, 338.
- DUNDR, M., MEIER, U.T., LEWIS, N., N., REKOSH, D., HAMMARSKJOLD, M.L. and OLSON, M.O.** (1997). A class of nonribosomal nucleolar components is located in chromosome periphery and in nucleolus-derived foci during anaphase and telophase. *Chromsoma* **105**, 407-417.
- DUPRAW, E.J.** (1966). Evidence fo a 'folded fiber' organization in human chromosomes. *Nature* **209**, 577-581.
- EARNSHAW, W.C.** (1991). Large scale schromosome structure and organization. *Current Opinion in Structural Biology* **1**, 237-244.
- EARNSHAW, W.C., RATRIE, H. and STETTEN, G.** (1989). Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma* **98**, 1-12.
- ENDO, T. and GILL, B.S.** (1984). Somatic karyotype, heterochromatin distribution and nature of chromosome differentiation in common wheat, *Triticum aestivum* L. *Chromosoma* **89**, 361-369.
- ENGELS, F.M. and CROES, A.F.** (1968). The synaptonemal complex in yeast. *Chromosoma* **1**, 104-106.
- FARIS, J.D., HAEN, K.B. and GILL, B.S.** (2000). Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics* **154**, 823-835.
- FAWCETT, D.W.** (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 403-406.
- FELSENGELD, G. and MCGHEE, J.D.** (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* **44**, 375-377.
- FERGUSON, D.J., BURNS, J., HARRISON, D., JONASSON, J.A. and MCGEE, J.O.** (1986). Chromosomal localization of genes by scanning electron microscopy using *in situ* hybridization with biotinylated probes: Y chromosome repetitive sequences. *Histochem J* **18**, 266-270.
- FEUILLET, C. and KELLER, B.** (1999). High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8265-8270.
- FILIPSIKI, J., LEBLANC J., YOUDALE, T., SIKORSKA, M. and WALKER, P.R.** (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J* **9**, 1319-1327.
- FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, A.S., RUSHTON, B., LEVITT, M. and KLUG, A.** (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin, *Nature* **269**, 29-36.
- FISCHER, D., HOCK, R. and SCHEER, U.** (1993). DNAs topoisomerase II is not detectable on lambrusch chromosomes but enriched in the amplified nucleoli of *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* **209**, 255-260.

- FLAVELL, R.B. (1980). Molecular changes in chromosomal DNA organisation and origins of phenotypic variation. *Chromosomes Today* **7**, 42-54.
- FLAVELL, R.B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **312**, 227-242.
- FLAVELL, R.B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil Trans R Soc Lond B* **312**, 227-242.
- FLAVELL, R.B., BENNETT, M.D., SMITH, J.B. and SMITH, D.B. (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet* **12**, 257-269.
- FLEMING, W. (1875). *Virchow's Archiv* **77**.
- FLEMING, W. (1879). *Arch Mikr Anat* **16**.
- FLORIJN, R.J., BONDEN, L.A., VROLIJK, H., WIEGANT, J., VAANDRAGER, J.W., BAAS, F., DEN DUNNEN, J.T., TANK, H.J. VAN OMMEN, G.J. and RAAP, A.K. (1995). High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar-coding of large genes. *Hum Mol Genet.* **4**, 831-836.
- FOL, H. (1873). *Jenaische Zeitschr.* **7**.
- FOMPROIX, N., GEBRANE-YOUNES, J. and HERNANDEZ-VERDUN, D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *J Cell Sci* **111**, 359-372.
- FRANZ, P., ARMSTRONG, S., ALONSO-BLANCO, C., FISCHER, T.C., TORRES-RUIZ, R.A. and JONES, G. (1998). Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **13**, 867-876.
- FRANZ, P.F., ARMSTRONG, S., DDE JONG, J.H., PARNELL, L.D., VAN DRUNEN, C., DEAN, C., ZABEL, P., BISSELING, T. and JONES, G.H. (2000). Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. *Cell* **100**, 367-76.
- FRANZ, P.R., ALONSO-BLANCO, C., LIHARSKA, T.B., PEETERS, A.J.M., ZABEL, P. and DEJONG, J.H. (1996). High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibres (EDF). *Plant J* **9**, 421-430.
- FUCHS, J. HOUBEN, A., BRANDES, A. and SCHUBERT, I. (1996). Chromosome „painting“ in plants - a feasible technique? *Chromosoma* **104**, 315-320.
- FUCHS, J., BRANDES, A. and SCHUBERT, I. (1995). Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Plant Syst Evol* **196**, 227-241.
- FUCHS, J., KLOOS, D.U., GANAL, M.W. and SCHUBERT, I. (1996). *In situ* localization of yeast artificial chromosome sequences on tomato and potato metaphase chromosomes. *Chrom Res* **4**, 277-281.
- FUCHS, J., STREHL, S., BRANDES, A., SCHWEIZER, D. and SCHUBERT, I. (1998). Molecular-cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome-heterochromatin differentiation,

replication patterns and sequence localization. *Chromosome Res* **6**, 219-230.

**FUKUI, K. and KAKEDA, K.** (1990). Quantitative karyotyping of barley chromosomes by image analysis methods. *Genome* **33**, 450-458.

**FUKUI, K., KAMISUGI, Y. and SAKAI, F.** (1994). Physical mapping of 5S rDNA loci by direct-cloned biotylated probes in barley chromosomes. *Genome* **37**, 105-111.

**FULTON, T.M., CHUNWONGSE, J. and TANKSLEY, S.D.** (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* **13**, 207-209.

**FUNG, J.C., MARSHALL, W.F., DERNBURG, A., AGARD, D.A. and SEDAT, J.W.** (1998). Homologous chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* proceeds through multiple independent initiations. *J Cell Biol* **141**, 5-20.

**GALL, J.G. and PARDUE, M.F.** (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 378-383.

**GANGLOFF, S., DE MASSY, B., ARTHUR, L., ROTHSTEIN, R. and FABRE, F.** (1999). The essential role of yeast topoisomerase III in meiosis depends on recombination. *EMBO* **18**, 1701-1711.

**GASSER, S. M.** (1995). Coiling up chromosomes. *Curr Biol* **5**, 357-360.

**GASSER, S.M. and COCKELL, M.M.** (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* **279**, 1-16.

**GASSER, S.M. and LAEMMLI, U.K.** (1986). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J* **5**, 511-518.

**GEBHARD, D.S., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHNABEL, U., WALKEMEIER, B., UHRIG, H. and SALAMINI, F.** (1989). RFLP-analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet* **78**, 65-77.

**GENDREL, C.G., BOULET, A. and DUTREIX, M.** (2000). (CA/GT)(n) mikrosatellites affect homologous recombination during yeast meiosis. *Genes Dev* **14**, 1261-1268.

**GERLACH, W.L. and BEDBROOK J.R.** (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* **7**, 1869-1885.

**GERLACH, W.L. and PEACOCK, W.J.** (1980). Chromosomal location of highly repeated DNA sequences in wheat. *Heredity* **44**, 269-276.

**GILL, B.S.** (1997). Expanding genetic maps: reevaluation of the relationship between chiasmata and crossovers. In: Chromosomes Today. Edited by Henriques-Gil.

**GILL, B.S., FRIEBE, B. and ENDE, T.** (1991). Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). *Genome* **34**, 830-839.

- GILLIES, C.B.** (1991). Synaptonemal complex and chromosome structure. *Annu Rev Genet* **2**, 91-109.
- GILSON, E., MULLER, T., SOGO, J., LAROCHE, T. and GASSER, S.M.** (1994). RAP1 stimulates single- to double-strand association of yeast telomeric DNA: implications for telomere-telomere interactions. *Nucleic Acids Res* **24**, 5310-5320.
- GOLDSTEIN L., KO, C. and ERRICK, J.** (1977). Nuclear actin: an apparent association with condensed chromatin. *Cell Biol Int Rep* **1**, 511-515.
- GOLDSTEIN, L.S.** (1981). Kinetochore structure and its role in chromosome orientation during the first meiotic division in male *D. melanogaster*. *Cell* **25**, 591-602.
- GOLOMB, H. and BAHR, G.F.** (1970). Scanning electron microscopic observation of surface structure of isolated human chromosomes. *Science* **171**, 1024.
- GRANER, A., JAHOR, A., SIEDLER, H., SCHONDELMAIER, J., PILLEN, K., FISCHBECK, G., WENZEL, G. and HERRMANN, R.G.** (1991). Construction of an RFLP map of barley. *Theor Appl Genet* **83**, 250-256.
- GRIFFITH, (1928).** Nachweis der Nukleinsäure als genetischen Material durch Transformation bewiesen, *Pneumococcus*.
- HADLACZKY, G., WENT, M. and RINGERTZ, N.R.** (1986). Direct evidence for the non-random localization of mammalian chromosomes in the interphase nucleus. *Exp Cell Res* **167**, 1-15.
- HAECKEL, E.** (1866). *Generelle Morphologie*, Jena.
- HAECKER, V.** (1897). *Arch Mikr Anat* **49**, 35-91.
- HAGEMANN, S., SCHEER, B. and SCHWEIZER, D.** (1993). Repetitive sequences in the genome of *Anemone blanda*: identification of tandem arrays and of dispersed repeats. *Chromosoma* **102**, 312-324.
- HAN, F., KILIAN, A., CHEN, J.P., KUDRNA, D., STEFFENSON, B., YAMAMOTO, K., MATSUMOTO, T., SASAKI, T. and KLEINHOFS, A.** (1999). Sequence analysis of a rice BAC covering the syntenous barley Rpg1 region. *Genome* **42**, 1071-1076.
- HANIN, M., MENGISTE, T., BOGUCKI, A. and PASZKOWSKI, J.** (2000). Elevated levels of intrachromosomal homologous recombination in *Arabidopsis* overexpressing the MIM gene. *Plant J* **24**, 183-189.
- HANKS, S.K., GOLLIN, S.M., RAO, P.N., WRAY, W. and HITTELMAN, W.N.** (1983). Cell cycle-specific changes in the ultrastructural organization of prematurely condensed chromosomes. *Chromosoma* **88**, 333-342.
- HANSON, R.E., ZWICK, M.S., CHOI, S., ISLAM-FARIDI, M.N., MCKNIGHT, T.D., WING, R.A., PRICE, H.C. and STELLY, D.M.** (1995). Fluorescent *in situ* hybridization of a bacterial artificial chromosome. *Genome* **38**, 646-651.
- HARRISON, C.J., BRICH, M., ALLEN, T.D. and HARRIS, R.** (1982). High resolution SEM of



human metaphase chromosomes. *J Cell Sci* **56**, 409-422.

**HARRISON, C.J., JACK, E.M., ALLEN, T.D. and HARRIS, R.** (1985). Light and scanning electron microscopy of the same human metaphase chromosomes. *J Cell Sci* **77**, 143-153.

**HASENKAMPF, C.A.** (1991). *In situ* hybridization of Liliun wbole mount synaptonemal complex chromosomal preparations. *Biochem Histochem* **66**, 210-215.

**HASENKAMPF, C.A.** (1996). The synaptonemal complex-the chaperone of crossing over. *Chromosome Res* **4**, 133-140.

**HASENKAMPF, C.A., QURESHI, M. and RZEPczyk, A.** (1998). Meiotin-1, a meiosis-enriches protein present innormal leptotene chromosomes and lacking in precociously condensed leptotene chromsoomes. *Chromosome Res* **6**, 277-283.

**HASTIE, N.D. and ALLSHIRE, R.C.** (1989). Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet* **5**, 326-331.

**HAWLEY, R.S. and ARBEL, T.** (1993). Yeast genetics and the fall of the classical view of meiosis. *Cell* **72**, 301-303.

**HAWLEY, R.S. and THEURKAUF, W.E.** (1993). Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *Trends Genet* **9**, 310-317.

**HAWLEY, R.S., IRICK, H., ZITRON, A.E., HADDOX, D.A., LOHE, A., NEW, C., WHITLEY, M.D., ARBEL, T., JANG, J.K., MCKIM, K. and CHILDS, G.** (1993). There are two mechanisms of achiasmate segregation in *Drosophila*, one of which required heterochromatic homology. *Dev Genet* **13**, 440-467.

**HEIDENHEIN,** (1894). *Bot Zentralbibliothek* **17**, 57.

**HEITZ, E.** (1929). Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Berl dtsh bot Ges* **47**, 274-284.

**HEJNOWICZ, Z. and FELDMAN, L.J.** (2000). The consequences of a non-uniform tension across kinetochores: lessons from segregation of chromosoomes in the permanent translocation heterozygote *Oenothera*. *Chromosome Res* **8**, 165-172.

**HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., SCHAEFER, A. and NIENHUIS, J.** (1986). Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* **72**, 761-769.

**HENG, H.H., CHAMTERLAIN, J.W., SHI, X.M., SPYROPOULOS, B., TSUI, L.C. and MOENS, P.B.** (1996). Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal positions. *Proc Natl.Acad Sci USA* **93**, 2795-2800.

**HERNANDEZ-VERDUN, D. and GAUTIER, T.** (1994). The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**, 179-185.

**HERRMANN, R., WALTHER, P. and MULLER, M.** (1996). Immunogold labeling in scanning electron microscopy. *Histochem Cell Biol* **106**, 31-39.

- HERRMANN, R.G., MARTIN, R., BUSCH, W., WANNER, G. and HOHMANN, U.** (1996). Physical and topographical mapping among Triticeae chromosomes. *Symp Soc Exp Biol* **50**, 25-30.
- HERRMANN, R.G., MARTIN, R., BUSCH, W., WANNER, G. and HOHMANN, U.** (1996). Temporal Physical and topographical mapping among Triticeae chromosomes. *Symp Soc Exp Biol* **50**, 25-30.
- HERTWIG, O.** (1890). *Arch Mikro Anat* **36**, 1-138.
- HERTWIG, O. and KOELLIKER,** (1884). Befruchtung. *Jenaische Zeitschr* **18**, 276-318.
- HESLOP-HARRISON, J.S. and BENNETT, M.D.** (1984). Chromosome order – possible implications for development. *J Embryol Exp Morphol* **83**, 51-73.
- HESLOP-HARRISON, J.S., BRANDES, A., TAKETA, S., SCHMIDT, T., VERSHININ, A.V., ALKHIMOVA, E.G., KAMM, A., DOUDRICK, R.L., SCHWARZACHER, T., KATSIOTIS, A., KUBIS, S., KUMAR, A., PEARCE, S.R., FLAVELL, A.J. and HARRISON, G.E.** (1997). The chromosomal distributions of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* **100**, 197-204.
- HEUSER, F.** (1884). *Bot Zentralbibliothek* **17**, 27, 57, 117, 154.
- HIRANO, T. and MITCHISON, T.J.** (1991). Cell cycle control of higher-order chromatin assembly around naked DNA in vitro. *J Cell Biol* **115**, 1479-1489.
- HIRAOKA, Y., CHEN, H., SEDAT, J.W. and AGARD, D.A.** (1991). Three-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of spatial arrangement of chromosomes. *Acta Histochem Cytochem* **24**, 357-365.
- HIROCHIKA, H. and HIROCHIKA, R.** (1993). Ty1-copia group retrotransposons a ubiquitous components of plant genomes. *Jpn J Genet* **68**, 35-46.
- HOFMANN, K.A. and BUGGE, G.** (1908). Platinblau. *Berl Chem Ges* **41**, 312.
- HOHMANN, U., BADAIEVA, K., BUSCH, W., FRIEBE, B. and GILL, B.S.** (1996). Molecular cytogenetic analysis of *Agropyron* chromatin specifying resistance to barley yellow dwarf virus in wheat. *Genome* **39**, 336-347.
- HOHMANN, U., YANG, Y., DELANGE, R., ZOLLER, J. and HERRMANN, R.G.** (2001) In Vorbereitung.
- HOHMANN, U., ZOLLER, J., HERRMANN, R.G. and KAZMAN, M.E.** (1999). Physical mapping and molecular-cytogenetic analysis of substitutions and translocations involving chromosome 1D in synthetic hexaploid triticales. *Theor Appl Genet* **98**, 647-656.
- HOLLINGSWORTH, N.M., GOETSCH, L. and BYERS, B.** (1990). The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* **61**, 73-84.
- HOLMES, V.E. and COZZARELLI, N.R.** (2000). Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Ntrl Acad Sci USA* **97**, 1322-1324.

- HOLMQUIST, G.P. and DANCIS, B.** (1979). Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4566-4570.
- HONG, G., QIAN, Y., YU, S., HU, X., ZHU, J., TAO, W., LI, W., SU, C., ZHAO, H., QIU, L., YU, D., LIU, X., WU, B., ZHANG, X. and ZHAO, W.** (1997). A 120 kilobase resolution contig map of the rice genome. *DNA Seq* **6**, 319-335.
- HOROWITZ, R.A., AGARD, D.A., SEDAT, J.W. and WOODCOCK, C.L.** (1994). The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol* **125**, 1-10.
- HOUBEN, A., BELYAEV, N.D., TURNER, M.B. and SCHUBERT, I.** (1996). Differential immunostaining of plant chromosomes by antibodies recognizing acetylated H4 variants. *Chromosome Res* **4**, 191-194.
- HOUBEN, A., WAKO, T., FURUSHIMA-SHIMOGAWARA, R., PRESTING, G., KÜNZEL, G., SCHUBERT, I. and FUKUI, K.** (1999). The cell cycle dependent phosphorylation of histon H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J* **18**, 675-679.
- HOUBEN, A., WAKO, T., FURUSHIMA-SHINGAWARA, R., PRESTING, G., KANZEL, G., SCHUBERT, I. and FUKAI, K.** (1999). Short communication: the cell cycle dependent phosphorylation of histon H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *Plant J* **18**, 675-679.
- HOURCADE, D., DRESSLER, P. and WOLFSON, J.** (1973). The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**, 2296-2930.
- HSIAO, C., WANG, R.R.-C. and DEWEY, R.D.** (1986). Karyotype analysis and genome relationships of 22 diploid species in the tribe *Triticeae*. *Can J Genet Cytol* **28**, 109-120.
- HUISJER, P. and HENNING, W.** (1987). Ribosomal DNA-related sequences in a Y chromosomal lampbrush loop of *Drosophila hydei*. *Mol Gen Genet* **206**, 441-451.
- HUTCHINSON, J. and SEAL, A.G.** (1993). A sequential *in situ* hybridization and C-banding. *Heredity* **51**, 507-509.
- HYDE, B.B.** (1965). Ultrastructure in chromatin. *Prog Biophys Mol Biol* **15**, 129-148.
- IWANO, M., FUKUI, K. and TAKAICHI, S., ISOGAI, A.** (1997). A globular and fibrous structure in barley chromosomes revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res* **5**, 341-349.
- IWANO, M., FUKUI, K., TAKAICHI S. and ISOGAI, A.** (1991). Globular and fibrous structure in barley chromosomes revealed by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res* **5**, 341-349.
- JACKSON, S., FRIEBE, B., GILL, B.S. and JIANG, J.** (1997). Structure of the rye midget chromosome analyzed by FISH and C-banding. *Genome* **40**, 782-784.
- JACKSON, S., WANG, M.L., GOODMAN, H.M. and JIANG, J.** (1998). Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome* **41**, 566-572.

- JASENCAKOVA, Z., MEISTER, A. and SCHUBERT, I.** (2001). Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. *Chromosoma* **110**, 83-92.
- JEFFREYS, A.J., ROYLE, N.J., WILSON, V. and WONG, Z.** (1988). Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature* **332**, 278-281.
- JENSEN, J. and LINDE-LAURSEN, I.** (1992). Statistical evaluation of length measurements on barley chromosomes with a proposal for a new nomenclature for symbols and positions of cytological markers. *Hereditas* **117**, 51-59.
- JI, Y., DE DONATO, M., CRANE, C.F., RASKA, W.A., ISLAM-FARIDI, M.N., MCKNIGHT, T.D., PRICE, H.J. and STELLY, D.M.** (1999). New ribosomal RNA gene locations in *Gossypium hirsutum* mapped by meiotic FISH. *Chromosoma* **108**, 200-207.
- JIANG, J. and GILL, B.S.** (1993). Sequential chromosome banding and in situ hybridization analysis. *Genome* **36**, 792-295.
- JIANG, J., GILL, B.S., WANG, G.L., RONALD, P.C. and WARD, D.X.** (1995). Metaphase and interphase FISH mapping of the rice genome using bacterial artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4487-4491.
- JIANG, J., HULBERT, S.H., GILL, B.S. and WARD, D.C.** (1996). Interphase fluorescence *in situ* hybridization mapping: a physical mapping strategy for plant species with large complex genomes. *Mol Gen Genet* **252**, 497-502.
- JIANG, J., NASUDA, S., DONG, F., SCHERRER, C., WOO S., WING R., GILL B. and WARD, D.** (1996). A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14210-14213.
- JINKS-ROBERTSON, S. and PETES, T.D.** (1985). High-frequency meiotic gene conversion between repeated genes on nonhomologous chromosomes in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 3350-3354.
- JOHN, H.A., BIRNSTIEL, M.L. and JONES, K.W.** (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**, 582-587.
- JONES, J.D.G. and FLAVELL, R.B.** (1982). The mapping of highly-repetitive DNA families and their relationship to C-bands in chromosomes of *Secale cereale*. *Chromosoma* **86**, 595-612.
- KALISCH, W.E. and JACOB, H.J.** (1983). Scanning electron microscopy of surface spread polytene chromosomes. *Cytobios* **36**, 39-43.
- KALTSIKES, P.J.** (1971). The mitotic cycle in an amphiploid (*Triticale*) and its parental species. *Canad J Genet Cytol* **13**, 656-662.
- KAMASTRA, S.A., KUIPERS, A.J.G., DEJEU, J., RAMANNA, M.S. and JACOBSEN, E.** (1997). Physical localization of repetitive DNA sequences in *Alstromeria*: karyotyping of two species with species-specific and ribosomal DNA. *Genome* **40**, 652-658.

- KARPEN, G.H., LE, M.H. and LE, H.** (1996). Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science* **273**, 118-122.
- KAVANAGH, T.A., THANH, N.D., LAO, N.T., MCGRATH, N., PETER, S.O., HORVATH, E.M., DIX, P.J. and MEDGYESY, P.** (1999). Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* **152**, 1111-1122.
- KERESO, J., PRAZNOVSZKY, T., CSERPAN, I., FODOR, K., KATONA, R., CSONKA, E., FATYOL, K., HOLLO, G., SZELES, A., ROSS, A.R., SUMNER, A.T., SZALAY, A.A. and HADLACZKY, G.** (1996). *De novo* chromosome formations by large-scale amplification of the centromeric region of mouse chromosomes. *Chromosome Res* **4**, 226-239.
- KIANIAN, S.F., WU, B.C., FOX, S.L., RINES, H.W. and PHILLIPS, R.L.** (1997). Aneuploid marker assignment in hexaploid oat with the C genome as a reference for determining remnant homoeology. *Genome* **40**, 386-396.
- KIDWELL, M.G. and LISCH, D.** (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7704-7711.
- KLECKNER, N., PADMORE, R. and BISHOP, D.K.** (1991). Meiotic chromosome metabolism: one view. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**, 729-743.
- KLECKNER, N.** (1996). Meiosis: How could it work? *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8167-8174.
- KLEIN, P.E., KLEIN, R.R., CARTINHO, S.W., ULANCH, P.E., DONG, J., OBERT, J.A., MORISHIGE, D.T., SCHLUETER, S.D., CHILDS, K.L., ALE, M. and MULLET, J.E.** (2000). A high-throughput AFLP-based method for constructing integrated genetic and physical maps: progress toward a sorghum genome map. *Genome Res* **10**, 789-807.
- KLEIN, F., MAHR, P., GALOVA, M., BUONOMO, S.B., MICHAELIS, C., NAIRZ, K. and NASMYTH, K.** (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion formation of axial elements and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91-103.
- KNÄLMANN, M. and BURGER, E.-C.** (1977). Cytologische Lokalisation von 5S und 18/25S RNA Genorten in Mitose-Chromosomen in *Vicia faba*. *Chromosoma* **61**, 177-192.
- KOCH, J.E., KLOVRAA, S., PETERSEN, K.B., GREGERSEN, N. and BOLUND, L.** (1989). Oligonucleotide priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma (Berl.)* **98**, 259-265.
- KOCH, J.E., KLOVRAA, S., PETERSEN, K.B., GREGERSEN, N. and BOLUND, L.** (1989). Oligonucleotide priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* **98**, 259-265.
- KONIECZYN, A., VOYTAS, D.F., CUMMINGS, M.P. and AUSUBEL, F.M.** (1991). A superfamily of *Arabidopsis thaliana* retrotransposons. *Genetics* **127**, 801-809.
- KORNBERG, R.D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.

- KUBIS, S.E. HESLOP-HARRISON, J.S., DESEL, C. and SCHMIDT, T.** (1998). The genomic organization of non-LTR retrotransposons (LINEs) from three *Beta* species and five other antiosperms. *Plant Mol Biol* **36**, 821-831.
- KUMAR, A., PEARCE, S.R., MCLEAN, K., HARRISON, G., HESLOP-HARRISON, J.S., WAUGH, R. and FLAVELL, A.J.** (1997). The Ty1-copia group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* **100**, 205-217.
- KURATA, N., UMEHARA, Y., TANOUE, H. and SASAKI, T.** (1997). Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Mol Biol* **35**, 101-113.
- LAKHOTIA, S.C. and MISHRA, A.** (1980). Fluorescence patterns of heterochromatin in mitotic and polytene chromosomes in seven members of three sub-groups of the *melanogaster* species group of *Drosophila*. *Chromosoma* **1**, 137-150.
- LANGDON, T., SEAGO, C., MENDE, M., LEGGETT, M., THOMAS, H. FORSTER, J.W., JONES, R.N. and JENKINS, G.** (2000). Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* **156**, 313-325.
- LANGER-SAFER, P., WALDROP, A.A. and WARD, D.A.** (1982). Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6633-6637.
- LAVOIE, B.D., HOGAN, E. and KOSHLAND, D.** (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery, reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* **15**, 805-815.
- LE GAL, F., GALL, L. and DE SMEDT, V.** (1992). Changes in protein synthesis pattern during in vitro maturation of goat oocytes. *Mol Reprod Dev* **32**, 1-8.
- LE, H.T., ARMSTRON, K.C. and MIKI, B.** (1989). Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Mol Biol Rep* **7**, 150-158.
- LEE, J., MIYANO, T., DAI, Y., WOODING, P., YEN, T.J. and MOOR, R.M.** (2000). Specific regulation of CENP-E and kinetochores during meiosis I/meiosis II transition in pig oocytes. *Mol Reprod Dev* **56**, 51-62.
- LEHFER, H., BUSCH, W., MARTIN, R. and HERRMANN, R.G.** (1993). Localization of the B-hordein locus on barley chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma* **102**, 428-432.
- LEITCH, A.R. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1991). Physical mapping of the 18S-5,8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* **35**, 1013-1018.
- LEITCH, A.R., MOSGOLLER, W., SCHWARZACHER, T., BENNETT, M.D. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1990). Genomic *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids. *Cell Sci* **95**, 335-341.

- LEITCH, I.J. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1993). Physical mapping of four sites of 5S rDNA sequences and one site of the alpha-amylase-2 gene in barley *Hordeum vulgare*. *Genome* **36**, 517-523.
- LEITCH, I.J. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1993). Physical mapping of the 18S-5,8S-26S rDNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* **35**, 1013-1018.
- LESTOURGEON, W.M., FORER, A., YANG, Y.Z., BERTRAM, J.S. and PUSCH, H.P.** (1975). Contractile proteins. Major components of nuclear and chromosome non-histone proteins. *Biochim Biophys Acta* **379**, 529-552.
- LEWIN, B.** (1988). Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik. VCH Weinheim, 70-90.
- LEWIS, C.D. and LAEMMLI, U.K.** (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* **29**, 171.
- LICA, L.M., NARAYANSWAMI, S. and HAMKALO, B.A.** (1986). Mouse satelliten DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. *J Cell Biol* **103**, 1145-1151.
- LICHTEN, M. and GOLDMAN, A.S.** (1995). Meiotic recombination hotspots. *Annu Rev Genet* **29**, 423-444.
- LICHTER, P., LEDBETTER, S.A., LEDBETTER, D.H. and WARD, D.C.** (1994). Fluorescence *in situ* hybridization with Alu und L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc Natl. Acad Sci USA* **87**, 6634-6638.
- LIM, K.B., CHUNG, J.D., VAN KRONENBURG, B.C., RAMANNA, M.S., DE JONG, J.H. and VAN TUYL, J.M.** (2000). Introgression of *Lilium rubellum* Baker chromosomes into *L. longiflorum* Thunb.: a genome painting study of the F1 hybrid, BC1 and BC2 progenies. *Chromosome Res* **8**, 119-125.
- LIN, B.Y., PENG, S.F., CHEN, Y.J., CHEN, H.S. and KAO, C.F.** (1997). Physical mapping of RFLP markers on four chromosome arms in maize using terminal deficiencies. *Mol Gen Genet* **256**, 509-516.
- LINDE-LAURSEN, I., IBSEN, E. VON BOTHMER, R. and GIESE, H.** (1992). Physical location of active and inactive rRNA gene loci in *Hordeum marinum ssp. Gussoneanum* (4x) by *in situ* hybridization. *Genome* **35**, 1032-1036.
- LINTS, F.A. and JONES, R.N.** (1969). Effect of heterochromatin on the relationship between nuclear DNA content and chromosome volume. *Heredity* **24**, 147-151.
- LITTLEJOHN, G.M.** (1988). Salt tolerance of amphiploids and derivatives of crosses between wheat and wild *Thinopyrum* species. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium, held at Cambridge, England, 1988. Ed. T.E. Miller and R.M.D. Koebner. Inst Plant Sci Res, Cambridge Lab, Trumpington, England, 845-849.
- LOIDL, J.** (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium ursinum*: pericentric asynapsis and axial thickenings. *J Cell Sci* **3**, 439-448.

- LOIDL, J.** (1988). The effect of colchicine on synaptonemal complex formation in *Allium ursinum*. *Exp Cell Res* **178**, 93-97.
- LOIDL, J.** (1990). The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* **33**, 759-778.
- LOIDL et al.** (1994). Physical association between nonhomologous chromosomes precedes distributive disjunction in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 331-334.
- LOIDL, J. and SCHERTHAN, KABACK, D.B.** (1994). Physical association between nonhomologous chromosomes precedes distributive disjunction in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 331-334.
- LOIDL, J.** (1990). The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* **33**, 759-778.
- LOIDL, J., SCHERTHAN, H. and KABACK, D.B.** (1994). Physical association between nonhomologous chromosomes precedes distributive disjunction in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 331-334.
- LUKASZEKWKI, A.J. and GUSTAFSON, J.P.** (1993). Translocations and modifications of chromosomes in triticales x wheat hybrids. *Theor Appl Genet* **64**, 239-248.
- LUKASZEWSKI, A.** (1997). The development and meiotic behavior of asymmetrical isochromosomes in wheat. *Genetics* **145**, 1155-1160.
- MAHTANI, M.M. and WILLARD, H.F.** (1998). Physical and genetic mapping of the human X chromosome centromere: repression of recombination *Genome Res* **2**, 100-110.
- MANNING, J.E., HERSHEY, N.D., BROKER, T.R., PELLEGRINI, M., MITCHELL, H.K. and DAVIDSON, N.** (1975). A new method of *in situ* hybridization. *Chromosoma* **53**, 107-117.
- MANUELIDIS, L. and CHEN, T.L.** (1990). A unified model of eukaryotic chromosomes. *Cytometry* **11**, 849-858.
- MANZANERO, S., ARANA, P., PUERTAS, M.J. and HOUBEN, A.** (2000). The chromosomal distribution of phosphorylated histone H3 differs between plants and animals at meiosis. *Chromosoma* **109**, 308-317.
- MARDSEN, M.P.F. and LAEMMLI, U.K.** (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* **17**, 849.
- MARDSEN, M.P.F., and LAEMMLI, U.K.** (1979). Metaphase chromosome structure: evidence for a radial looping model. *Cell* **17**, 849-858.
- MARITNEZ-ZAPATER, L. J.M., ESTELLE, M.A. and SOMMERVILLE, C.R.** (1986). A highly repeated DNA sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **204**, 417-423.
- MARTIN, R., BUSCH, R., HERRMANN, R.G. and WANNER, G.** (1994). Efficient preparation of plant chromosomes for high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res* **2**, 411-415.



- MARTIN, R., BUSCH, W., HERRMANN, R.G. and WANNER, G. (1995). *In situ* hybridization and signal detection by high resolution scanning electron microscopy. In: Kew Chromosome Conference IV. PE.Barandham and M.D. Bennett, eds (London: HMSO), 159-166.
- MARTIN, R., BUSCH, W., HERRMANN, R.G. and WANNER, G. (1996). Changes in chromosomal ultrastructure during the cell cycle. *Chromosome Res* **4**, 288-294.
- MARTINEZ-PEREZ, E., SHAW, P., READER, S., ARAGON-ALCAIDE, L., MILLER, T. and MOORE, G. (1999). Homologous chromosome pairing in wheat. *J Cell Sci* **112**, 1761-1769.
- MCCOUCH, S.R., KOCHERT, G., YU, Z.H., WANG, Z.Y., KHUSH, G.S., COFFMAN, W.R. and TANKSLEY, S.D. (1988). Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* **76**, 815-829.
- MCEWEN, B.F., HSIEH, CH-E. MATTHEYSES, A.L. and RIEDER, C.L. (1998). A new look at kinetochore structure in vertebrate somatic cells using high-pressure freezing and freeze substitution. *Chromosoma* **107**, 366-375.
- MCINTYRE C.L. PEREIRA, S., MORAN, L.B. and APPELS, R. (1990). New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat. *Genome* **33**, 635-640.
- MCNEIL, D., LAGUDAH, E.,S., HOHMANN, U. and APPELS, R. (1994). Amplification of DNA sequences in wheat and its relatives: the Dgas44 and R350 families of repetitive sequences. *Genome* **37**, 320-327.
- MCNEIL, J.A., JOHNSON, C.V., CARTER, K.C., SINGER, R.H. and LAWRENCE J.B. (1991). Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by *in situ* hybridization. *Genet Anal Tech Appl* **8**, 41-58.
- MEDINA, F.J., CERDIDO, A. and FERNANDEZ-GOMEZ, M.E. (1995). Components of the nucleolar processing complex (Pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp Cell Res* **1**, 111-125.
- MEINKOTH J. and WAHL, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* **138**, 267-284.
- MELZ, G., SCHLEGEL, R. and THIELE, V. (1992). Genetic linkage map of rye *Secale cereale* L.. *Theor Appl Genet* **85**, 33-45.
- MENDEL, G. (1865). Versuche über Pflanzenhybriden. *Verh Nat Ver: in Flora*, Gd **89**, 364-403.
- MENGISTE, T., REVENKOVA, E., BECHTOLD, N. and PASZKOWSKI, J. (1999). An SMC-like protein is required for efficient homologous recombination in *Arabidopsis*. *EMBO* **18**, 4505-4512.
- MESTROVIC, N., PLOHL, M., MRAVINAC, B. and UGARKOVIC, D. (1998). Evolution of satellite DNAs from the genus *Palorus* - experimental evidence for the "library" hypothesis. *Mol Biol Evol* **15**, 1062-1068.

- MEUWISSEN, R.L., OFFENBERG, H.H., DIETRICH, A.J., RIESERWIJK, A., VAN IERSEL and HEYTING, C.** (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO* **11**, 5091-5100.
- MEYEROWITZ, E.N.** (1994). Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. In Meyerowitz EM, Somerville C., eds. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MEYEROWITZ, E.N. and PRUITT, R.E.** (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* **229**, 1214-1218.
- MEZZANOTTE, R., VANNI, R., FLORE, O., FERRUCCI, L. and SUMNER, A.T.** (1988). Ageing of fixed cytological preparations produces degradation of chromosomal DNA. *Cytogenet Cell Genet* **48**, 60-62.
- MIESCHER, F.** (1871). *Med-Chem Unters Lab Chem*. Tübingen **4**, Berlin.
- MILES, M.** (1997). Scanning probe microscopy. Probing the future. *Science* **277**, 1845-1847.
- MOENS, P.B. and PEARLMAN, R.E.** (1989). Satellite DNA I in chromatin loops of rat pachytene chromosomes and in spermatids. *Chromosoma* **98**, 287-294.
- MOENS, P.B. and PEARLMAN, R.E.** (1990). In situ DNA sequence mapping with surface-spread mouse pachytene chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **53**, 219-220.
- MOENS, P.B.**, (1969). The fine structure of meiotic chromosome pairing in the triploid, *Lilium tigrinum*. *J Cell Biol* **40**, 273-279.
- MOORE, G., GALE, M.D., KURATA, N. and FLAVELL, R.B.** (1993). Molecular analysis of small grain cereal genomes: current status and prospects. *Bio Technol* **11**, 584-588.
- MORGAN, T.H.** (1922). *Proc Ray Soc London B* **94**, 162-197.
- MORSE, R.H.** (2000). RAP, RAP, open up! New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends Genet* **2**, 51-53.
- MOSES, M.J.** (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 215-217.
- MOSES, M.J.** (1968). Synapitnema complex. *Annu Rev Genet* **2**, 363.
- MUKAI, Y., ENDO, T.R. and GILL, B.S.** (1990). Physical mapping of the 18S, 26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma* **100**, 71-78.
- MUKAI, Y., FIREBE, B. and GILL, B.S.** (1991). Physical mapping of the 5S rRNA multigene family in common wheat. *J Hered* **81**, 290-295.
- MUKAI, Y., FIREBE, B. and GILL, B.S.** (1992). Comparison of C-banding patterns and in situ hybridization sites using highly repetitive and total genomic rye DNA probes of 'Imperial' rye chromosomes added to 'Chinese Spring' wheat. *Jpn J Genet* **67**, 71-83.

- MUKAI, Y., FIREBE, B. and GILL, B.S. (1992). Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma* **100**, 71-78.
- MUKAI, Y., NAKAHARA, N. and YAMAMOTO, M. (1993). Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence *in situ* hybridization using total genomic and highly repeated DNA. *Genome* **36**, 489-494.
- MÜLLER, S., ROCCHI, M., FERGUSON-SMITH, M.A. and WIENBERG, J. (1997). Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet* **100**, 271-278.
- MULLER, and PAINTER, (1929). *Amer Naturalist* **63**, 193-200.
- MULLINGER, A.M. and JOHNSON, R.T. (1983). Units of chromosome replication and packing. *J Cell Sci* **64**, 179-193.
- MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A. (1986). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol* **155**, 335-350.
- MURATA, M. HESLOP-HARRISON J.S. and MOTOYOSHI, F. (1997). Physical mapping of the 5S ribosomal RNAs genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. *Plant J* **12**, 31-37.
- MURATA, M. and MOTOYOSHI, F. (1995). Floral chromosomes of *Arabidopsis thaliana* for detecting low-copy DNA-Sequences by fluorescence *in situ* hybridization. *Chromosoma* **104**, 39-43.
- MURATA, M., NAKATA, N. and YASUMURO Y. N. (1992). Origin and molecular structure of a midget chromosome in a common wheat carrying rye cytoplasm. *Chromosoma* **102**, 27-31.
- MURATA, M., OGURA, Y. and MOTOYOSHI, F. (1994). Centromeric repetitive sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Jpn J Genet* **69**, 361-370.
- NAGL, W. (1974). Role of heterochromatin in the control of cell cycle duration. *Nature* **249**, 53-54.
- NAKAJIMA, G. (1953). Genetical and cytological studies in the breeding of aphidiploid types between *Triticum* and *Secale*. *Jap J Breed* **2**, 178-184.
- NARAYANSWAMI, S. and HAMKALO, B.A. (1991). DNA sequence mapping using electron microscopy. *Genet Anal Tech Appl* **8**, 14-23.
- NEDERLOF, P.M., ROBINSON, D., ABUKNESHA, R., WIEGANT, J., HOPMAN, A.H.N., TANKE, H.J. and RAAP, A.K. (1989). Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* **10**, 20-27.
- NICKLAS, R.B. (1983). Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. *J Cell Biol* **97**, 542-548.
- NICKLAS, R.B., CAMPBELL, M.S., WARD, S.C. and GORBSKY, G.J. (1998). Tension-sensitive kinetochore phosphorylation *in vitro*. *J Cell Sci* **111**, 3189-3196.

- OCHS, R.L. and SMETANA, K. (1991). Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix. *Exp Cell Res* **197**, 183-190.
- OELMÜLLER, R., HERRMANN, R.G. and PAKRASI, H.B. (1996). Molecular studies of CtpA, the carboxyl-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center in higher plants. *J Biol Chem* **271**, 21848-21852.
- OLINS, D.E. and OLINS A.L. (1994). The replication band of ciliated protozoa. *Int Rev Cytol* **153**, 137-70.
- PACMORE, R. and EVANS, L.E. (1962). Karyotype analysis and chromosome designation for diploid *Agropyron elongatum* (Host.) P.B. *Can J Genet Cytol* **4**, 267-271.
- PRUITT, R.E. and MEYEROWITH, E.M. (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* **187**, 169-183.
- PANZERA, F., GIMÉNEZ-ABIÁN, M.I., LOPÉZ-SÁCZ, J.F. *et al.* (1996). Nucleolar organizer expression in *Allium cepa* L. chromosomes. *Chromosoma* **105**, 12-19.
- PARDUE M.L. and GALL, J.G. (1969). Molekular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2934-2938.
- PARDUE, M.L., DANILEVSKAYA, O.N., LOWENHAUPT, K., SLOT, F. and TRAVERSE, K.L. (1996). *Drosophila* telomeres: new views on chromosome evolution. *TIG* **12**, 48-52.
- PARISI, S., MCKAY, M.J., MOLNAR, M., THOMPSON, M.A., VAN DER SPEK, P.J., VAN DRUNEN-SCHOENMAKER, E., KANAAR, R., LEHMANN, E., HOEIJMAKERS, J.H. and KOHLI, J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad 21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* **19**, 3515-3528.
- PAULSON, J.R. and LAEMMLI, U.K. (1977). The structure of histon-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**, 817.
- PEACOCK, W.J., DENNIS, E.S. and GERLACH, W.L. (1982). DNA sequence changes and speciation. *Prog Clin Bioul Res* **96**, 123-142.
- PEACOCK, W.J., W.J., LOHE, A.R., GERLACH, W.L., DUNSMUIR, P., DENNIS, E.S. and APPELS, R. (1978). Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **42**, 1121-1135.
- PEARCE, S., HARRISON, G., HESLOP-HARRISON, J., FLAVELL, A. and KUMAR, A. (1997). Characterization and genomic organization of Ty1-copia group retrotransposons in rye *Secale cereale*. *Genome* **40**, 614-625.
- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., HESLOP-HARRISONK J.S., KUMAR, A. and FLAVELL, A.J. (1996a). The Ty1-copia group retrotransposons in *Vicia* species. Copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. *Mol Gen Genet* **250**, 305-315.
- PEARCE, S.R., PICH, U., HARRISON, G., FLAVELL, A.J., HESLOP-HARRISON, J.S., SCHUBERT, I. and KUMAR, A. (1996). The Ty1-copia group retrotransposons of *Allium cepa* are distributed

throughout the chromosomes but are enriched in the terminal heterochromatin. *Chromosome Res* **4**, 357-364.

**PEDERSEN, C. and LANGRIDGE P.** (1997). Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two colour FISH. *Genome* **40**, 589-593.

**PEDERSEN, C. and LINDE-LAURSEN, I.** (1994). Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromosome Res* **2**, 65-71.

**PEDERSEN, C., RASMUSSEN, S.K. and LINDE-LAURSEN, I.** (1996). Genome and chromosome identification in cultivated barley and related species of the *Triticeae* (Poaceae) by *in situ* hybridization with the GAA-satellite sequence. *Genome* **39**, 93-104.

**PELLING, C. and ALLEN, T.D.** (1993). Scanning electron microscopy of polytene chromosomes (I). *Chromosome Res* **1**, 221-237.

**PENDÁS, A.M., MORAN, P. and GARCÍA-VÁZQUEZ, E.** (1993). Multichromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Res* **1**, 63-67.

**PETERHANS, A., SCHLUPMANN, H., BASSE, C. and PASZKOWSKI, J.** (1990). Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO* **9**, 3437-3445.

**PETERSON, D.G., LAPITAN, N.L. and STACK, S.M.** (1999). Localization of single- and low-copy sequences on tomato synaptnemal complex spreads using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Genetics* **152**, 427-439.

**PICH, U. and SCHUBERT, I.** (1998). Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Res* **6**, 315-321.

**PICH, U., FUCHS, J. and SCHUBERT, I.** (1996). How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequence? *Chromosome Res* **4**, 207-213.

**PIENTA, K.F. and COFFEY, D.S.** (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci Suppl* **1**, 123-135.

**PIKE, K.S.** (1990). Review of barley yellow dwarf virus crop losses. In: World repectives on barley yellow dwarf. Ed. by P.A. Burnett. Intern. Maize and Wheat Improvement Center CIMMYT), Mexico, D.F., Mexico, 78-81.

**PILLEN, K., STEINRÜCKEN, G., WRICKE, G., HERRMANN, R.G. and JUNG, C.A.** (1992). A linkage map of sugarbeet *Beta vulgaris* L.. *Theor Appl Genet* **84**, 129-135.

**PINKEL, D., STRAUME, T. and GRAY, J.W.** (1986). Cytogenetic analysis using quantitative high sensitivity fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2934-2938.

**PISSAREV, R.** (1966). Different approaches in Triticale breeding. *Proc 2<sup>nd</sup> InternWheat Genet Symp Hered Suppl* **2**, 279-290.

**PLUTA, A.F., COOKE, C.A. and EARNSHAW, W.C.** (1990). Structure of the human centromere at metaphase. *TIBS* **15**, 181-185.

- PLUTA, A.F., MACKAY, A.M., AINSZTEIN, A.M. and EARNSHAW, W.C.** (1995). The centromere: hub of chromosomal activities. *Science* 270, 1591-1595.
- PRUITT, R.E. and MEYEROWITH, E.M.** (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J Mol Biol* 187, 169-183.
- RATTNER, J.B.** (1987). The organization of the mammalian kinetochore: a scanning electron microscopy study. *Chromosoma* 95, 175-181.
- RATTNER, J.B. and LIN, C.C.** (1985). Both helical coils and radial loops co-exist in metaphase chromosomes. *Cell* 42, 351.
- RAYBURN, A.L. and GILL, B.S.** (1985). Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered* 76, 78-81.
- RAYBURN, A.L. and GILL, B.S.** (1986). Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol Biol Rep* 4, 102-109.
- RAYBURN, A.L. and GILL, B.S.** (1986). Molecular identification of the D-genome chromosomes of wheat. *J Hered* 77, 253-255.
- REDDY, P. and APPELS, R.** (1989). A second locus for the 5S multigene family in *Secale L.*: sequence divergence in two lineages of the family. *Genome* 32, 456-467.
- REES, H., JENKINS, G. and SEAL, A.G.** (1984). Quantitative DNA variation and chromosome homology. *Symp Soc Exp Biol* 38, 321-331.
- REISS, B., KLEMM, M., KOSAK, H. and SCHELL, J.** (1996) RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3094-3098.
- RETTENBERGER, R. KLETT, C., ZECHNER, U. et al.** (1995). ZOO-FISH analysis: cat and human karyotypes closely resemble the putative ancestral mammalian karyotype. *Chromosome Res* 3, 479-486.
- REZNIK, N.A., YAMPOL, G.P., KISELEVA, E.V., KHRISTOLYUBOVA, N.B. and GRUZDEV, A.D.** (1991). Functional and structural units in the chromomere. *Genetica* 83, 293-299.
- RIED, T., BALDINI, A., RAND, T.C. and WARD, D.C.** (1992). Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1388-1392.
- RIGBY, P.W., DIECKMANN, M., RHODES, C. and BERG, P.** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-241.
- RIGGS, C. D.** (1997). Meiotin-1: the meiosis readiness factor? *Bioess* 19, 925-931.
- RÖDER, M.S., LAPITAN, N.L.V., SORRELLS, M.E. and TANKSLEY, S.D.** (1993). Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Mol Gen Genet* 238, 294-303.

- ROEDER, G.S.** (1995). Sex and the single cell: meiosis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10450-10456.
- ROTH, T.F. and PARCHMAN, L.G.** (1971). Alteration of meiotic chromosomal pairing and synaptonemal complexes by cycloheximide. *Chromosoma* **35**, 9-27.
- ROUX, W.** (1883). Über die Bedeutung der Kerteilungsfiguren. Leipzig. *Arch Pathol Anat* **114**, 113-153, und 246-290.
- RUNGER, D., RUNGER-BRANDLE, E., CHAPONNIER, C. and GABBIANI, G.** (1979). Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation. *Nature* **282**, 320-321.
- SAITOH, Y. and LAEMMLI, U.K.** (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* **76**, 609-622.
- SALEM, C., EL-ALFY, M. and LEBLOND, C.P.** (1998). Changes in the rate of RNA synthesis during the cell cycle. *Anat Rec* **250**, 6-12.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANCHEZ-MONGE, E.** (1956). Studies on 42-chromosome *Triticale*. *Ann Aula Dei* **4**, 191-207.
- SANMIGUEL, P., TIKONOV, A., JIN, Y-K. et al.** (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**, 765-767.
- SATO, S.** (1981). Cytological studies on the satellited chromosomes of *Allium cepa*. *Caryologia* **34**, 431-330.
- SCHAPER, A., RÖBLE, M., FORMANEK, H., JOVIN, T.M. and WANNER, G.** (2000). Complementary Visualization of mitotic barley chromatin by field-emission scanning electron microscopy and scanning force microscopy. *J Struct Biol* **129**, 17- 29.
- SCHERER, U.** (1987). Contributions of electron microscopic spreading preparations „Miller spreads“ to the analysis of chromosome structure. In: Henning W ed Structure and function of eukaryotic chromosomes. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 147-171.
- SCHERTHAN, H., BAHLER, J. and KOHLI, J.** (1994). Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* **127**, 273-285.
- SCHERTHAN, H., CREMER, T. ARMASON, U., WEIHER, H.-U., LIMA-DE-FAIA A. and FRÖNICKE, L.** (1994). Comparative chromosome painting discloses homoeologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* **6**, 342-347.
- SCHERTHAN, H., LOIDL, H., SCHUSTER, T. and SCHWEIZER, D.** (1992). Meiotic chromosome condensation and pairing in *Saccharomyces cerevisiae* studied by chromosome painting. *Chromosoma* **101**, 590-595.
- SCHERTHAN, H., WEICH, S., SCHWEGLER, H., HEYTING, C., HARLE, M. and CREMER, T.** (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man

are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109-1125.

**SCHERTHAN, H., WEICH, S., SCHWEGLER, H., HEYTING, C., HARLE, M. and CREMER, T.** (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109-1125.

**SCHEUERMANN, W. and KNÄLMANN, M.** (1984). Localization of ribosomal cistrons in metaphase chromosomes of *Vicia faba* L.. *Exp. Cell Res* **90**, 463-464.

**SCHLEGEL, R. and GILL, B.S.** (1984). N-banding analysis of rye chromosomes and the relationship between N-banded and C-banded heterochromatin. *Can J Genet Cytol* **26**, 765-769.

**SCHLEGEL, R., MELZ, G. and METTIN, D.** (1986). Rye cytology and genetics - current status. *Theor Appl Genet* **72**, 721-734.

**SCHMEKEL, K. and DANEHOLD, B.** (1995). The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends in Cell Biol* **5**, 239-242.

**SCHMID, T., CUNG, C., HESLOP-HARRISON, J.S. and KLEINE, M.** (1997). Detection of alien chromatin conferring resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) in cultivated beet (*Beta vulgaris* L.) using *in situ* hybridization. *Chromosome Res* **5**, 186-193.

**SCHMIDT, T., KUBIS, S. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1995). Analysis and chromosomal localization of retrotransposons in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): LINEs and Ty1-copia-like elements as major component of the genome. *Chromosome Res* **3**, 335-345.

**SCHMIT, A.C., ENDLE, M.C. and LAMBERT, A.M.** (1996). The perinuclear microtubule-organizing center and the synaptonemal complex of higher plants share a common antigen: its putative transfer and role in meiotic chromosomal ordering. *Chromosoma* **104**, 405-413.

**SCHMITH, A.V. and ROEDER, G.S.** (1997). The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *J Cell Biol* **136**, 957-967.

**SCHNABLE, P.S., HSIA, A.-P. and NIKOLAU, B.J.** (1998). Genetic recombination in plants. *Curr Op Plant Biol* **1**, 123-129.

**SCHNEIDER, A.** (1873). *Jahrbuch Oberhess Ges Naturheilk* **14**, Gießen.

**SCHMIDT, T., SCHWARZACHER, T. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1994). Physiological mapping of rRNA genes by fluorescent *in situ* hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genet* **88**, 629-636.

**SCHONDELMAIER, J., SCHMIDT, T., HESLOP-HARRISON, J.S. and JUNG, C.** (1997). Genetic and chromosomal localization of the 5S rDNA locus in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* **40**, 171-175.

**SCHUBER, I., RIEGER, R. and DOBEL, P.** (1984). G and/or C-Bands in plant chromosomes? *J Cell Sci* **71**, 111-120.



- SCHUBERT, I. and WOBUS, U.** (1995). *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* **92**, 143-148.
- SCHUBERT, I., SCHRIEVER-SCHWEMMER, G., WERNER, T. and ADLER, I.D.** (1992). Telomeric signals in robertsonian fusion and fission chromosomes: implications for the origin of pseudoaneuploidy. *Cytogenet Cell Genet* **59**, 6-9.
- SCHWACHA, A. and KLECKNER, N.** (1995). Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination. *Cell* **83**, 783-791.
- SCHWARZACHER, T. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1991). *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome* **34**, 317-323.
- SCHWARZACHER, T. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1994). Direct fluorochrome-labeled DNA probes for direct fluorescent *in situ* hybridization to chromosomes. *Methods Mol Biol* **28**, 167-176
- SCHWARZACHER T., LEITCH, A.R., BENNETT, M.D. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1989). *In situ* localization of parental in a wide hybrid. *Ann Bot (London)* **64**, 315-324.
- SCOLES, G.J. and KALTISIKES, P.J.** (1973). The cytology and cytogenetics of *Triticale*. Dep Verlag Paul Parey 1974
- SCUTT, C., KAMISUGI, Y., SAKAI, F. and GILMARTIN, P.** (1997). Laser isolation of plant sex chromosomes: studies on the DNA composition of X and Y sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Genome* **40**, 705-715.
- SEDAN, J. and MANUELIDIS, L.** (1978). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **42**, 331.
- SHARMA, H.C., GILL, B.S. and UYEMOTO, J.K.** (1984). High level of resistance in *Agropyron* species to barley dwarf and wheat streak mosaic virus. *Phytopathol Z* **119**, 143-147.
- SHAW, P. and MOORE, G.** (1998). Meiosis: vive la difference! *Curr Opin Plant Biol* **1**, 458-462.
- SHEN, D.L. and WU, M.** (1989). Transmission electron microscopic study of maize pachytene chromosome 6. *Stain Technol* **64**, 65-73.
- SHERMAN, J.D. and STACK, S.M.** (1995). Two-dimensional spreads of synaptonemal complexes from solanaceous plants. VI. High-resolution recombination nodule map for tomato *Lycopersicon esculentum*. *Genetics* **2**, 683-708.
- SIMOENS, C.R., GIELEN, J., VAN MANTAGU, M. and INZÉ, D.** (1988). Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **16**, 6753-6766.
- SIMPSON, R.T.** (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 bp of DNA and all the histones. *Biochemistry* **17**, 5524-5529.
- SMITH, M.F., ATHEY, B.D., WILLIAMS, S.P. and LANGMORE, J.P.** (1990). Radial density distribution of chromatin: evidence that chromatin fibers have solid centers. *J Cell Biol* **110**, 245-254.

- SOLARI, A.J. and DRESSER, M.E.** (1995). High-resolution cytological localization of the XhoI and EcoRI repeat sequences in the pachytene ZW bivalent of the chicken. *Chromosome Res* **3**, 87-93.
- SONG, J., DONG, F. and JIANG, J.** (2000). Construction of a bacterial artificial chromosome BAC library for potato molecular cytogenetics research. *Genome* **43**, 199-204.
- STACK, S.M.** (1984). Heterochromatin, the synaptonemal complex and crossing over. *J Cell Sci* **71**, 159-176.
- STACK, S.M. and ANDERSON, L.K.** (2000). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res* **9**, 175-198.
- STEINITZ-SEARS, L.M. and LEE-CHEN, S.** (1970). Cytogenetic studies in *Arabidopsis thaliana*. *Can J Genet Cytol* **12**, 217-223.
- STEPHAN, W.** (1989). Tandem-repetitive non-coding DNA: forms and forces. *Mol Biol Evol* **6**, 198-212.
- STERN, H. and HOTTA, Y.** (1984). Chromosome organization in the regulation of meiotic prophase. *Symp Soc Exp Biol* **38**, 161-175.
- STERN, H., WESTERGAARD, M. and VON WETTSTEIN, D.** (1975). Presynaptic events in meiocytes of *Lilium longiflorum* and their relation to crossing-over: a preselection hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 961-965.
- STRASBURGER, E.** (1875). Über die Zellbildung und Zelltheilung. *Jenaische Zeitschr* **11**.
- STRASBURGER, E.** (1888). Kern und Zellteilung; Befruchtung. *Histol Beitr* **1**.
- STRASBURGER, E.** (1894). *Ann of Botany* **8**, 281-316.
- STRICK, R. and LAEMMLI, U.K.** (1995). SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* **83**, 1137-1148.
- STRISSEL, P.L., ESPINOSA III, R., ROWLEY, Y.D. and SWIFT, H.** (1996). Scaffold attachment regions SARs in centromere-associated DNA. *Chromosoma* **105**, 122-133.
- STUBBLEFIELD, E. and WRAY, W.** (1971). Architecture of the Chinese hamster metaphase chromosome. *Chromosoma* **32**, 262.
- STURTEVANT, A.H.** (1913). *J Exp Zool* **14**, 43-59.
- SUDUPAK, M.A., BENNETZEN, J.L. and HULBERT, S.H.** (1993). Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the Rp1 region of maize. *Genetics* **1**, 119-125.
- SUJA, J.A., ANTONIO, C., DEBEC, A. and RUFAS, J.S.** (1999). Phosphorylated proteins are involved in sister-chromatid arm cohesion during meiosis I. *J Cell Sci* **112**, 2957-2969.
- SUMNER, A.T.** (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* **75**, 304-306.

- SUMNER, A.T.** (1986). Electron microscopy of the parameres formed by the centromeric heterochromatin of human chromosome 9 at pachytene. *Chromosoma* **94**, 199-204.
- SUMNER, A.T.** (1991). Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to telophase. *Chromosoma* **100**, 410-418.
- SUMNER, A.T.** (1994). Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. *Eur J Histochem* **38**, 91-109.
- SUMNER, A.T.** (1996). Problems in preparation of chromosomes for scanning electron microscopy to reveal morphology and to permit immunocytochemistry of sensitive antigens. *Scanning Microsc Suppl* **10**, 165-174.
- SUMNER, A.T. and ROSS, A.** (1989). Factors affecting preparation of chromosomes for scanning electron microscopy using osmium impregnation. *Scanning Microscopy Suppl* **3**, 87-99.
- SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JONSSON K., ARNA, T. and SCHULMAN, A.H.** (1996). Retrotransposon BARE-1 is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome. *Plant Mol Biol* **30**, 1321-1329.
- SYBENGA, J.** (1983). Rye chromosome nomenclature and homoeology relationships. *Z Pflanzenzüchtg* **90**, 297-304.
- SYM, M., ENGBRECHT, J.A. and ROEDER, G.S.** (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* **72**, 365-378.
- TANAKA, I., AKAHORI, Y., GOMI, K., SUZUKI, T. and UEDA, K.** (1999). A novel histone variant localized in the nucleoli of higher plant cells. *Chromosoma* **108**, 190-199.
- TANAKA, K.** (1980). Scanning electron microscopy of intracellular structures. *Int Rev Cytol* **68**, 97-125.
- TANG, R.S.** (1994). The return of copy-choice in DNA recombination. *Bioessays* **16**, 785-788.
- TANIGUCHI, T. and TAKAYAMA, S.** (1986). High-order structure of metaphase chromosomes: evidence for a multiple coiling model. *Chromosoma* **93**, 511-514.
- THOMA, F. and KOLLER, T.** (1977). Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell* **12**, 101-107.
- THOMA, F., KOLLER, T. and KLUG, A.** (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and all the salt-dependent substructures of chromatin. *J Cell Biol* **83**, 408-427.
- THOMAS, J.B. and KALTSIKES, P.J.** (1974). A possible effect of heterochromatin on chromosome pairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 2787-2790.
- THOMPSON E.A. and ROEDER, G.S.** (1994). Expression and DNA sequence of RED1, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast. *Mol Gen Genet* **218**, 293-301.

- THOMPSON, H., DEAN, C. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1997). Multiple repetitive DNA sequences in the paracentromeric regions of *Arabidopsis thaliana* L. *Chromosome Res* **4**, 238-246.
- TRASK, B., MASSA, H., KENWRICK, S. and GITSCHIER, J.** (1991). Mapping of human chromosome Xp28 by two color fluorescence *in situ* hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei. *Am J Hum Genet* **48**, 1-15.
- TRASK, B., PINKEL, D. and VAN DEN ENGH, G.** (1989). The proximity of DNA Sequences in interphase cell nuclei correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. *Genomics* **5**, 710-715.
- TRAUT, W.** (1991). Chromosomen: Klassische und molekulare Cytogenetik, Springer Verlag, Berlin.
- TRELLES-STICKEN, E., LOIDL, J. and SCHERTHAN, H.** (1999). Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J Cell Sci* **112**, 651-658.
- TURNER, B.M. and O'NEILL, L.P.** (1995). Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Cell Biol* **6**, 229-236.
- UHRIG, S., SCHUFFENHAUER, S., FAUTH, C., WIRTZ, A., DAUMER-HAAS, C., APACIK, C., COHEN, M., MULLER-NAVIA, J., CREMER, T., MURKEN, J. and SPEICHER, M.R.** (1999). Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* **65**, 448-462.
- UTSUMI, K.R.** (1982). Scanning Electron Microscopy of Giemsa-Stained Chromosomes and Surface-spread Chromosomes. *Chromosoma* **86**, 683-702.
- UTSUMI, K.R.** (1985). A Scanning Electron Microscopy Study of Chromosomes and Nuclei. *Scanning Electron Microscopy*. **III**, 1121-1132.
- VAN BENEDEN, E.** (1883). *Arch.de Biol* **4**.
- VAN HOOSER, A., GOODRICH, D.W., ALLIS, C.D., BRINKLEY, B.R. and MANCINI, M.A.** (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* **111**, 3497-3506.
- VANHOOSER, A.A., QUESPENSKI, I.I., GREGSON, H.C., STARR, D.A., YEN, T.J. and GOLDBERG, M.L.** (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci* **114**, 3529-3542.
- VERMAAK, D., STEINBACH, O.C., DOMITROV, S., RAPP, R.A.W. WOLFFE, A.P.** (1998). The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early *Xenopus* embryos. *Curr Biol* **8**, 533-536.
- VERSHININ, A.V. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1998). Comparative analysis of the nucleosomal structure of rye, wheat and their relatives. *Plant Mol Biol* **36**, 149-161.
- VERSHININ, A.V., ALKHIMOVA, E.G. and HESLOP-HARRISON, J.S.** (1996). Molecular diversification of tandemly organized DNA sequences and heterochromatic chromosome regions

in some *Triticeae* species. *Chromosome Res* **4**, 517-525.

VON WETTSTEIN, D. (1984). The synaptonemal complex and genetic segregation. *Symp Soc Exp Biol* **38**, 195-231.

VON WETTSTEIN, D., RASMUSSEN, S.W. and HOLM, P.B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* **18**, 331-413.

VOSA, C.G. (1970). The discrimination fluorescence patterns of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **31**, 446-451.

WALDEYER, W. (1988). Über Karyogenese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Archiv mikroskop Anat.* **32**, 111-122.

WALKER, P.R. and SIKORSKA, M. (1987). Chromatin structure. Evidence that the 30 nm fibre is a helicalcoil with 12 nucleosomes/turn. *J Biol Chem* **262**, 12223-12227.

WANG, J.C. (1982). The path of DNA in the nucleosome. *Cell* **29**, 724-726.

WANG, S., LAPITAN, N.L.V. and TSUCHIYA, T. (1991). Characterization of telomeres in *Hordeum vulgare* chromosomes by *in situ* hybridization. I. Normal diploid barley. *Can J Genet* **66**, 313-316.

WANG, Y., MINOSHIMA, S. and SHIMIZU, N. (1995). Cot-1 banding of human chromosomes using fluorescence *in situ* hybridization with Cy3 labeling. *Jpn J Hum Genet* **40**, 243-252.

WANNER, G., FORMANEK, H., MARTIN, R. and HERMANN, R.G. (1991). High resolution scanning electron microscopy of plant chromosomes. *Chromosoma* **100**, 103-109.

WANNER, G. and FORMANEK, H. (1995). Imaging of DNA in human and plant chromosomes by high-resolution scanning electron microscopy. *Chromosome Res* **3**, 368-374.

WANNER, G. and FORMANEK, H. (2000). A new chromosome model. *J Struct Biol* **132**, 147-161.

WATSON, J.D. and CRICK, F.H.C. (1953). A structure of deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.

WAUGH, R., MCLEAN, K., FLAVELL, A.J. *et al.* (1991). Genetic distribution of Bare-1-like tetrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol Gen Genet* **253**, 687-694.

WEINER, B.M. and KLECKNER, N. (1994). Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* **77**, 977-991.

WEINSTEIN, A. (1918). *Genetics* **3**, 135-173.

WEISMAN, (1885). Die Kontinuität des Keimplasma. Jena.

WERNER, J.E., KOTA, R.S., GILL, B.S. and ENDO, T.R. (1992). Distribution of telomeric repeats and their role in the healing of broken chromosome ends in wheat. *Genome* **35**, 844-848.

- WESSLER, S., BUREAU, T.E. and WHITE, S.E. (1995). LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolutions of plant genomes. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 814-821.
- WETZEL, J.B. and RAYBURN, A.L. (2000). Use of fluorescence genomic *in situ* hybridization GISH to detect the presence of alien chromatin in wheat lines differing in nuclear DNA content. *Cytometry* **41**, 36-40.
- WHITE, M.J.D. (1973). *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, New York.
- WHITE, S.E., HABERA, L.F. and WESSLER, S.R. (1994). Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a Role for copia-like elements in the evolution of the gene structure and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11792-11796.
- WHITKUS, R., DOEBLEY, J. and LEE, M. (1992). Comparative genome mapping of Sorghum and maize. *Genetics* **132**, 1119-1130.
- WHOO, S.S., JIANG, J., GILL, B.S., PATERSON, A.H. and WING, R.A. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosomes library of *Sorghum bicolor*. *Nucl Acid Res* **22**, 4922-4931.
- WICKY, C. and ROSE, A.M. (1996). The role of chromosome ends during meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **18**, 447-452.
- WIENBERG, J., JAUCH, A. STANYON, R. and CREMER, T. (1990). Molecular cytogenetics of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. *Genomics* **8**, 347-350.
- WIENBERG, J., JAUCH, A., STANYON, R. and CREMER, T. (1992). Homologies in human and *Manaca fuscata* chromosomes revealed by *in situ* suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. *Chromosoma* **101**, 265-270.
- WINIWARTER, DE H. (1900). *Arch.de Biol* **17**, 33-199.
- WOO, S.S., JIANG, J., GILL, B.S., PATERSON, A.H. and WING, R.A. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosomes library of *Sorghum bicolor*. *Nucl Acid Res* **22**, 4922-4931.
- WRIGHT, D.A., KE, N., SMALLE, J., HAUGE, B.M., GOODMAN, H.M. and VOYTAS, D.F. (1996). Multiple non-LTR retrotransposons in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **142**, 569-578.
- XU, J. and EARLE, E. (1996). High resolution mapping of 45 S, (5,8S, 18S and 25S rDNA gene loci in the tomato genome using a combination of karyotyping and FISH of pachytene chromosomes. *Chromosoma* **104**, 545-550.
- YAMAMOTO, A., WEST, R.R., MCINTOSH, J.R. and HIRAOKA, Y. (1999). A cytoplasmic deynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *J Cell Biol* **145**, 1233-1249.
- YAMAMOTO, K. and SASAKI, T. (1997). Large-scale EST sequencing in rice. *Plant Mol Biol* **35**, 135-144.

**YUNIS, J.J. and YSMINEH, W.G.** (1971). Heterochromatin, satellite, DNA, and cell function. *Science* **174**, 1200-1209.

**ZHU, T., SHI, L., FUNKE, R.P., GRESSHOFF, P.M. and KEIM, P.** (1996). Characterization and application of soybean YACs to molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* **252**, 483-488.

**ZHU, X.S., LINHOFF, M.W., LI, G., CHIN, K.C., MAITY, S.N. and TING, J.P.** (2000). Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promotor. *Mol Cell Biol* **20**, 6051-6061.

**ZICKLER, D. and KLECKNER, N.** (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* **32**, 619-697.

## 7. Publikationsliste

**HOHMANN, U., ZOLLER, J., HERRMANN, R.G. and KAZMAN, M.E.** (1999). Physical mapping and molecular-cytogenetic analysis of substitutions and translocations involving chromosome 1D in synthetic hexaploid triticale. *Theor Appl Genet* **98**, 647-656;

**ZOLLER, F.J., YANG, Y., HERRMANN, R.G. and HOHMANN, U.** (2001). Comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labelled *Arabidopsis* DNA. *Chromosome Res* **9**, 357-375.

**ZOLLER, F.J., HOHMANN, U., HERRMANN, R.G. and WANNER, G.** (2001). Scanning electron microscopy of meiosis of rye (*Secale cereale* L.). *Chromosome Research* (2001 eingereicht).

**ZOLLER, F.J. and WANNER, G.** (2001). Mitose- und Meiose-Zyklus. in Nultsch, Lehrbuch der Allgemeine Botanik, Thieme Verlag.

**ZOLLER, F.J., HERRMANN, R.G., WANNER, G. and HOHMANN, U.** (2002). Efficient preparation of meiotic plant chromosomes for high-resolution scanning electron microscopy. (In Vorbereitung für „Plant Mol Rep“).

**ZOLLER, F.J., HOHMANN, U., WANNER, G. and HERRMANN, R.G.** (2002). Dynamic of the centromere during mitosis and meiosis of rye (*Secale cereale*). (In Vorbereitung für Chromosoma).

## Tagungsbeiträge

**HOHMANN, U., ZOLLER, J., HERRMANN, R.G. and KAZMAN, M.E.** (1999). Characterization of group 1 recombinant chromosomes of wheat and triticale. 6. Cytogenetiker-Tagung in Gatersleben.

**ZOLLER, F.J., HOHMANN, U., HERRMANN, R.G. and WANNER, G.** (1999). Ultrastruktur meiotischer Chromosomen. 12. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen.

**ZOLLER, F.J., WANNER, G. and HERRMANN, R.G.** (2002). Hochauflösende Strukturanalyse mitotischer und meiotischer Chromosomen. 14. Tagung der Molekularbiologie der Pflanzen in Dabringhausen.



## 8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, unter der Leitung von Prof. Reinhold G. Herrmann. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Herrmann, der nicht nur die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen zur Durchführung dieser Arbeit geschaffen hat, sondern auch durch seine wissenschaftliche Leidenschaft und kritische Diskussionsbereitschaft einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit beitrug.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. G. Wanner, dem ich für die gute Zusammenarbeit, seine immerwährende Bereitschaft zur Diskussion in allen wissenschaftlichen Bereichen und freundliche Arbeitsatmosphäre danken möchte, die gleichfalls für den Erfolg dieser Arbeit wichtig waren.

Herrn Dr. habil. U. Hohmann danke ich für seine Einweisung in molekular-biologische Techniken, die gute Zusammenarbeit bei der Triticale-Analyse und seine wissenschaftliche Unterstützung bei der Erstellung der Publikationen.

Herrn Dr. habil. Formanek danke ich für die Bereitstellung des Platinblaus und seine immerwährende Diskussionsbereitschaft bei allen chemischen Fragen zur Konservierung und Kontrastierung des Chromatins.

Bei Herrn Dr. habil. W. Reuter möchte ich mich sowohl für die Bereitstellung der Rotalgen-Kultur, als auch für die Durchsicht dieses Manuskriptes bedanken.

Allen früheren und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Herrmann und der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wanner, insbesondere Anina, Claudia, Elli, Ingrid und Martina ein herzliches Dankeschön für ihre Mithilfe in unterschiedlichen Bereichen und das nette Arbeitsklima.

Meinem Sohn Christoph tausend Dank, da ohne seinem Verständnis und Unterstützung diese Arbeit nie entstanden wäre . . .

Dieses Forschungsprojekt wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgesellschaft, DFG, (Fond Ho1217).

## 9. LEBENS LAUF

### Angaben zur Person

Name:	Jutta Franziska Zoller
Wohnort:	Hönlestraße 37, 80689 München
Geburtstag:	09.11.1957
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig
Kinder:	ein Sohn, geboren 16. 3. 1987
Nationalität:	deutsch
Schulbildung:	1964 – 1968 Grundschule in München 1968 – 1974 Neusprachliches Gymnasium, München 1980 – 1984 München-Kolleg, München.
Berufsausbildung:	1974 – 1976 Dr. Kemper, Internist, München Berufsausbildung zur kaufmännisch-technischen Assistentin.
Berufstätigkeit:	1977 – 1980 Technische Mitarbeiterin der Firma Boehringer Ingelheim Diagnostika GmbH, Garching, im Bereich Forschung/Entwicklung und Sollwertermittlung von Diagnostika.
Hochschulreife:	1980 – 1984 Allgemeine Hochschulreife am Münchenkolleg (2. Bildungsweg).
Studium:	1984 – 1995 Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München Thema der Diplomarbeit: “Molekulare Analyse von Primaten, Scandentia, Carnivora und Rodentia mit Chromosomen-spezifischen DNA-Bibliotheken über die Methode der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung”.
	1996 – 2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Botanischen Institut der LMU München bei Prof. Dr.. R. G. Herrmann.