

Molekulare Zytogenetik

Wie FISHT man Pflanzenchromosomen?

DARYNA DECHYEVA, THOMAS SCHMIDT
INSTITUT FÜR BOTANIK, TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN

Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) können DNA-Sequenzen auf Chromosomen lokalisiert und ihre chromosomale Verteilung bestimmt werden. FISH ist eine wichtige Methode für die physikalische Genomkartierung und die Analyse der Organisation und Evolution von Pflanzenchromosomen.

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) enables the visual detection of DNA sequences along chromosomes and is an important tool for physical mapping of plant genomes and analyses of plant chromosome organization and evolution.

Die Komplexität pflanzlicher Genome

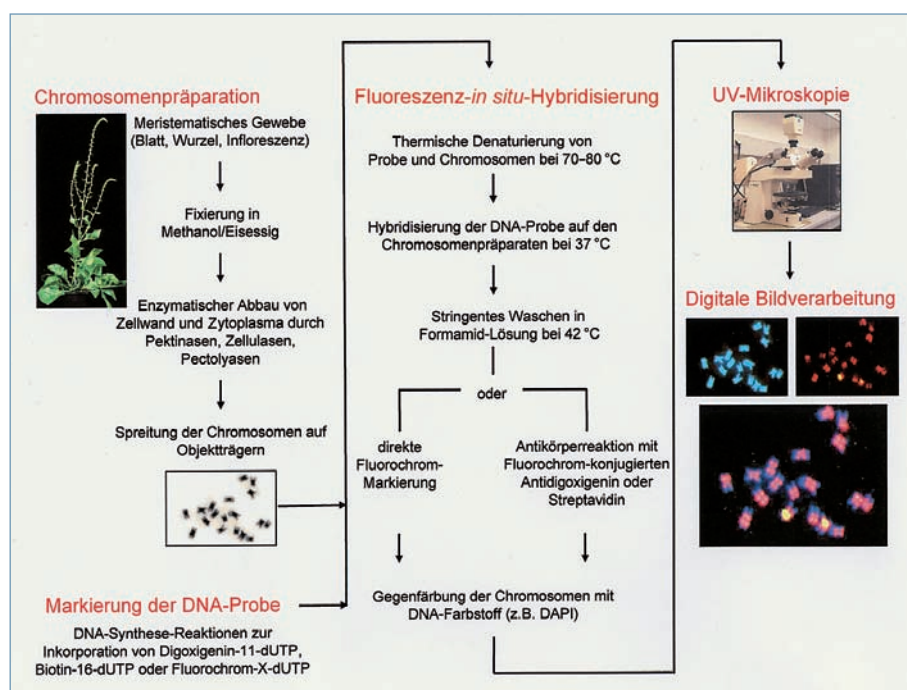
Die Menge der nukleären DNA variiert bei Pflanzen um mehrere Größenordnungen und reicht von 64 Mbp (Millionen Basenpaare) bei *Genlisea margaretae* über 157 Mbp bei *Arabidopsis thaliana* bis zu über 120.000 Mbp bei *Fritillaria assyriaca*, das damit zu den größten eukaryotischen Genomen überhaupt zählt. Der DNA-Gehalt des Kerngenoms ist dabei, mit Ausnahme von unterschiedlichen Ploidiestufen innerhalb einer Art, nicht mit der Chromosomenzahl korreliert. Auch die Genome vieler landwirtschaftlicher Nutzpflanzen können hinsichtlich der Größe enorme Unterschiede (Reis: 450 Mbp, Weizen: 16.000 Mbp) aufweisen. Die Annotation bisher sequenzierter pflanzlicher Genome wie Ackerschmalwand (*A. thaliana*), Reis (*Oryza sativa*), Pappel (*Populus trichocarpa*), Wein (*Vitis vinifera*) und Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) ergab, dass trotz weitläufiger Verwandtschaft die Anzahl der Gene (30.000–40.000) relativ ähnlich ist.

Die Unterschiede in der Genomgröße lassen sich auf repetitive DNA-Sequenzen zurückführen^[1]. Diese variieren in der Länge von 2 bp bis über 10.000 bp und erreichen Kopienzahlen von bis zu 10^6 . Zu ihnen zählen tandemartige DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten, Satelliten, ribosomale Gene) sowie disperse Sequenzen (Transposons, MITEs, LTR-Retrotransposons, LINEs, SINEs).

Eukaryotische Chromosomen besitzen auffällige strukturelle und funktionelle Domänen wie Zentromere, Telomere und *nucleolus organizer regions* (NORs). Das Chromatin kann unterschiedlich kondensiert sein; man differenziert zwischen stark kondensiertem Heterochromatin und dem weniger kondensierten Euchromatin. Die heterochromatischen Bereiche bestehen aus repetitiven Sequenzen, können aber auch Gene enthalten. Das genreiche Euchromatin befindet sich in Pflanzen oft an den Chromosomenenden.

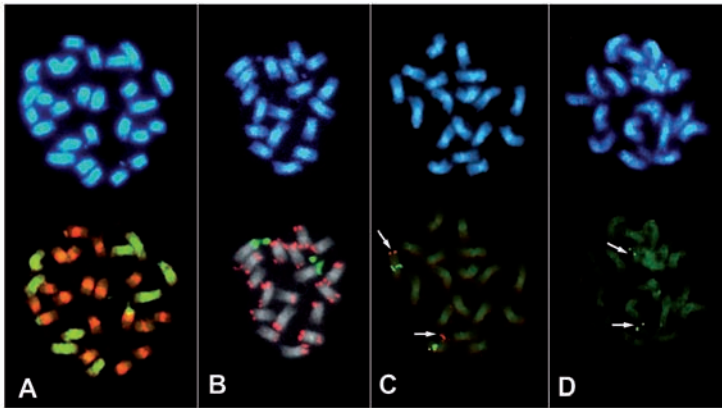
Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung – Methode und Auflösungsvermögen

Klassische zytogenetische Methoden, wie Färb- und Bänderungstechniken, können wichtige Informationen über pflanzliche Chromosomen liefern. Neue Möglichkeiten der Chromosomenanalyse ergeben sich durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH), mit der die chromosomale Organisation und Verteilung einer DNA-Sequenz direkt und in hoher Auflösung ermittelt werden kann^[2]. Sie ermöglicht die präzise Lokalisierung von repetitiven und unikalen DNA-Sonden in Interphasekernen sowie an mitotischen und meiotischen Chromosomen oder Chromatinfasern. Dabei bindet eine markierte DNA-Sonde an die komplementäre Sequenz der dena-

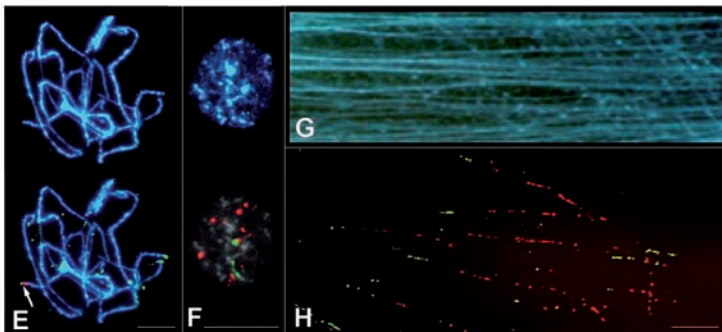


▲ Abb. 1: Ablauf einer FISH.

FISH an Pflanzenchromosomen mit zunehmender Sensitivität



FISH an Pflanzenchromosomen mit zunehmender Auflösung



◀ **Abb. 2:** FISH mit zunehmender Sensitivität (A–D) und zunehmender Auflösung (E–H) an Pflanzenchromosomen (blaue Fluoreszenz). A, Nachweis von 18 Zuckerrübenchromosomen (rot) und neun Wildartchromosomen (grün) durch GISH in einer Arthybride^[8]. B, Satelliten-DNA (rot) und 18S-5.8S-25S rRNA-Gen^[9]. C, Lage eines BACs (rot, Pfeile) und der 5S rRNA-Gen^[9] auf homologen Chromosomen. D, Lokalisation eines Gens (Pfeile)^[10]. E, Lage eines *large-insert*-Klones (rot, Pfeil) und der Telomere (grün) auf Pachytän-Chromosomen^[10]. F, Lage einer Satelliten-DNA (rot) und 18S-5.8S-25S rRNA-Gen^[9] in der Interphase^[9]. G, gestreckte Chromatinfasern nach DAPI-Färbung. H, Fiber-FISH der Telomere (grün) und einer subtelomerischen Stelliten-DNA (rot)^[9].

turierten DNA in den Chromosomen, die morphologisch erhalten bleiben. Als Sonde kann jede DNA-Sequenz (klonierte Sequenzen, PCR-Produkte, Oligonukleotide, genomische DNA) verwendet werden. Der Nachweis erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera und Bilderfassungssoftware (**Abb. 1**).

Mitotische Metaphasechromosomen bieten eine Auflösung von 2 Mbp. Meiotische Chromosomen im Pachytän, die aus unreifen Pollenzellen gewonnen werden, sind im Vergleich dazu 10–20-mal länger und ermöglichen eine Auflösung bis zu 50 kb. FISH an gestreckten Chromatinfasern ermöglicht die Kartierung von DNA-Sonden, die nur 1 kb auseinanderliegen und liefert Informationen über die physikalische Organisation auf molekularer Ebene^[3]. Eine besondere Form ist die Genomische *in situ*-Hybridisierung (GISH), bei der genomische DNA als Sonde eingesetzt wird, um in natürlichen oder in der Pflanzenzüchtung erzeugten Arthybriden die Eltern Genome zu differenzieren oder Introgressionen (Chromosomen oder Chromosomenfragmente) zu identifizieren.

Ein entscheidendes Kriterium für das Auflösungsvermögen der FISH ist die Qualität der Chromosomenpräparate. Da pflanzliche

Zellen von einer Zellwand begrenzt sind, ist die Präparation pflanzlicher Chromosomen im Gegensatz zur Präparation humaner oder tierischer Chromosomen schwieriger. Sie erfordert den Einsatz spezieller Enzyme wie Pektinasen, Zellulasen und Pectolyasen, die unter definierten Inkubationsbedingungen die Zellwand und das Zytoplasma abbauen, sodass die Chromosomen auf Objektträgern gespreitet werden können. Die Bedingungen der Chromosomenpräparation müssen für jede Art empirisch bestimmt werden, dies erfordert experimentelles Geschick und Erfahrung und ist nicht automatisierbar.

Anwendung der FISH in Plant Genomics

Durch ihren integrativen Charakter nimmt die FISH eine wichtige Position in der pflanzlichen Genomanalyse ein. Die FISH als Technologie der molekularen Zytogenetik befindet sich am Schnittpunkt verschiedener Arbeitsrichtungen und ermöglicht detaillierte Untersuchungen auf unterschiedlichen biologischen Strukturebenen. Nachstehend sind einige Einsatzmöglichkeiten der FISH aufgelistet:

- Orientierung von *large-insert*-Klones und chromosomale Verankerung von physikalischen Genomkarten,

- Chromosomale Lokalisierung von DNA-Sequenzen (Gene, Marker) sowie Detektierung von übertragenen Genen in transgenen Pflanzen,
- Lokalisierung von repetitiven Sequenzen und Untersuchung ihrer Struktur und Evolution,
- Zuordnung von genetischen Kopplungskarten zu Chromosomen und Bestimmung von Abständen zwischen genetisch kartierten Markern oder Genen,
- Bestimmung der Lage und Größe von Lücken in physikalischen Genomkarten und Validierung von Sequenz-Contigs im Rahmen von Genomsequenzierungsprojekten,
- Nachweis von Wildarten-Chromatin in Kreuzungen von Nutzpflanzen in der Pflanzenzüchtungsforschung,
- Analyse der Genomkonstitution für phylogenetische Studien sowie Chromosomen evolution,
- Optische Vermessung der Länge von repetitiven und unikalen DNA-Regionen auf gestreckten Chromatinfasern,
- Optische Kartierung von BACs, Cosmiden oder Phagen-Insertionen.

Einen Ausschnitt der Anwendungsmöglichkeiten der FISH zeigt **Abbildung 2**. Durch die Erhöhung der Nachweissensitivität (effiziente Markierungstechniken, Entwicklung neuer Fluorochrome, Verbesserungen in der Fluoreszenzmikroskopie) werden sich für die FISH auch zukünftig weitere Anwendungen ergeben.

BAC-FISH bei Zuckerrüben

Im nationalen Forschungsprogramm GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung wurden kürzlich drei Nachwuchsforschergruppen eingerichtet. Die Gruppe an der TU Dresden bearbeitet das Thema „BAC-FISH – Integration von genetischen Kopplungskarten mit Nutzpflanzenchromosomen durch hochauflösende Methoden der molekularen Zytogenetik“.

Genetische Kopplungskarten basieren auf der Schätzung der Rekombinationsfrequenz und liefern Informationen über die relative Lage von Markern oder Genen zueinander. Die Rekombinationsfrequenz ist aber über

die Länge des Chromosoms nicht konstant und wird von verschiedenen biologischen Faktoren beeinflusst. Daraus können sich Diskrepanzen zwischen der tatsächlichen chromosomalen Position einer DNA-Sequenz und ihrer Lage in der genetischen Kopplungskarte sowie Schwierigkeiten bei der Abschätzung des physikalischen Abstands zwischen definierten DNA-Sequenzen ergeben.

Das Ziel unserer Arbeiten ist die Integration genetischer und physikalischer Karten von Nutzpflanzengenomen am Beispiel von *Beta vulgaris*, von der unterschiedliche Zuchtformen wie Zuckerrübe, Futterrübe, Rote Bete, Blattmangold oder Stielmangold existieren. Die Zuckerrübe ist diploid ($2n = 18$), hat eine Genomgröße von 758 Mbp^[4] mit 63 Prozent repetitiver DNA^[5]. Ihre genetische Karte umfasst 700 cM (Centimorgan), verteilt auf neun Kopplungsgruppen^[6].

Kopplungskarten können allerdings nur dann terminal abgeschlossen werden, wenn die „unkartierbaren“ Telomere in die Karte integriert werden. Da sich in den Endbereichen der Chromosomen oft agronomisch wichtige Gene befinden, werden durch BAC-FISH die chromosomalen Enden jeder Kopplungsgruppe bestimmt und die Distanz bis zum Chromosomenende gemessen. Gleichzeitig können dadurch genetische Kopplungsgruppen realen Chromosomen zugeordnet werden.

Die geplante Einführung des *chromosome painting*, bei der einzelne Chromosomen mit einem Pool chromosomenspezifischer Sonden markiert werden^[7], wird neue Möglichkeiten für die vergleichende Genomanalyse und Evolution in der Gattung *Beta* eröffnen.

Danksagung

Das Projekt BAC-FISH wird von BMBF finanziert (GABI START 0315070). ■

Literatur

- [1] Heslop-Harrison, J. S., Schmidt, T. (2007): Plant Nuclear Genome. In: Encyclopedia of Life Science. John Wiley and Sons Ltd, UK, doi: 10.1002/9780470015902.a0002014.
- [2] Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S. (2000): Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.
- [3] De Jong, H., Franz, P., Zabel, P. (1999): High resolution FISH in plants: techniques and applications. *Trends in Plant Science* 4: 258–263.
- [4] Arumuganathan, K., Earle, E. D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208–218.
- [5] Flavell, R. B., Bennett, M. D., Smith, J. B., Smith, D. B. (1974): Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem. Genet.* 12: 257–269.
- [6] Schneider, K., Kulosa, D., Soerensen, T. R., Möhring, S., Heine, M., Durstewitz, G., Polley, A., Weber, E., Jamsari, Lein, J., Hohmann, U., Tahiro, E., Weisshaar, B., Schulz, B., Koch, G., Jung, C., Ganai, M. (2007): Analysis of DNA polymorphisms in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and development of an SNP-based map of expressed genes. *Theor. Appl. Genet.* 115: 601–615.
- [7] Lysak, M. A., Pecinka, A., Schubert, I. (2003): Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species. *Chromosome Res.* 11: 195–204.
- [8] Desel, C., Jansen, R., Dedong, G., Schmidt, T. (2002): Painting of parental chromatin in *Beta* hybrids by multi-colour fluorescent *in situ* hybridization. *Ann. Bot.* 89: 171–181.
- [9] Dechyeva, D., Schmidt, T. (2006): Molecular organization of terminal repetitive DNA in *Beta* species. *Chromosome Res.* 14: 881–897.
- [10] Desel, C., Jung, C., Cai, D., Kleine, M., Schmidt, T. (2001): High-resolution mapping of YACs and the single-copy gene Hs1(pro-1) on *Beta vulgaris* chromosomes by multi-colour fluorescence *in situ* hybridization. *Plant Mol. Biol.* 45: 113–122.

Korrespondenzadresse:

Dr. Daryna Dechyeva
Prof. Dr. Thomas Schmidt
Institut für Botanik
Technische Universität Dresden
Zellescher Weg 20b
D-01062 Dresden
Tel.: 0351-463-39589
Fax: 0351-463-39590
daryna.dechyeva@tu-dresden.de

AUTOREN



Daryna Dechyeva

Jahrgang 1972. 1989–1995 Biochemie- und Pflanzenphysiologiestudium an der Taras Shevchenko Universität Kiew, Ukraine. 2006 Promotion und Postdoc an der TU Dresden. Seit 2007 Leiterin des Projekts GABI START BAC-FISH an der TU Dresden.



Thomas Schmidt

Jahrgang 1963. 1984–1989 Studium der Biologie an der MLU Halle-Wittenberg. 1991 Promotion an der MLU Halle-Wittenberg. 1992–1996 Gastwissenschaftler am Department of Cell Biology des John Innes Centre for Plant Science Research Norwich (England). 1996–1999 Postdoc an der CAU Kiel. 1999 Habilitation, Bio-Future-Preis des BMBF. Seit 2003 Professor für Zell- und Molekularbiologie der Pflanzen an der TU Dresden.