

**Die B Chromosomen der Ukelei (*Alburnus alburnus*)**  
**Zytogenetische und molekulare Analysen**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Christian G. Ziegler**  
aus  
Weil am Rhein

Würzburg im September 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. M. Schmid

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	<i>Alburnus alburnus</i> aus der Familie der Cypriniden	1
1.2.	Karyotyp und Chromosomenevolution bei Cypriniden	2
1.3.	B Chromosomen	5
1.3.1.	Besonderheiten und Unterscheidungskriterien	5
1.3.2.	Vorkommen	5
1.3.3.	Struktur und Aufbau	6
1.3.4.	Mögliche Effekte	7
1.3.5.	Vererbung	8
1.3.6.	Bedeutung	9
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	10
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1.	Zytogenetische Charakterisierung der A und B Chromosomen	12
2.1.1.	Anzahl und Herkunft der untersuchten Fische	12
2.1.1.1.	Populationen von <i>Alburnus alburnus</i>	12
2.1.1.2.	Population von <i>Rutilus rutilus</i>	12
2.1.2.	Präparation der Gewebe	13
2.1.2.1.	Blut	13
2.1.2.2.	DNA	13
2.1.3.	Herstellung von Chromosomenpräparaten	14
2.1.3.1.	Mitotische Chromosomen	14
2.1.3.2.	Meiotische Chromosomen	14
2.1.4.	Chromosomenfärbemethoden	15
2.1.4.1.	Giemsafärbung	15
2.1.4.2.	C-Bänderung	15
2.1.4.3.	Silberfärbung	16
2.1.4.4.	Zellkulturchromosomen und die BrdU-Replikationsbänderung	16
	Kultur von Zellen der Schwimmblase	16
	Anlegen einer Primärkultur von Zellen	17
	Einfrieren von Zellen	17
	Auftauen von Zellen	18
	Abbruch und Fixierung der Fibroblasten	18

	BrdU-Replikationsbänderung	19
	FPG (Fluoreszenz plus Giemsa )-Färbung	19
2.1.4.5.	Q-Banden-Färbung	20
2.1.4.6.	Distamycin A/Mithramycin-Färbung	20
2.1.4.7.	Distamycin A/DAPI-Färbung	21
2.1.4.8.	Färbung der Chromosomen mit Hoechst 33258 und Chromomycin A <sub>3</sub>	22
2.1.5.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	22
2.1.5.1.	Hybridisierung mit der Vertebraten-Telomerasequenz	22
	Probe und Tailing	23
	Spot-Test	24
	Vorbehandlung der Präparate zur in situ Hybridisierung	25
	Denaturierung der Chromosomen	25
	Hybridisierung mit der Telomerprobe	26
	Probenspezifische Waschschrirte für die Telomerprobe	26
	Fluoreszenznachweis mit Avidin-FITC	27
2.1.5.2.	Hybridisierung mit der 18S/28S und 5S rDNA-Probe	28
	Nick-Translation der Sonden-DNA	28
	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese	29
	Sephadex G 50-Säule	29
	Proben-spezifische Waschung	30
2.1.6.	Mikroskopische Auswertung	30
2.2.	DNA-Gehaltsmessung über die Durchflußzytrophotometrie	31
2.3.	Molekulare Charakterisierung der B Chromosomen	32
2.3.1.	Extraktion Genomischer DNA	32
2.3.1.1.	Methode	32
2.3.1.2.	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	33
2.3.1.3.	Bestimmung der DNA-Konzentration aus dem Agarosegel	33
2.3.2.	Herstellung der DNA-Sonde	33
2.3.2.1.	Laser-Mikrosezierung	33
2.3.2.2.	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	34
	Allgemeines zur Methode	34
	Verdau und Ligation	35
	PCR	36
	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	37
	Bandeneluierung und Reamplifizierung	37
2.3.3.	Klonierung rekombinater DNA in E. coli	38
2.3.3.1.	Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation	38

2.3.3.2.	Hitzetransformation	39
2.3.3.3.	Plasmid-Präparation	39
2.3.4.	Sequenzierung	39
2.3.5.	FISH mit der „B-Sonde“	40
2.3.6.	Southern blot-Analysen	40
2.3.6.1.	Allgemeines	40
2.3.6.2.	Radioaktive Markierung der DNA-Sonde	41
2.3.7.	Flossentest	42
	Chemikalienanhang	44
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1.	Zytogenetische Untersuchungen	46
3.1.1.	Häufigkeit der B Chromosomen in den untersuchten Populationen	46
3.1.2.	Chromosomenbänderungen und FISH-Analysen	47
3.2.	Durchflußzytometrische DNA-Analysen	57
3.3.	Molekulare Untersuchungen	63
3.3.1.	Lasermikromanipulation	63
3.3.2.	AFLP-Analysen	65
3.3.3.	DNA-Sequenzierung	69
3.3.4.	FISH mit der B Chromosomen-Probe an mitotischen Chromosomen	70
3.3.5.	FISH mit der B Chromosomen-Probe an meiotischen Chromosomen	72
3.3.6.	Southern blot-Untersuchungen	74
3.3.6.1.	B Chromosomen-Spezifität der DNA-Sequenz	74
3.3.6.2.	Überprüfung einer interspezifischen Hybridisierung	75
3.3.6.3.	Überprüfung einer möglichen Transposonintegration	76
3.3.7.	Minimal-invasiver Flossentest	77
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1.	Karyotypevolution bei Cypriniden	78
4.2.	Karyotypstruktur der Spezies <i>Alburnus alburnus</i>	79
4.3.	Meiotische Chromosomen	80
4.4.	Populationsstudien	81
4.4.1.	Studien bei <i>Alburnus alburnus</i>	81
4.4.2.	Ergebnisse an anderen Spezies	82
4.4.3.	Modelle zur B Chromosomendynamik	85
4.5.	Zytogenetische Charakterisierung der B Chromosomen	86

4.6	Genomgröße und DNA-Gehalt bei Cypriniden	90
4.7.	Molekulare Besonderheiten der B Chromosomen	91
4.8.	Evolution und möglicher Ursprung der B Chromosomen	95
4.8.1.	Informationen aus anderen Spezies	95
4.8.2.	Spekulationen über die B Chromosomen von <i>Alburnus alburnus</i>	97
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>100</b>
5.1.	Zusammenfassung	100
5.2.	Ausblick	101
<b>6.</b>	<b>Summary and perspectives</b>	<b>103</b>
6.1.	summary	103
6.2	perspectives	104
<b>7.</b>	<b>Literaturangaben</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>119</b>
<b>9.</b>	<b>Mein besonderer Dank gilt</b>	<b>120</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>121</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>122</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. *Alburnus alburnus* aus der Familie der Cypriniden

Mit über der Hälfte der etwa 50.000 lebenden Vertebratenspezies stellen Fische eine sehr große, polyphyletische Gruppe dar. Sie sind die artenreichste Überklasse der Vertebraten und umfassen die vier Klassen Placodermi, Chondrichthyes, Acanthodii und Osteichthyes. Die reichste Entfaltung haben die Teleostei aufzuweisen. Cypriniden oder Weißfische sind mit ihren über 2000 Arten eine der größten und erfolgreichsten Familie primärer Süßwasserfische. Tiere aus der Unterfamilie Leuciscinae, inklusive der Gattung *Alburnus* sind ferner ein substantieller Bestandteil der europäischen Ichthyofauna (Banarescu & Coad, 1991). Neben ihrem Entstehungszentrum in Südostasien und Indien sind zur Zeit über 100 Arten in Zentral- und Südeuropa mit relativ bekannten Ursprüngen und zoologischen Bezügen beschrieben (Banarescu, 1990).

Der Ukelei, *Alburnus alburnus*/Lineaus, 1758; nach Fiedler (1991), ist mit seinen bis zu 25 cm Länge einer der häufigsten und weitverbreiteten Beutfische (Abb. 1). Sein Ausdehnungsraum liegt nördlich der Alpen, von den Pyrenäen bis zum Ural und der Wolga, auch findet man ihn in brackigen Strandgewässern im Schwarzen Meer und der östlichen Ostsee. Als gesellige Freiwasserfische sind Ukeleis in fast allen stehenden oder langsam fließenden Gewässern an der Oberfläche bis in Ufernähe anzutreffen. Aufgrund des stark silberglänzenden, schlanken und seitlich abgeplatteten Körpers ist er gut von anderen Weißfischen zu unterscheiden.



**Abb. 1:** *Alburnus alburnus*.

### *Systematischer Überblick*

Unterstamm:	Vertebrata (Wirbeltiere)
Überklasse:	Pisces (Fische)
Klasse:	Osteichthyes (Knochenfische)
Unterklasse:	Acanthopterygii (Strahlenflosser)
Überordnung:	Teleostei (Echte Knochenfische)
Ordnung:	Cypriniformes (Karpfenfische)
Familie:	Cyprinidae (Weißfische)
Unterfamilie:	Leuciscinae (eigentliche Weißfische)
Gattung:	<i>Alburnus</i>
Art:	<i>Alburnus alburnus</i> (Laube oder Ukelei)

## **1.2. Karyotyp und Chromosomenevolution bei Cypriniden**

Von den mindestens 25.585 verschiedenen Fischarten (universelle Fisch-Datenbank) wurden komplette Karyotypen von ungefähr 2800 Fischarten erstellt, davon besitzen etwa 40 Spezies (1.5%) zusätzliche Chromosomen (Klinkhardt et al., 1995). Cypriniden gehören zu einer überaus gut untersuchten Gruppe: die grundsätzlichen karyologischen Charakteristika, z.B. die Chromosomenzahl ( $2n$ ) und die tatsächliche Zahl der Chromosomenarme (nombre fundamental, NF) sind von über 450 Arten, Unterarten und anderen Formen beschrieben worden (P. Rab, Fish Chromosome Database, unpublished) und dies trotz der bekannten Schwierigkeiten bei der Etablierung von Fisch-Zellkulturen und der Präparation guter Metaphasechromosomen. Durch Verabreichung geringer Dosen an Colchizin vor der eigentlichen Gewebepreparation und mittels einfacher Quetschpräparate konnten allerdings schon früh die Chromosomen von Fischen identifiziert werden. So begannen Chromosomenstudien an Fischen bereits 1891 als Böhm die Chromosomenzahl von *Salmo trutta fario* untersuchte (Post, 1965).

Mit dem Sammeln von Daten über Cypriniden-Chromosomen wurde in Europa in den frühen 50er Jahren begonnen. Wichtige Informationen, welche die diploide Chromosomenzahl, die Karyotypmorphologie sowie deren Variation innerhalb der verschiedenen Spezies betreffen, aber auch überzählige oder B Chromosomen, diploid-tetraploid-Zusammenhänge, verschiedene Chromosomenbänderungs-Techniken, die Entdeckung von gyno- und/oder hybridogenetischen Systemen in einigen Arten, seien hier erwähnt. Fische aus der Familie der Cypriniden sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein von relativ kleinen Chromosomen.

Das durchschnittliche Chromosom in der Mitte der Metaphase ist nur etwa 1,5-3  $\mu\text{m}$  lang, mit einer Zentromerposition von exakt median bis fast komplett terminal. Chromosomen-Bänderungstechniken kamen bei europäischen Cypriniden bisher nur bei wenigen Untersuchungen zur Anwendung. Konkrete strukturelle Q-, G-, und R-Bandenmuster wurden bislang nur für den europäischen Aal, *Anguilla anguilla* beschrieben (Wiberg, 1983; Medrano et al., 1988). Die Schwierigkeit bei der Darstellung derartiger Bänder in Fischen liegt in der Tatsache begründet, dass die Genome kaltblütiger Vertebraten entweder keine oder nur wenige GC-reiche Isochoren besitzen (Medrano et al., 1988). Auch bei *Rutilus rutilus* und *Scardinius erythrophthalmus* (Hellmer et al., 1991) konnten wegen des Fehlens derartiger Chromozentren keine differentiellen Bänderungen durch die Fluoreszenzfarbstoffe Quinacrin mustard und DAPI erzielt werden. Auch mittels C-Bänderung waren nur wenige Chromosomenpaare zweifelsfrei unterscheidbar. Allerdings konnten durch die sehr detaillierte Replikations-Bänderungs-Technik mittels BrdU-Substitution früh und spät replizierende Chromosomenbanden dargestellt werden (Hellmer et al., 1991). Der Großteil weiterer Analysen bei Fischchromosomen bezog sich hauptsächlich auf die Anzahl und Lokalisierung der Nukleolus Organisator Regionen (NOR) mittels der Silberfärbung und durch die Mithramycin-Fluoreszenz (Schmid & Guttenbach, 1988). Das Vorhandensein von überzähligen oder B Chromosomen konnte in einigen Populationen von *Alburnus alburnus* (Hafez et al., 1978; Vujosevic et al., 1983) und *Rutilus rutilus* (Hafez et al., 1978) gezeigt werden. Die damals entdeckten überzähligen Elemente dieser Spezies sind große metazentrische Chromosomen mit fast ausschließlich heterochromatischer Natur, was mittels C-Bänderung demonstriert werden konnte.

Die Gattung *Alburnus* zeichnet sich durch eine diploide Chromosomenzahl von  $2n=50$  (52) und einem Karyotyp, mit 6-8 Paaren metazentrischer (m), 12-14 Paaren submetazentrischer (sm) und 2-4 Paaren subtelozentrischer/akrozentrischer (st/a) Chromosomen aus. Nukleolus Organisator Regionen (NOR) sind, falls bereits beschrieben, auf einem der kleineren Chromosomen der st/a-Gruppe lokalisiert. Diese Gruppe der Fische ist des weiteren gekennzeichnet durch die bereits erwähnte Karyotypvariation, bedingt durch 1-2 große überzählige Chromosomen. Die unterschiedlichen Chromosomenzahlen von  $2n=50$  oder 52, welche für *Abramis brama*, *A. ballerus*, *Aspius aspius*, *Blicca bjoerkna*, *Leuciscus idus*, *Phoxinus phoxinus* und *Vimba vimba* von verschiedenen Herkunftsorten übermittlelt wurden, machen des weiteren solche Karyotypvariabilitäten deutlich. Über den Ursprung, die Verteilung und die Rolle dieser Genomelemente ist aber nach wie vor wenig bekannt (Green, 1990).

Besonders erwähnenswert ist das variable System der Geschlechtsbestimmung bei Fischen. Das Auftreten verschiedener Geschlechtschromosomen-Mechanismen innerhalb einer Gattung ist nicht selten und macht deutlich, dass unterschiedliche Systeme in verschiedenen Fischgruppen mehrmals unabhängig voneinander entstanden sind (Andreati et al., 1993). Aus ancestral morphologisch identischen Geschlechtschromosomen sind durch strukturelle Veränderungen heteromorphe Gonosomen entstanden, welche Kennzeichen höher entwickelter Formen sind. Mehrere Studien zeigten, dass die Anreicherung von Heterochromatin im Prozess der Geschlechtschromosomen-Differenzierung bei Fischen recht häufig auftritt und hierbei hauptsächlich die Differenzierung des W Chromosoms betrifft (Haaf & Schmid, 1984; Galetti & Foresti, 1986). Mehrere verschiedene Konstitutionen wurden beschrieben: ♀XX/♂XY, ♀ZW/♂ZZ, aber auch ungewöhnlichere wie XX/XO, ZW<sub>1</sub>W<sub>2</sub>/ZZ, X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> und X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y (Kirpichnikov, 1981). Heteromorphe Geschlechtschromosomen mit einem ZZ/ZW-Geschlechtsbestimmungssystem wurden bei europäischen Cypriniden in Populationen von *Blicca bjoerkna* und *Leuciscus cephalus* gefunden (Vujosevic et al., 1983), ein ungewöhnliches ZW/ZW'/ZZ-System wurde ferner für *Scardinius erythrophthalmus* (Koehler et al., 1995) beschrieben. Des weiteren fand man ein XX/XY-Geschlechtsbestimmungssystem in Populationen von *Vimba vimba* (Rudek, 1974). Für die meisten Fischarten sind jedoch homomorphe Geschlechtschromosomen typisch, welche sich im Lichtmikroskop nicht unterscheiden lassen (Nanda et al., 1992). Auch bei *Alburnus alburnus* liegen keine heteromorphen Geschlechtschromosomen vor.

Angaben über die Chromosomenzahl hat man bislang von ungefähr 20% aller beschriebenen Cypriniden und zwar im Bereich von 2n=42 für *Acheilognathus gracilis* (Hong & Zhou, 1985) bis 2n=446 für *Diptychus dipogon* (Yu & Yu, 1990), aber mit einer klaren Dominanz für 2n=50. Diese bei Cypriniden vorkommende Polyploidie ist von komplexer Natur und kann verschiedene Ursprünge haben (Buth et al., 1991). Wenige Daten liegen bislang über die Häufigkeit von Genmutationen in Fischen vor, allerdings wird angenommen, dass sie eher gering ist. Bei der Karyotypevolution der Cypriniden haben aber hauptsächlich chromosomale Umbauten, wie perizentromerische Inversionen eine große Rolle gespielt. Bei den meisten Vertretern dieser Familie findet man somit 50 Chromosomen und zwischen den Spezies variiert nur das Verhältnis von metazentrischen zu akrozentrischen Chromosomen, ohne dass Translokationen auf andere Chromosomen stattgefunden haben (Ohno, 1974).

Zusammenfassend lässt sich aus zytogenetischer Sicht sagen, dass Fische im Allgemeinen zu einer der am wenigsten studierten Klassen von Wirbeltieren gehören, jedoch trotz ihrer niedrigen phylogenetischen Stellung unter den Vertebraten ein hochgradig variables System der Geschlechtsbestimmung besitzen.

### **1.3. B Chromosomen**

B Chromosomen sind numerische Chromosomenvariationen zum Standardkaryotyp, den A Chromosomen und stehen auch im Gegensatz zu den L, E, und S-Chromosomen, welche nur in einigen Zelllinien entbehrlich sind. Beschrieben wurden überzählige Chromosomen zuerst von Wilson (1907) bei Insekten. Im Jahre 1928 prägte Randolph den Begriff B Chromosomen bei Untersuchungen an Maispflanzen (nach Covert, 1998).

#### **1.3.1. Besonderheiten und Unterscheidungskriterien**

B Chromosomen unterscheiden sich meist schon morphologisch von den A Chromosomen. Sie sind gewöhnlich kleiner, mit nur wenigen Ausnahmen, welche allesamt bei Fischen vorkommen. Ein weiteres Kennzeichen zusätzlicher Chromosomen ist ihr unorthodoxer, nicht-Mendelscher Vererbungsmodus. Aufgrund mitotischer Nondisjunction treten sie in variabler Anzahl in den Organen eines Individuums auf. In hoher Zahl verbindet man meist negative Fitnessseffekte bezüglich Wachstum und Fruchtbarkeit mit überzähligen Chromosomen. Selten beherbergen sie Gene mit sichtbaren Auswirkungen. Allerdings gibt es auch wenige Ausnahmen, wie z.B. den Pilz *Nectria haematococca*, welcher das Antibiotikaresistenzgen Pda6 (Miao et al., 1991) auf dem B Chromosom besitzt. Bei mindestens zwei weiteren Pilzarten wurden funktionelle Gene auf überzähligen Chromosomen entdeckt, welche eine wichtige Rolle in Wirt/Pathogen-Wechselwirkungen spielen (Covert, 1998). Des weiteren können zusätzliche Chromosomen Nukleolus Organisierende Regionen (NOR) besitzen. Überzählige Chromosomen sind meist heterochromatische und spät replizierende Einheiten, welche zu den A Chromosomen nicht homolog sind und somit auch nicht mit ihnen paaren.

#### **1.3.2. Vorkommen**

B Chromosomen kommen in ca. 15% aller Spezies vor, wahrscheinlich sogar in allen Tier- und Pflanzengruppen, in allen Teilen der Erde. So wurden sie bisher in mindestens 1300 Pflanzen-, 500 Tier- und 6 Pilzarten beschrieben. Ein extrem häufiges Vorkommen

von B Chromosomen findet man in Insekten, wo 81 % der untersuchten Arten überzählige Chromosomen aufweisen.

Ferner kommen sie sowohl in primitiven als auch in fortgeschrittenen Gruppen vor. Ihre Entdeckung ist eng mit der Schwierigkeit verknüpft, überhaupt qualitativ gute Karyotypen erstellen zu können. So konnten sie beispielsweise in Pilzen erst nach der Entwicklung der Pulsfeld-Gelelektrophorese dokumentiert werden. Nachgewiesen wurden überzählige Chromosomen auch in etwa 50 Säugerspezies.

In dem Standardwerk von Jones & Rees (1982) über B Chromosomen war deren Existenz bei Fischen noch nicht belegt. Erst 1983 wurden sie von Pauls und Bertollo für *Prochilodus lineatus*/*P. scrofa*-Prochilodontidae (Neo et al., 2000) beschrieben. Mittlerweile sind sie aber in mindestens 27 Fischarten entdeckt worden. Neben den 21 von Salvador & Moreira-Filho (1992) aufgelisteten Arten mit zusätzlichen Chromosomen, sind noch eine Reihe weiterer zu nennen, wie z.B.: *Coregonus albula* (Jankun et al., 1991), *Steindachnerina insculpta* (Oliveira & Foresti, 1993), *Iheringichthys labrosus* (Dias & Forsti, 1990; nach Vicente et al., 1996), *Astyanax fasciatus* (Justi, 1993; nach Vicente et al., 1996), *Rutilus rutilus* (Rab & Roth, 1989) sowie *Alburnus alburnus* (Hafez et al., 1978, 1981). Viele der Arten sind in den amerikanischen Tropen beheimatet. B Chromosomen bei Fischen variieren oftmals stark in ihrer Größe, angefangen bei Mikrochromosomen, wie die von *Prochilodus lineatus* (Pauls & Bertollo, 1983), *Moenkhausia sanctaefilmonea* (Foresti et al., 1989), *Astyanax scabripinnis* (Neo et al., 2000) und *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995) über mittelgroße Chromosomen, wie in *Rhamdia hilarii* (Fenocchio & Bertollo, 1990) bis hin zu Makrochromosomen, wie sie beispielsweise auch bei *A. scabripinnis* (Salvador & Moreira-Filho, 1992), *Microlipidogaster leucofrenatus* (Andreatta et al., 1993), *Rutilus rutilus* und *Alburnus alburnus* beschrieben wurden.

### 1.3.3. Struktur und Aufbau

B Chromosomen können kleiner als das kleinste A Chromosomenpaar sein, oder auch das größte um das 1,5 fache übertreffen. Der Fisch *Alburnus alburnus* besitzt nach wie vor die größten in Vertebraten beschriebenen überzähligen Chromosomen. Studien, welche über die Morphologie von B Chromosomen bei Fischen berichten, gehen von einem metazentrischen Typ als vorherrschend aus. Jedoch können auch mehrere B Chromosomenvarianten wie beispielsweise bei *Rhamdia sapo* (Valcarcel et al., 1993) auftreten. Grundsätzlich haben B Chromosomen den gleichen DNA/Chromatinaufbau, die gleichen DNA-Schmelzeigenschaften sowie den gleichen Anteil repetitiver zu nicht-repetitiver Komponenten, allerdings liegen sie oft kondensierter vor als die A Chromosomen. Des Weiteren ist ihr AT/GC Verhältnis in

etwa gleich. CsCl-Dichtegradienten-Analysen zeigen ferner den gleichen GC-Basenpaar-Gehalt in A und B Chromosomen auf.

Aufgrund von ungleichem Crossover und verringerter Rekombination findet man oft Wiederhol-Einheiten („Tandemrepeats“) auf überzähligen Chromosomen, wobei der Typ und die Kopienzahl entscheidend sind. So kommt es oft zu einer massiven Amplifikation von Wiederholmotiven über einen relativ kurzen Zeitraum hinweg. Da diese Motive auch als Proteinandockstellen dienen sind Konformationsänderungen/Silencing und Isolierung vor Rekombination grundsätzliche Kennzeichen überzähliger Chromosomen. In Studien, in denen B Chromosomen bei Fischen der C-Banden Technik unterzogen wurden, waren sie fast immer komplett heterochromatisch, wie bei *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreatta et al., 1993), *Rutilus rutilus* und *Alburnus alburnus* (Rab & Roth, 1989).

#### 1.3.4. Mögliche Effekte

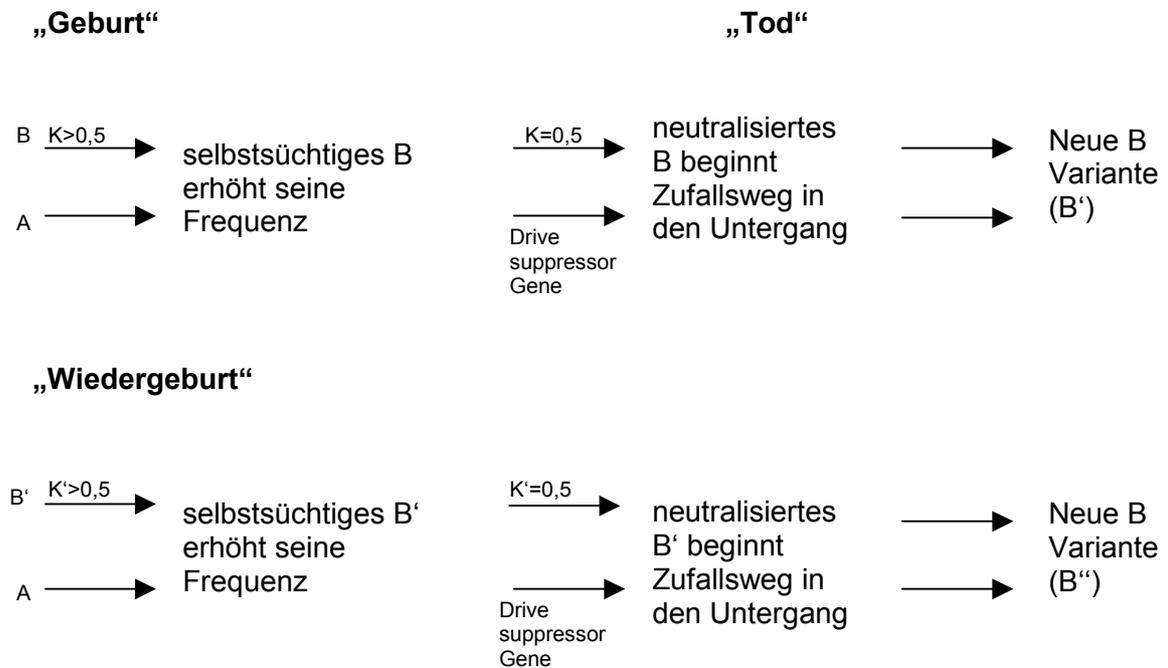
Sie sind oft schwer zu erkennen und beruhen auf ihrer kumulativen Natur. Effekte von B Chromosomen sind oft stärker/negativer, falls sie in ungerader Anzahl auftreten. Oft sind die Auswirkungen von B Chromosomen umweltabhängig und man findet eine negative Korrelation mit der Umgebungshöhe und dem Niederschlag und eine positive mit der Umgebungstemperatur (Beukeboom, 1994). Obwohl sie aufgrund ihrer obligatorisch heterochromatischen Natur genetisch inert sein sollten, können sie eine Reihe von zellulären und physiologischen Prozessen und auch die Chiasmatahäufigkeit der A Chromosomen beeinflussen. B Chromosomen werden deshalb oft als genetisch inert und chromosomal aktiv bezeichnet. Beim Weizen können mehrere überzählige Chromosomen die rDNA-Transkription herabsetzen, ferner haben sie dort auch einen Einfluss auf die Chromatinorganisation (Morais-Cecelio et al., 2000). Neben meist inaktiven ribosomalen Genen sind Farbgene, Antibiotika-Resistenzgene sowie Gene für Esterasen eher die Ausnahme. Generell wird über nachteilige Effekte von B Chromosomen, v.a. in größerer Zahl berichtet. Das Auftreten überzähliger Chromosomen führt bei dem Tier *Polycelis tenuis* beispielsweise zu einer verzögerten Eiablage und zu einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten (Melander, 1950). Auch kann es bei männlichen Grashüpfern von *Myrmeleotettix maculatus* (Hewitt & East, 1978) zu einer verlangsamten Embryonalentwicklung kommen, falls mehr als ein B Chromosom vorhanden ist. Nur (1966, 1969) berichtet ferner von nachteiligen Auswirkungen bei Männchen des Insekts *Pseudococcus obscurus*. Hier verringern zusätzliche Chromosomen die Entwicklungsrate und die produzierte Spermienanzahl. Bei der Pflanze *Allium*

*schoenoprasum* können B Chromosomen allerdings von Vorteil für die Keimreifung sein (Holmes & Bougourd, 1989; Plowman & Bougourd, 1994).

Der Einfluss von B Chromosomen kann somit von deren bloßen Anwesenheit herrühren, bzw. den darauf vorhandenen Genen. Jones & Rees (1982) geben noch eine ganze Reihe weiterer Effekte überzähliger Chromosomen auf den Phänotyp an. Diese betreffen hauptsächlich die Wachstumsrate und Fruchtbarkeit von Pflanzen.

### 1.3.5. Vererbung

B Chromosomen folgen nicht den Mendelschen Vererbungsgesetzen, gewöhnlich haben sie eine Transmissionsrate  $<0,5$ . Überschreiten sie den Wert von 0,5 so kommt es zu einer B Chromosomen-Anhäufung, z.B. durch bevorzugte Segregation bei der Meiose. Als ein extremes Beispiel sei die parasitierende Wespe *Nasonia vitripennis* (Nur et al., 1988; McAllister & Werren, 1997) zu nennen. Bei der hier beschriebenen Form der ameiotischen Anhäufung ist die Transmissionsrate des überzähligen Chromosoms gleich 1. Neben der postmeiotischen Anhäufung, die bei Pflanzen oft vorkommt, kann es auch in selteneren Fällen zu einer premeiotischen Akkumulation durch mitotische Instabilität, zur bevorzugten Befruchtung wie beim *Mais* oder zur paternalen Genomeliminierung wie bei *N. vitripennis* kommen (Beukeboom, 1994). Auch wurden Gene auf überzähligen Chromosomen gefunden, die ihre eigene Nondisjunction kontrollieren (*Mais*, *Roggen*). Das solch eine Nondisjunction von überzähligen Chromosomen oftmals gerichtet und bevorzugt ist, zeigte beispielsweise Nur (1963) bei dem Grasshüpfer *Calliptonus palaestinensis*. Da B Chromosomen keine drastischen Aneuploidieeffekte haben, zusätzlich auch noch einen sogenannten „drive“-Mechanismus besitzen können (Jones, 1991), kommen sie nicht selten auch in größerer Zahl vor. Genauso wie andere „Parasiten“ sind B Chromosomen in einem ständigen koevolutivem Kräftemessen mit ihrem Wirt und treten in eine Art „Nicht-Gleichgewichtsverhältnis“, ein welches aus verschiedenen aufeinander folgenden Phasen wie „drive“, „Neutralisierung“ und „Polymorphismus-Zurückerlangung“ besteht (Abb. 2), nach Camacho et al. (1997).



**Abb. 2:** Evolutionsweg eines fast-neutralen B Chromosoms (Camacho et al., 1997).

$K$  = Transmissionsrate des überzähligen Chromosoms.

### 1.3.6. Bedeutung

Von überzähligen Chromosomen wird generell angenommen, dass sie von verzichtbarer Natur sind und somit auch keine gravierende Bedeutung besitzen. Da mit ihnen nachteilige Effekte verbunden werden, sollten sie schnell ausselektiert werden, falls sie große Einflüsse haben, langsam bei nur geringen Einflüssen und sehr langsam bei neutralem Auftreten. Oft werden sie als eine Art „genomischer“ Abfall angesehen. Allerdings haben sich manche B Chromosomen auch einen Nutzen für einen bestimmten Organismus erworben, so dass Gene auf überzähligen Chromosomen unter gewissen Umständen von Vorteil sind. Ferner können überzählige Chromosomen Gene von den A Chromosomen übernehmen und so unverzichtbar werden. Schließlich ist es auch möglich, dass sich B Chromosomen über Translokationsprozesse selbst ins Genom integrieren und dort eine bestimmte Wirkung entfalten (Henriques-Gil et al., 1983).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass überzählige Chromosomen wohl nicht essentiell für das normale Wachstum oder die Entwicklung eines Individuums sind, sie können aber andere Prozesse wie Zellgröße, Dauer des mitotischen Zellzyklus (Mützing & Akdik, 1948) sowie den Protein- und RNA-Gehalt der Zellen/Kerne betreffen und des weiteren die Häufigkeit an A Chromosomenmutationen (Jones & Rees, 1982) sowie die Verteilung und Häufigkeit von Chiasmata der regulären Chromosomen beeinflussen (Barker, 1960). Sie haben ferner verschiedene Einflüsse auf den Phänotyp falls sie in gerader oder ungerader Zahl auftreten. Dies konnte beispielsweise Shcherbakov (1966) bei der Fliege *Odagmia ornata* zeigen. Hier war die Fitness von Fliegen mit einer geraden Zahl an B Chromosomen denen mit einer ungeraden Zahl überlegen.

#### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Der Fisch *Alburnus alburnus* besitzt extrem große B Chromosomen und ist deshalb ein ideales Untersuchungsobjekt für zytogenetische und molekulare Analysen, welche schließlich Aufschluss über die Basenpaar-Zusammensetzung dieser außergewöhnlichen Chromosomen geben sollten. Im ersten Teil der Arbeit sollten, durch Sammelexkursionen innerhalb Deutschlands, verschiedene Populationen von *Alburnus alburnus* auf die Erscheinungshäufigkeit der B Chromosomen untersucht werden. Ungefähr 30-70 Tiere waren zu einer genauen Analyse der B Chromosomen-Frequenz innerhalb einer Population nötig. Aus geeigneten Geweben, wie Milz, Niere und Kiemen können die Chromosomen nach hypotoner Behandlung mit 46 mM KCl direkt dargestellt werden. Ferner sollte zur Untersuchung des Replikationsverhalten des überzähligen Chromosoms die Schwimmblase der Fische entnommen werden und Zellkulturen von Fischen mit einem bzw. zwei B Chromosomen etabliert werden. Von überzähligen Chromosomen ist bekannt, dass sie einen hohen Gehalt an repetitiven DNA-Sequenzen besitzen (konstitutives Heterochromatin). Da diese heterochromatischen Regionen erst spät in der S-Phase verdoppelt werden, müssten sie, durch Zugabe von BrdU zu lebenden Zellen, durch eine dunkle Anfärbung darstellbar sein. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die A und B Chromosomen von *Alburnus alburnus* einer detaillierten zytogenetischen Untersuchung unterzogen werden. Die Karyotypen sollten deshalb durch verschiedene Bändermuster charakterisiert werden. Zur Lokalisierung und Analyse des konstitutiven Heterochromatins dienen die C-Bändertechnik und eine Reihe von Fluorochromen (AT-spezifisch: DAPI, Distamycin A/DAPI, Hoechst 33258 und Quinacrin mustard; GC-spezifisch: Distamycin A/Mithramycin und Chromomycin A<sub>3</sub>).

Aktive Nukleolus Organisator Regionen, welche häufig auf B Chromosomen gefunden wurden, sollten mit der AgNO<sub>3</sub>-Färbung aufgedeckt werden. Des weiteren sollten in situ Hybridisierungen mit der 18S/28S rDNA, der 5S rDNA und der Telomersequenz (TTAGGG)<sub>n</sub> durchgeführt werden. Ferner kann durch Analyse meiotischer Chromosomen das Paarungsverhalten der überzähligen Chromosomen studiert werden. Anschließend sollte der absolute DNA-Gehalt der Tiere durchflußzytometrisch bestimmt werden. Durch Messung von Hoechst 33258 gefärbten Erythrozyten kann, durch synchrone Auftrennung von Tieren mit und ohne B Chromosom, der DNA-Gehalt des B Chromosoms berechnet werden. Bei den abschließenden molekularzytogenetischen Analysen sollte mit verschiedenen Techniken, wie Chromosomenmikrosezierung und „Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)“, B Chromosomen-spezifische DNA isoliert werden. So gewonnene DNA-Proben sollten kloniert, sequenziert und auf Metaphasen mit überzähligen Chromosom(en) rehybridisiert werden. Diese spezifischen Sonden könnten schließlich nützliche Informationen über den Ursprung des B Chromosoms in *Alburnus alburnus* liefern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zytogenetische Charakterisierung der A und B Chromosomen

#### 2.1.1. Anzahl und Herkunft der untersuchten Fische

##### 2.1.1.1. Populationen von *Alburnus alburnus*

Es wurden mehr als 300 Tiere aus vier verschiedenen Population in Deutschland untersucht (Abb. 3):

- Fische vom Edersee (Kassel):

Februar, 1999:	74 Tiere
April, 2000:	54 Tiere
  
- Fische aus dem Main bei Sommerach (Würzburg):

Mai, 1999:	76 Tiere
Juni, 2000:	25 Tiere
  
- Fische aus der Elbe bei Bad Schandau (Dresden):

August, 1999:	24 Tiere
---------------	----------
  
- Fische aus der Donau bei Vilshofen (Passau):

Oktober, 1999:	49 Tiere
----------------	----------

##### 2.1.1.2. Population von *Rutilus rutilus*

- Fische aus dem Main (bei Würzburg):

April, 2001:	30 Tiere
--------------	----------

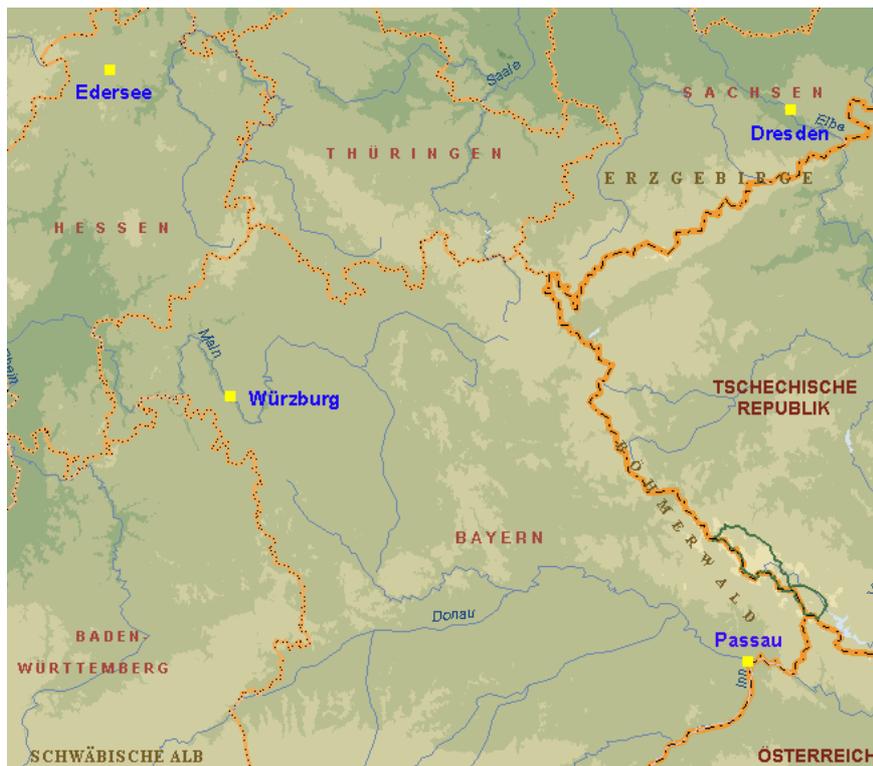


Abb. 3: Karte mit Fundorten der Fische.

### 2.1.2. Präparation der Gewebe

Die kleineren Fische wurden für 12-16 Stunden in eine 0,03% Colchizinlösung gesetzt, größere Tiere 2-3 Stunden vor der Organentnahme mit 0,3 ml dieser Substanz gespritzt. Nach Betäubung der Tiere auf Eis bzw. mit dem Nervengift MS 222 erfolgte die Fixierung am Kopf und Schwanzende. Zur Gewebeentnahme wurde die Bauchdecke längs geöffnet und mit geeigneten Nadeln fixiert.

#### 2.1.2.1. Blut

Durch Herzpunktion wurde versucht, Frischblut mit einer heparinisierten Spritze zu gewinnen. Für eine Blutzellkultur reicht diese geringe Menge nicht aus, jedoch können 2-3 Tropfen Blut sofort mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 versehen werden und zur DNA-Gehaltsbestimmung am Durchflußzytometer verwendet werden.

#### 2.1.2.2. DNA

Für die genomische DNA-Extraktion gibt man bevorzugt das Herz, Teile der Kaumuskulatur, Gehirn sowie Augen der getöteten Karpfenfische in 2 ml Nunc-Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff. Bei sehr kleinen Tieren diente oftmals der gesamte Restkörper zur DNA-Gewinnung. Die weitere Lagerung bis zur molekularen DNA-Extraktion erfolgt bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.1.3. Herstellung von Chromosomenpräparaten**

Bestens geeignet für die konventionelle Chromosomen-Direktpräparation bei Fischen sind die Milz, die beidseitig des Rückgrates gelegene Kopfniere sowie die gut durchbluteten Kiemenbögen. Diese Gewebe wurden mit einer Schere fein zerkleinert und 60 min in einer 0,046 M KCl-Lösung unter Rühren inkubiert (Nanda et al., 1995). Die so gewonnene Zellsuspension wurde in 5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 8 min bei 1400 rpm abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment in wenig Restflüssigkeit durch Klopfen verteilt und mit 1-2 ml Fixativ versehen. Die Lagerung der so gewonnen Chromosomensuspension erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Fixativ: Eisessig: Methanol im Verhältnis 1:3*

#### 2.1.3.1. Mitotische Chromosomen

Hierzu werden fettfreie Objektträger benötigt, die man durch 30 minütige Inkubation in 70% Ethanol, anschließender Wässerung sowie kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser erhält. Die Küvette mit den reinen Objektträgern im destillierten Wasser wurde nun noch für 20 Minuten auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gestellt. Die Chromosomensuspension wurde 8 Minuten lang bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Auf das Sediment wurde solange frisches Fixativ gegeben, bis die Suspension noch eine leicht milchige Trübung aufwies. Hiervon wurden 3-5 Tropfen auf die kalten und gereinigten Objektträger gegeben. Durch behutsames Verblasen der Zellsuspension auf dem Objektträger und anschließender Flammenspreitung kann eine optimale Verteilung der Metaphasen sowie eine bessere Spreitung der Chromosomen erzielt werden.

#### 2.1.3.2. Meiotische Chromosomen

Zur Untersuchung des Paarungsverhaltens der überzähligen Chromosomen wurde zusätzlich noch Testisgewebe der Fische aufgearbeitet. Eine Wärmeplatte wurde auf  $45^{\circ}\text{C}$  erwärmt und mit mehreren Objektträgern bestückt. In einem größeren Tropfen 50%iger Essigsäure wurde nun ein Stück des Hodengewebes mit Uhrmacherpinzette und Skalpell zerkleinert. Mit einer silikonisierten Pasteurpipette wurde das Material solange auf- und abpipettiert, bis es fast durchsichtig erschien. Nach leichtem Kippen der Objektträger und kurzem Verblasen des Flüssigkeits-Zellgemisches wurden die Objektträger kurz luftgetrocknet und unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

## 2.1.4. Chromosomenfärbemethoden

### 2.1.4.1. Giemsa-Färbung

Diese einfache Standardmethode führt zu einer einheitlich blau-violetten Färbung der Chromosomen. Aus der Giemsa-Stammlösung wurde mit 20 mM Phosphatpuffer (pH=6,88) eine 5% Lösung hergestellt. Die Stammlösung sollte dabei immer filtriert werden, da Oxidationsprodukte die Lösung verunreinigen können. Die Präparate wurden 20 Minuten gefärbt, in Aqua dest. gespült, an der Luft getrocknet und anschließend mit dem Dauereinschlussmittel Histokitt versehen.

#### Phosphatpuffer für Giemsa

Lösung A: 0,025 M  $KH_2PO_4$

Lösung B: 1,25 M  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

(Lsg. A:B für pH= 6,88 = 1: 0,87)

### 2.1.4.2. C-Bänderung

Die C-Bandentechnik wurde nach einer modifizierten Methode von Sumner (1972) durchgeführt und diente der selektiven Färbung des konstitutiven Heterochromatins. Sie enthält in der üblichen Weise einen Denaturierungs-Renaturierungsschritt und eine Giemsa-Färbung.

2-3 Tage alte Präparate wurden bei Raumtemperatur für 30 min in eine Küvette mit 0,2 N HCl gestellt. Nach dreimaligen Spülen in destilliertem Wasser, jeweils für etwa 20 Sekunden kamen sie anschließend für 2 Minuten und 45 Sekunden in eine gesättigte 5% Bariumhydroxidlösung. Diese wurde vorher filtriert und im Wasserbad auf 30°C erwärmt. Bevor die Präparate inkubiert wurden, musste noch der sich bildende Bicarbonatniederschlag auf der Oberfläche der Lösung mit einem Filterpapierstreifen entfernt werden. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Präparate kurz in 0,2 N HCl gespült, dann dreimal gründlich in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 1,5 Stunden bei 60°C in eine 2xSSC-Pufferlösung gestellt. Nach erneutem gründlichen Spülen in Aqua dest. erfolgte eine 22 minütige Färbung der Chromosomen in 10%iger Giemsalösung. Die luftgetrockneten Präparate wurden schließlich in Histokitt eingedeckt.

#### Gesättigte Bariumhydroxidlösung $Ba(OH)_2$

5 mg  $Ba(OH)_2 \times 8H_2O$

100 ml Aqua bidest.

=>Lösung muss filtriert werden!

### 2.1.4.3. Silberfärbung

Dies ist eine Methode zur selektiven Färbung aktiver Nukleolus Organisator Regionen (NOR), welche die 18S/28S rRNA-Gene enthalten. Es werden nur die in der vorangegangenen Interphase aktiv transkribierten ribosomalen Gene nachgewiesen. Dies geschieht durch einen schwarzen Niederschlag an dem Ribonukleoproteinkomplex, welcher die NOR umgibt. Zwei Tropfen Gelatinelösung wurden auf mindestens einen Tag alte Objektträger gegeben und darauf ein bzw. zwei Tropfen 50% Silbernitratlösung. Nach Auflegen eines großen Deckglases wurden die Objektträger für 2 Minuten und 30 Sekunden bei 60°C inkubiert. Das Deckglas wurde nun von den goldbraun erscheinenden Präparaten abgespült und die Chromosomen 30 Sekunden in 2% Giemsalösung gegengefärbt. Die Objektträger wurden nun uneingedeckt mit einem speziellen Öl ausgewertet.

#### Silbernitrat-Lösung (50%)

5 g AgNO<sub>3</sub>

10 ml Aqua bidest

#### Gelatinelösung

1,5 g Gelantine

50 ml ddH<sub>2</sub>O (kurz aufkochen)

0,5 ml Ameisensäure

### 2.1.4.4. Zellkulturchromosomen und die BrdU-Replikationsbänderung

Kultur von Zellen der Schwimmblase

Alle Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt und es wurden nur autoklavierte bzw. sterilisierte Utensilien verwendet. Nach der Entnahme der Schwimmblase wurde diese über Nacht in DMEM-Kulturmedium mit 0,9% Penicillin-Streptomycin (Stammlösung: 10,000 U/ml, Gibco) zur prophylaktischen Dekontamination gegeben.

#### Kulturmedium für Fibroblasten

400 ml DMEM (Gibco)

50 ml FKS (fötals Kälberserum, 10%)

50 ml Spezieller Zusatz (10%)

#### Spezieller Zusatz

500 ml FCS

100 ml Pen/Strep (10,000U/ml)

100 ml Glutamin

100 ml Pyruvat

100 ml nicht-essentielle Aminosäuren

5 ml β-Mercaptoethanol (50 mM)

### Anlegen einer Primärkultur von Zellen

Am nächsten Morgen wurde die Schwimmblase unter sterilen Bedingungen in einer gläsernen Petrischale mit scharfen Skalpellen zerkleinert. In eine 5 ml Kulturflasche wurden 16-20 Stückchen transferiert und ca. 8 Stunden bei Raumtemperatur anhaften gelassen. Da die Gewebestücke nur etwa 1-2 mm<sup>2</sup> groß waren, konnten einerseits mehrere Primärkulturen der selben Schwimmblase angelegt werden, zum anderen war ein besseres Auswachsen der Fibroblasten gewährleistet. Nach dem Anhaften der Zellen am Kulturflaschenboden wurde dieser vorsichtig mit 2 ml Medium bedeckt. Die Kulturen wurden für zwei Tage bei leicht geöffnetem Deckel, bei 28°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach dieser Zeit war ein festes Anhaften und manchmal auch schon leichtes Auswachsen fibroblastenähnlicher Zellen zu beobachten und das alte Medium konnte jetzt durch 2-3 ml Frischmedium ersetzt werden. Das Medium wurde nun zwei mal die Woche gewechselt. Sobald ein konfluenter Zellrasen vorlag konnte die Kultur passagiert werden. Das Medium wurde mit einer Pipette abgesaugt und die Flaschen mit 1xTrypsinlösung gespült. Nach dem Absaugen der Trypsinlösung kamen wiederum etwa 2 ml Trypsinlösung in jede 5 ml Flasche und es wurde für 5-10 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen der Flaschen lagen schließlich abgelöste Einzelzellen vor. Die Trypsinzellsuspension wurde nun in ein mit dem gleichen Volumen an kaltem Komplettmedium bestücktes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt anschließend bei 1400 rpm (Heraeus Christ Digifuge<sup>GL</sup>) 8 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment aufgeschüttelt und in 2 ml Komplettmedium (bei 5 ml Kultur) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde jetzt auf zwei neue 5 ml Kulturflaschen, die bereits mit 1 ml Komplettmedium beschickt wurden, gegeben. Nach der Kontrolle der Zelldichte unter dem Mikroskop wurden die Fibroblasten über Nacht im 28°C-Brutschrank inkubiert, bevor die durch die Trypsinierung abgestorbenen Zellen durch Mediumwechsel entfernt wurden.

### Trypsinlösung

*90 ml 1xPBS*

*10 ml 10xTrypsin-EDTA*

### Einfrieren von Zellen

Eine dicht bewachsene 10 ml Kulturflasche wurde trypsinisiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgezogen, das Sediment unter Losklopfen vorsichtig in 1 ml eiskalten Einfriermedium aufgenommen und in ein vorgekühltes Nunc-Einfriergefäß gegeben.

Dieses wurde über Nacht im  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank langsam im Styroporbehälter eingefroren, bevor es dann zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt wurde.

#### *Einfriermedium*

100 ml RPMI (80%)

10 ml FCS (10%)

10 ml DMSO (10%)

#### Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden möglichst rasch aus dem flüssigen Stickstoff ins  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad gestellt, um ein Absterben zu vieler Zellen durch das im Medium enthaltene DMSO zu verhindern. Die Zellen wurden nun in 10 ml Kompletmedium überführt, abzentrifugiert und das Sediment nach dem Aufklopfen in 1 ml frischem Medium aufgenommen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde nun in eine 10 ml Kulturflasche mit 9 ml vorlegtem DMEM-Kompletmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und DMSO-Reste zu entfernen. Nun wurde die Flasche mit 5 ml frischem DMEM-Medium versehen.

#### Abbruch und Fixierung der Fibroblasten

Um genügend Metaphasen zu erhalten mussten mindestens vier 10 ml Kulturflaschen zu 2/3 mit Fibroblasten bewachsen sein. Sobald sich die Zellen in der exponentiellen Phase befanden, wurden  $0,15\ \mu\text{g/ml}$  Colcemid (Endkonzentration) pro Flasche verabreicht. Dieses Spindelgift arretiert die Zellen in der Metaphase, wo die Chromosomen in einer hochkondensierten Form vorliegen. Nach 4-5 Stunden Einwirkzeit wurde das Medium abgezogen und die Zellen, nach einem Waschschriff mit etwas 1xTrypsin, mit 2 ml  $37^{\circ}\text{C}$  warmer Trypsinlösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurde nun versucht hauptsächlich die abgerundeten Metaphasezellen abzulösen. Um des weiteren auch die Metaphasen zu erfassen, die sich vor der Trypsinierung in Suspension befanden, wurde die Trypsinzellsuspension mit dem alten Medium aufgenommen und bei 1400 rpm 8 min lang zentrifugiert. Nach Abzug des Überstandes wurde das Sediment 35 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in 0,8% Natriumcitrat inkubiert. Danach wurde 8 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Tropfenweise und unter ständigem Aufschütteln, um eine Verklumpung der Zellen zu vermeiden, wurden einige Milliliter an eiskaltem Fixativ zugegeben und die Chromosomensuspensionen jetzt gegebenenfalls vereinigt.

In diesem Fixativ kann das Material nun bei 4°C bis zur Herstellung von Präparaten aufbewahrt werden.

#### BrdU–Replikationsbänderung

Durch Zugabe des Thymidinanalogous BrdU (5-Bromdesoxyuridin) zu Beginn der DNA-Replikation, gefolgt von Desoxythymidin (dT)-Zugabe während der verbleibenden S-Phase, können früh, bzw. spät replizierende Chromosomenabschnitte dargestellt werden. Es können nur lebende, noch mitotisch aktive Zellen herangezogen werden. Die Zellen wurden vor den Abbrüchen nicht synchronisiert. Ca. 20 Stunden vor dem Abbruch wurden 100 µl BrdU-Stammlösung (10 mg/ml) zu den 10 ml Kulturen gegeben und für 16 Stunden weiterkultiviert. Nach dem Absaugen des BrdU-haltigen Mediums wurde 2 mal mit frischem DMEM-Medium gewaschen, ehe nun die Zellen für weitere 4 Stunden in Medium mit 48 µg/ml Desoxythymidin inkubiert wurden. Nun kamen 90 µl Colcemid in die Kulturen, bevor nach weiteren 4 Stunden ein normaler Abbruch erfolgte. Gewöhnliche Chromosomenpräparate wurden nun erstellt und 3 Tage altern gelassen.

BrdU-Blockmedium                      0,8 mM = 200 µg BrdU/ml DMEM-Medium

dT angereichertes Medium        0,2 mM = 48 µg dT/ml DMEM-Medium

#### FPG (Fluoreszenz plus Giemsa)-Färbung

Zur Anwendung kam eine modifizierte Technik von Perry & Wolf (1974), wobei Eosin Y alternativ zu Hoechst 33258 verwendet wurde. Ca. 3 Tage alte Präparate wurden für 30 Minuten in Eosin Y-Lösung (0,02 µg/ml FPG-Puffer) gestellt und anschließend gründlich mit FPG-Puffer gespült. Die Präparate wurden nun in einer Petrischale mit FPG-Puffer überschichtet und 10-30 Minuten mit einer UV-Lampe bestrahlt, wobei der Abstand zur Lampe 10 cm betrug. Nach erneutem gründlichen Spülen in FPG-Puffer wurden die Objektträger für 90 Minuten in 2xSCC bei 60°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 5% Giemsalösung angefärbt. Nach dem Spülen in destilliertem Wasser und Lufttrocknung konnten sie in Eukitt eingedeckt werden. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigten die BrdU-substituierten Chromosomenbereiche eine blassblaue Färbung, während die Abschnitte, welche Desoxythymidin eingebaut hatten, dunkelblau angefärbt wurden. Das Resultat ist ein multiples Bandenmuster, welches mit dem Zeitpunkt der BrdU-Inkorporation korreliert.

FPG-Puffer

4,47 g KCl

17,53 g NaCl

5 ml 1/3 M  $KH_2PO_4$ 

2000 ml Aqua dest.

=&gt;mit NaOH auf pH=5,5 einstellen

2.1.4.5. Q-Banden-Färbung

Diese klassische Bänderungsmethode basiert auf einer modifizierten Methode von Caspersson et al. (1970) und dient der Färbung längerer AT-reicher chromosomaler Regionen, welche hell fluoreszieren. Einen Tag alte Präparate wurden je 20 bis 30 Sekunden lang durch eine absteigende Ethanolreihe gebracht (100%/70%/30%), bis auf den Präparaten keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nach gründlichem Spülen in McIlvaine-Puffer wurden sie schließlich 25 Minuten bei Raumtemperatur in eine Quinacrin mustard-Färbelösung gestellt. Anschließend wurden die Präparate dreimal gründlich für jeweils 20 Sekunden in McIlvaine-Puffer gespült, luftgetrocknet und in gesättigter Saccharose-Lösung eingedeckt. Nach etwa einem Tag im Dunkeln hatte sich die Fluoreszenz stabilisiert und die Präparate waren im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 460-495 nm Filters auswertbar. Das Deckglas konnte später wieder, wie auch bei der DAPI- und Mithramycin-Fluoreszenzfärbung, leicht mit einem Skalpell abgehoben werden und die Präparate für die Silberfärbung herangezogen werden.

McIlvaine-Puffer, pH=7,0

0,1 M Citronensäuremonohydrat

0,2 M di-Natriumhydrogen-  
phosphat-DihydratQuinacrin mustard-Lösung

5 mg Quinacrin mustard

100 ml McIlvaine-Puffer, pH=7,0

2.1.4.6. Distamycin A/Mithramycin-Färbung

Die Distamycin A/Mithramycinfärbung bewirkt eine helle Fluoreszenz der GC-reichen Chromosomenabschnitte. Bei Fischen erhält man jedoch kein, wie bei Vertebraten übliches R-Bänderungs-Muster, vielmehr ist eine spezifische Darstellung der Nukleolus-Organisierenden-Regionen möglich (Schmid & Guttenbach, 1988). Mithramycin bildet einen stabilen Komplex mit GC-reicher DNA, wobei dessen gelblich-grüne Fluoreszenz, mit dem kontrastinduzierenden, basischen Antibiotikum Distamycin A noch verstärkt werden kann. Heterochromatinregionen, die mit Mithramycin eine positive Fluoreszenz aufweisen sind immer Quinacrin-negativ und umgekehrt.

Mindestens einen Tag alte Präparate wurden mit 150 µl Distamycin A-Lösung eingedeckt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Abschütteln der Deckgläser wurden die Objektträger zwei mal 20 Sekunden in einer Küvette mit McIlvaine-Puffer geschwenkt und luftgetrocknet. Nun wurde jeweils 150 µl Mithramycin auf die Präparate gegeben und 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach gründlichem Spülen in McIlvaine-Puffer wurden die Präparate luftgetrocknet und in gesättigter Saccharoselösung eingedeckt. Zur Stabilisierung der Färbung wurden die Objektträger mindestens einen Tag im Kühlschrank gelagert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines 460-495 nm Filters ausgewertet.

Distamycin A-HCl Lösung

300 µg Distamycin A-HCl

1 ml McIlvaine-Puffer, pH=7,0

Mithramycin A-Lösung

0,1 mg Mithramycin A/ml McIlvaine-Puffer

0,01 M MgCl<sub>2</sub>

2.1.4.7. Distamycin A/DAPI-Färbung

Mit dem AT-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI lässt sich eine schwache und wenig kontrastreiche Bänderung der Chromosomen erzielen. Diese erscheinen blau, wobei gewisse AT-reiche Regionen heller leuchten (Schweizer et al., 1978). Allerdings lassen sich durch vorherige Inkubation mit dem ebenfalls AT-bindenden Oligopeptid Antibiotikum Distamycin A, das eine unterschiedliche Bindungsaffinität aufweist, gewisse heterochromatische Chromosomenbereiche auffallend hervorheben. Distamycin A hat an gewissen AT-reichen Sequenzen des Euchromatins höhere Bindungsaffinitäten als DAPI, wodurch dies hier verdrängt wird und damit Q-Banden-positive-Bereiche der chromosomalen DNA DAPI-negativ erscheinen. Andererseits bindet DAPI in bestimmten AT-reichen Heterochromatinabschnitten stärker an die DNA als Distamycin A. Dieses wird hier verdrängt, mit dem Ergebnis, dass helle DAPI-Fluoreszenzbanden entstehen (Wilson et al., 1990).

Wie bei der Mithramycin-Färbung wurde zunächst wieder 150 µl Distamycin A-Lösung auf die Objektträger gegeben und 15 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abschütteln der Deckgläser wurden die Präparate zwei mal 30 Sekunden in McIlvaine-Puffer gespült und 15 Minuten in DAPI-Färbelösung gestellt. Dann wurden die Präparate in McIlvaine gewaschen, ehe sie nach dem Trocknen in gesättigter Saccharose eingedeckt und am nächsten Tag mit dem 365 nm-Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden.

DAPI-Stammlösung (20%)

2 g DAPI

10 ml McIlvaine-Puffer, pH=7,0

DAPI-Färbelösung150  $\mu$ l DAPI-Stammlösung

100 ml McIlvaine-Puffer, pH=7,0

=&gt;Färbelösung immer neu ansetzen!

2.1.4.8. Färbung der Chromosomen mit Hoechst 33258 und Chromomycin A<sub>3</sub>

Die Inkubation der Chromosomen mit dem GC-spezifischen Fluorochrom Chromomycin A<sub>3</sub> führt zu einer Mithramycin-analogen Färbung der Chromosomen und wurde nach bereits beschriebenem Protokoll ausgeführt. Die Bindungseigenschaften und Fluoreszenzspezifitäten von Hoechst 33258 sind denen von DAPI recht ähnlich, was zu einer selektiven Färbung AT-reicher DNA-Abschnitte auf den Chromosomen führt. Inkubationszeiten und Protokollverlauf entsprechen dem DAPI-Protokoll.

**2.1.5. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)**

Die in situ Hybridisierung stellt den direktesten Weg zur Untersuchung der Lokalisation von Nukleinsäuresequenzen in Interphasezellkernen sowie auf mitotischen und meiotischen Chromosomen (*in situ*) dar. Markiert wurden die verwendeten Proben durch eine Terminale Transferasereaktion (Telomerprobe), beziehungsweise über die Nick-Translation (rDNA-Nachweise). Als markierendes Desoxynukleotidoligomer wurde Biotin-16-dUTP verwendet. Vor der Hybridisierung mussten die Präparate durch Inkubation in 70% Formamid bei 70°C denaturiert werden. Die Hybridisierung erfolgte stets über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C. Die Stringenz der Waschschriffe richtete sich nach der Art der Probe. Die eigentliche Fluoreszenz-Detektion verlief über das an Biotin bindende Protein Avidin, welches mit Fluorescein-Iso-Thiocyanat (FITC) gekoppelt war. Eine der Signalverstärkung dienende Amplifikation durch einen zweiten Antikörper (Anti-Avidin) wurde bei der Hybridisierung mit der Telomerprobe, der B Chromosomen-Sonde und bei der Lokalisierung der 5S rRNA-Gene durchgeführt, war aber aufgrund der klar erkennbaren Hybridisierungssignale der 18S/28S rRNA-Gene nicht nötig.

2.1.5.1. Hybridisierung mit der Vertebraten-Telomersequenz

Die Enden der Chromosomen bestehen aus kurzen G/C reichen DNA-Abschnitten und ihren assoziierten Proteinen. Als erste Telomersequenz wurde 1978 von Blackburn und Gall die Sequenz (TTGGGG)<sub>n</sub> beim Ciliaten *Tetrahymena thermophila* beschrieben (Zakian, 1995). Die Sequenz des menschlichen Telomers (TTAGGG)<sub>n</sub> wurde 1988 von Moyzis et al. isoliert (Moyzis, 1991).

Auch viele andere Entwicklungslinien, von Knochenfischen über Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugetieren haben identische Telomere. Demnach müsste diese Struktur seit mehr als 400 Millionen Jahren der Evolution unverändert geblieben sein (Meyne et al., 1989), allerdings gibt es nur wenige Angaben über die Verteilung dieser Sequenz in Fischen (Meyne et al., 1990). Nach internationaler Übereinkunft werden die Enden des zugehörigen DNA-Stranges sowie des komplementären Stranges wie folgt definiert.



Gekennzeichnet sind hier jeweils ein Monomer der repetitiven Telomersequenz wie es als Baustein der als Probe verwendeten Oligodesoxynukleotide diente. Deren Sequenz lautet in der konventionellen Schreibweise von 5' nach 3' **(GGGTTA)<sub>n</sub>** bzw. **(TAACCC)<sub>n</sub>**.

#### Probe und Tailing

Diese Oligonukleotidprobe wurde auf einem automatischen DNA-Synthesizer (Gene Assembler Plus, Pharmacia) hergestellt. Die Markierung der Heptamere mit Biotin-16-dUTP erfolgte unter Verwendung des Enzyms Terminale Transferase (TdT, Boehringer, Mannheim). Dieses Enzym katalysiert die Addition von Desoxynukleotiden an das 3'-OH-Ende von DNA-Molekülen. 100 pmol der Oligonukleotide wurden so markiert. Der Reaktionsansatz wurde 2,5 h bei 37°C inkubiert, danach für 5 min auf Eis gestellt. Durch Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA wurde die Reaktion abgestoppt, danach durch Zugabe von 5 µl 6 M LiCl, 6 µl E.coli-tRNA und 200 µl eiskalten, absoluten Ethanol die Präzipitation eingeleitet. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Danach wurden die Reaktionsansätze noch eine Stunde bei -80°C gekühlt und bei 4°C 15 min lang bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Sediment 10 min lang mit 400 µl kaltem 70%igen ETOH gewaschen. Nach dem Trocknen in der Speedvac (Univapo) wurde das Sediment in 40 µl TE-Puffer ( $\approx 3,5$  pmol/µl) aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Tailing-Ansatz

5  $\mu$ l (GGGAAT)<sub>7</sub> circa 100 pmol

5  $\mu$ l (CCCTTA)<sub>7</sub> circa 100 pmol

10  $\mu$ l 5 $\times$ TdT-Puffer (gebrauchsfertige Lösung)

2,5  $\mu$ l 25 mM CoCl<sub>2</sub>

1,0  $\mu$ l 1 mM Biotin-16-dUTP

1,5  $\mu$ l 1 mM dATP

3,0  $\mu$ l TdT (20U/ $\mu$ l)

30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Spot-Test

Der Spot-Test erlaubt es, die Effizienz des Biotin-Einbaus in der Probe zu kontrollieren. Zunächst wurden 1:10/1:100/1:1000 und 1:10000 Verdünnungen der zu testenden DNA-Proben in TE-Puffer hergestellt. Als Kontrolle diente markierte  $\lambda$ -DNA. Jeweils 1  $\mu$ l der Verdünnungen wurde auf einen Nitrozellulosefilter aufgetragen, wobei der erste Spot etwa 1 ng DNA enthalten sollte. Nach kurzem Lufttrocknen wurde der Filter 2 h bei 80°C gebacken und nach dem Abkühlen 1 min in AP-Puffer I rehydriert. Danach erfolgte ein 45 minütiges Blocken des Hintergrundes mit Blocking reagent bei 37°C. Nach 2 $\times$ 5 min Waschen mit AP-Puffer I wurde mit 1  $\mu$ g/ml Streptavidin-Alkalischer-Phosphatase 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Hierauf wurde der Filter 3 $\times$ 5 min in AP-Puffer I und anschließend 10 min in AP-Puffer II gewaschen. Nun konnte die Entwicklung der Farbreaktion mit 35  $\mu$ l BCIP und 45  $\mu$ l NBT in 10 ml AP-Puffer II im Dunklen gestartet werden. Nach 2-3 stündiger Entwicklungszeit wurde die Reaktion durch Spülen mit TE-Puffer und destilliertem Wasser gestoppt. Bei erfolgreichem Einbau von Biotin in die Probe zeigten sich auf dem Filter blau-violette Punkte unterschiedlicher Farbintensität für die einzelnen Verdünnungsstufen.

Puffer I

5 ml 1M Tris, pH=7,5

4,5 ml 5 M NaCl

130,5 ml ddH<sub>2</sub>O

Puffer II

5 ml 1M Tris, pH=9,5

1 ml 5 M NaCl

2,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>

41,5 ml ddH<sub>2</sub>O

Färbelösung*5 ml Puffer II**22,5 µl NBT**17,5 µl BCIP*Blocking-reagent*0,1 g blocking reagent**20 ml Puffer I (bei 50°C lösen)*

Vorbehandlung der Präparate zur in situ Hybridisierung

Pepsinbehandlung

Um die Pepsinlösung herzustellen, wurden zuerst 100 ml sterilfiltriertes Wasser auf 37°C erwärmt, bevor 50 µl der 10% Pepsin-Stammlösung und dann erst 1 ml 1 M HCl zugegeben wurden. Nach kurzem Äquilibrieren in 1×PBS wurden die Präparate in dieser Lösung 10 min lang inkubiert. Danach wurde 2×5 min in 1×PBS und anschließend 1×5 min in 1×PBS/50 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen.

Nachfixierung in Formaldehyd

Die Präparate wurden 10 min lang in einer 1%igen Formaldehyd-Lösung inkubiert, bevor sie für 5 min in 1×PBS gewaschen wurden. Die Dehydrierung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%/85%/100%), jeweils circa 3 min lang. Die Objektträger wurden luftgetrocknet.

1×PBS/50mM MgCl<sub>2</sub>*50 ml 10×PBS**25 ml 1M MgCl<sub>2</sub>**ad 500 ml dH<sub>2</sub>O*

Denaturierung der Chromosomen

Damit die markierte Probe spezifisch an die entsprechenden Zielregionen in den Chromosomen binden kann, müssen diese vorher einzelsträngig gemacht werden. Zur Denaturierung und gleichzeitigen Strukturhaltung des Chromatins eignet sich eine Behandlung mit 70%iger Formamidlösung bei 70°C. Mehrere Tage alte Präparate wurden circa 5 min lang auf einer Wärmeplatte bei 50°C inkubiert, um eine zu starke Abkühlung der Formamidlösung zu umgehen. Anschließend wurden sie in 70% Formamid/2×SSC bei 70°C denaturiert. Die Denaturierungszeit richtete sich nach der Art der Präparate und betrug bei Zellkulturchromosomen 30 Sekunden, konventionell präparierte Metaphasechromosomen wurden 1 Minute lang denaturiert. Danach wurden die Präparate sofort für je 3-4 min einer aufsteigenden, eiskalten Alkoholreihe unterzogen und anschließend luftgetrocknet.

Jetzt konnte die Chromosomenmorphologie und der Grad der Denaturierung im Phasenkontrast überprüft werden.

Hybridisierung mit der Telomerprobe

Da die Desoxynukleotid-Oligomere der Telomerprobe bereits in einzelstängigem Zustand vorlagen, war eine Denaturierung der Probe nicht nötig. Die dem Probenmix zugesetzte E.coli-DNA diente der Absättigung unspezifischer Bindungen. Der 30%ige Zusatz von Formamid zum Probenmix erklärt sich aus der Länge der Telomerprobe: Der Schmelzpunkt  $T_m$  von Desoxynukleotid-Oligomeren ist von deren Länge und GC-Gehalt abhängig und wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\text{GC})\% - 650/L$$

L ist dabei die Anzahl der Nukleotide der Probe. Für die Proben  $(\text{GGGTTA})_7$  und  $(\text{TAACCC})_7$  ergibt sich also  $T_m = 56^\circ\text{C}$ . Da diese Hybridisierungstemperatur für die Erhaltung der Chromosomenmorphologie zu hoch liegt, kann sie durch Zugabe von Formamid zur Hybridisierungslösung herabgesetzt werden. Dabei vermindert 1% Formamid die nötige Temperatur um  $0,7^\circ\text{C}$ . Bei 30% Formamid liegt die Hybridisierungstemperatur also im Bereich von  $35^\circ\text{C}$ , so dass die Hybridisierung aus praktischen Gründen bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt werden konnte. Auf das erste Drittel des Objektträgers wurden  $30 \mu\text{l}$  Probenmix gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und die Ränder mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$ .

#### Probenmix (Telomerprobe)

10 % Dextransulfat

30 % Formamid

2×SSC, pH=8,0

12  $\mu\text{l}$  E.coli-DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), denaturiert

circa 7 pmol biotinylierte Oligo-Probe pro Präparat, je Hälfte  $(\text{GGGTTA})_7$  und  $(\text{TAACCC})_7$

Probenspezifische Waschschrte für die Telomerprobe

Nach der Hybridisierung müssen verschiedene Waschschrte durchgeführt werden, um die nicht gebundenen Proben-Reste vom Präparat zu entfernen. Die Stringenz der Waschungen ist abhängig von der Art der verwendeten Probe. Je höher die Temperatur und je niedriger die Salzkonzentration, desto stringenter ist der Waschgang.

Bei ungeeigneten Hybridisierungs- und Waschbedingungen kann es zu einer unerwünschten Kreuzhybridisierung bzw. zum Herunterwaschen der Probe kommen. Von den über Nacht hybridisierten Präparaten wurde das Fixogum mit einer feinen Uhrmacherpinzette abgezogen. Nach Ablösen der Deckgläschen durch kurze Inkubation der Objektträger in 2×SSC bei Raumtemperatur, erfolgten die eigentlichen Waschschrte. Die Objektträger wurden für 5 min bei Raumtemperatur in einer Küvette mit 2×SSC auf dem Schüttler inkubiert, ehe sie dann in selbigem Puffer 3×5 min bei 37°C im Schüttelwasserbad gewaschen wurden.

#### Fluoreszenznachweis mit Avidin-FITC

Die Fluoreszenz-Detektion erfolgte mit Avidin-FITC. Die Anhebung der Signalintensität durch eine angeschlossene Immundetektion mit einem zweiten Antikörper (biotinyliertes Anti-Avidin) wurde durchgeführt. Nach erfolgter Waschung wurde je 200 µl Blockpuffer auf jedes Präparat gegeben, ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und dann für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert um den Hintergrund abzublocken. Von den Objektträgern wurde das Deckglas abgeschüttelt und man ließ den Puffer ablaufen. Die nun folgenden Schritte sollten unter möglichst wenig Lichteinwirkung ausgeführt werden. 200 µl FITC-gekoppeltes Avidin (5 µg/ml in Detectionpuffer) wurde auf die jeweiligen Objektträger gegeben und diese wiederum für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Entfernen des Deckglases wurden die Präparate in einer mit Alufolie umwickelten Küvette in 4×SSC/0,1% Tween für 3×5 min gewaschen, um primäre, nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Zur Signalverstärkung wurde dann mit 200 µl biotinyliertem Anti-Avidin (10 µg/ml in Detectionpuffer), wiederum für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert, ehe wie oben in 4×SSC/0,1% Tween gewaschen wurde. Dann wurden erneut 200 µl Avidin-FITC auf die Objektträger gegeben und diese bei 37°C inkubiert. Nach dreimaliger Waschung in 4×SSC/0,1% Tween wurde anschließend noch 1×5 min in 2×SSC gewaschen, ehe die Chromosomen nun für 25 min in PJ/DAPI-Färbelösung im Dunklen inkubiert wurden. Nach kurzem Waschen in 2×SSC wurden die Präparate schließlich in 30 µl DABCO-Antifade eingedeckt. Die Objektträger wurden vor dem Fotografieren für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank liegen gelassen, um eine Stabilisierung der Fluoreszenz zu erlangen.

Blockpuffer

3% BSA

4×SSC

0,1% Tween 20

Detectionpuffer

1% BSA

4×SSC

0,1% Tween 20

2×SSC-Puffer, pH=7,0

0,03 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat

0,3 M Natriumchlorid

PJ/DAPI-Färbelösung

5 µl Propidiumiodid (1mg/ml)

5 µl DAPI (200 µg/ml)

ad 10 ml 2×SSC

2.1.5.2. Hybridisierung mit der 18S/28S und 5S rDNA-Probe

Bei der Hybridisierungen zur Lokalisierung der 18S/28S rDNA wurde das Hybridplasmid pXlr 101A verwendet. Dieses ist eine Derivat von pBR 322 (4.3 kb), in welches das gesamte rRNA-Gen (12 kb) von *Xenopus leavis* inseriert wurde. Bei der 5S rDNA Lokalisierung wurde das 5S rRNA-Gen (195 bp) von *Xenopus leavis* in pBR 322 inseriert.

## Nick-Translation der Sonden-DNA

Die Methode der Nick-Translation beruht auf der Fähigkeit der DNase I, zufällig verteilt Einzelstrangbrüche ("nicks") in doppelsträngige DNA zu machen. Die E.coli DNA-Polymerase I synthetisiert DNA komplementär zum intakten Strang in 5'→3' Richtung, wobei das 3' OH-Ende des Nicks als Primer dient. Durch die gleichzeitige Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I werden weitere Nucleotide in der Richtung der Synthese entfernt. Werden drei der vier Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP's = dATP, dCTP, dGTP) zusammen mit einem modifizierten dNTP (Biotin-16-dUTP als Ersatz für dTTP) zum Reaktionsansatz gegeben, so wird neben den unmarkierten Nucleotiden auch das markierte Nucleotid in die DNA-Probe eingebaut. Die Anzahl der Nicks in einem Molekül bestimmt die Länge der markierten Probenfragmente und kann durch die Konzentration der DNase I im Reaktionsansatz kontrolliert werden. Die optimale Fragmentlänge für in situ Hybridisierungen liegt zwischen 100 und 500 Basenpaaren. Die Nick-Translationsansätze wurden 2 Stunden und 30 Minuten in einem 15°C Wasserbad inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die NT-Reaktionsansätze auf Eis gestellt, ehe eine Kontrolle der Fragmentgröße im Agarose-Minigel erfolgte.

Nick-Translation-Reaktionsansatz

2 µg DNA-Probe

10 µl 10×NT-Puffer (0,5 M Tris/HCl, pH= 8,0; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mg/ml BSA)

10 µl 10×dNTP's (0,5 mM dATP, dCTP und dGTP)

5 µl Biotin-16-dUTP (1 mM)

1 µl β-Mercaptoethanol (1 M)

5 µl DNase I (1:1000)

2 µl DNA-Polymerase I

ad 100 µl ddH<sub>2</sub>O      =>Reaktionsansatz 2,5 h im 15°C-Wasserbad inkubieren.

## Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 2 g Agarose in 100 ml 1×TBE in der Mikrowelle aufgeschmolzen und danach auf etwa 60°C abgekühlt, ehe 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt wurden. Nach dem Gießen kam das ausgehärtete Gel in eine mit dem Laufpuffer 1×TBE gefüllte Gelkammer. 5 µl-Aliquots der nick-translatierten Probe wurden mit 4 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Bromphenolblau versetzt und 3 min bei 100°C erhitzt. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben neben dem λ-Marker (100 bp-ladder) als Kontrolle, auf das 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte hier 45 min bei 120 V. Nun wurde unter UV-Licht kontrolliert, ob der DNase I-Verdau ausreichte (Schmier an Fragmenten kleiner 500 nt und größer als 100 nt). Wenn dies der Fall war, wurde die NT-Reaktion durch Zugabe von 1 µl 10% SDS und 2 µl 0,5 M EDTA abgestoppt.

## Sephadex G 50-Säule

Die nicht eingebauten Nukleotide wurden über eine Sephadex G 50-Säule von der markierten DNA-Probe abgetrennt. Hierzu wurde der Auslauf einer 1 ml-Spritze mit Glaswolle verschlossen und die Spritze mit Sephadex G 50 aufgefüllt. Die Spritze wurde in ein Zentrifugenröhrchen gehängt und 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde noch ein bis zwei mal mit Sephadex aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zur Äquilibration 2-3 mal mit 100 µl TE-Puffer gespült. Dann wurde ein Eppendorf-Gefäß in das Zentrifugenröhrchen gestellt und die Säule hineingehängt. 100 µl des Nukleotidansatzes wurde auf die Säule aufgetragen und in das Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert. Die freien Nukleotide verblieben in der Säule und die markierte DNA wurde eluiert. Durch einen Spot-Test wurde wiederum der erfolgreiche Einbau von Biotin-16-dUTP in die Probenfragmente kontrolliert.

20 µl Hybridisierungsmix mit 20 ng an markierter Probe (18S/28S rDNA) wurden auf das vordere Drittel der denaturierten Chromosomenpräparate (siehe S. 25) gegeben, ein kleines Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Bei der Lokalisierung der 5S rRNA-Genorte wurden 300-400 ng an markierter Probe eingesetzt und es wurde über zwei Tage hybridisiert.

#### Hybridisierungsmix

*50% Formamid, 2×SSC, 20% Dextransulfat (Endkonzentration)*

*5 µl (20 ng) 18S/28S-rDNA Probe (pro Objektträger)*

*1 µl Lachstestes-DNA (10 ng/ml)*

*ad 20 µl*

*=>Ansatz zum Denaturieren der markierten Sonde 5 Minuten*

*auf 75°C erhitzen und anschließend 5 Minuten auf Eis stellen.*

#### Proben-spezifische Waschung

Mit einer feinen Uhrmacherpinzette wurde das Fixogum von den Objektträgern entfernt, bevor diese zum Ablösen des Deckglases kurz in einer Küvette mit 2×SSC bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert wurden. Die nächsten Waschschriffe erfolgten im 37°C-Schüttelwasserbad. Die Präparate wurden für 2×5 min in 50% FA/2×SSC und anschließend 5 min in 2×SSC gewaschen. Der Fluoreszenznachweis mit Avidin-FITC verlief wie bei der Lokalisierung der Telomerprobe (S. 27), allerdings war eine Amplifikation zur Signalverstärkung nur bei der Hybridisierung mit der 5S rDNA-Probe nötig.

### **2.1.6. Mikroskopische Auswertung**

Für die Hellfeldaufnahmen wurde ein Fotomikroskop III der Firma Zeiss mit einem 100xÖlimmersionsobjektiv benutzt. Die Präparate wurden mit einem Grünfilter bei einer DIN-Zahl zwischen fünf (Phasenkontrast) und sieben fotografiert. Die Fluoreszenzfotos wurden an einem Zeiss-Axiophot mit Fluoreszenzauflichtkondensator IV/FL, HBO 50W AC/Birne (Osram, Berlin) mit Ölimmersionsobjektiv (x100) und entsprechenden Sperr- und Erregungsfilter aufgenommen. DAPI-gefärbte Metaphasen wurden im UV-Licht der Wellenlänge 360-400 nm (Filterkombination: G365/FT395/LP420) fotografiert. Chromosomen, welche mit FITC/Propidiumiodid versehen waren, wurden mit UV-Licht der Wellenlänge 450-490 nm ausgewertet (Filterkombination: BP450-490/FT510/LP520).

Als Filmmaterial dienten für die Hellfeldaufnahmen sowie für einen Teil der Fluoreszenzfotos Agfa-Ortho-25-Filme, für in situ hybridisierte Präparate wurden 400/800 ASA Filme der Firma Scotch verwendet.

## **2.2. DNA-Gehaltsmessung über die Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie (Flow cytometry, FCM) ist eine relativ einfache und sensitive Technik zytogenetischer DNA-Untersuchungen. Unter Verwendung von internen Standards mit bekanntem DNA-Gehalt pro Zelle, wie z.B. Hühner- oder Forellenerythrozyten, kann der absolute DNA-Gehalt von unbekanntem Zellmaterial bestimmt werden. Zur durchflußzytometrischen DNA-Gehalts-Analyse wurde nukleäre DNA der Fischerythrozyten mit dem AT-spezifischen Fluorochrom Hoechst 33258 gefärbt. Die gefärbten Zellen durchliefen eine Messkammer, in der sie durch Licht einer bestimmten Wellenlänge stimuliert und zur Fluoreszenz angeregt wurden. Das Anregungsmaximum von Hoechst wie auch DAPI liegt nahe dem UV-Bereich, um  $\lambda = 360$  nm, das emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht im blauen Bereich, bei  $\lambda = 460$  nm. Bei der Benutzung des Partec CA II-Durchflußzytometers (Partec GmbH, Münster) mit einer Quecksilberlampe wurde folgende Filterkombination empfohlen: KG 1, BG 38 und UG 1 zur Anregung; TK 420 als Dichromatikspiegel und GG 435 als Barrierenfilter. Eine Quarz-Objektivlinse (Partec GmbH) zeigte sich geeignet, den Fluoreszenzhintergrund zu reduzieren. Das ausgesandte Fluoreszenzlicht wird registriert, elektronisch verarbeitet und quantitativ in Form elektronischer Impulse ausgegeben. Hühnererythrozyten (CRBC) wurden zur Eichung des Flow Zytometers und als interner Standard verwendet. Der absolute DNA-Gehalt der CRBC beträgt laut Literatur 2,5 pg/Nukleus (Vinogradov, 1998). Zwei bis drei Tropfen Blut wurden in 3 ml 1xPBS aufgenommen und kurz abzentrifugiert. Die so gesammelten Erythrozyten wurden ohne Pepsinbehandlung in 2 ml Hoechst 33258 aufgenommen und nach 1-2 h direkt vermessen, bzw. sofort in 2-3 Tropfen Einfriermedium bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Als Standard wurden 100  $\mu\text{l}$  heparinisierte Erythrozyten eines weiblichen Haushuhns (*Gallus gallus*) ebenfalls in 3 ml 1xPBS aufgenommen, abzentrifugiert und mit Hoechst 33258 gefärbt. Hühnerzellen wurden dann bei der eigentlichen Messung mit dem Farbstoff so verdünnt, dass in etwa gleiche Zelldichten vorlagen. Mindestens 10.000 Zellen sollten bei der Analyse die Zellkammer durchlaufen haben.

### Hoechst-Färbelösung

10 ml Tris 1M (pH=7,4)

10 ml NaCl (1,54 M)

1 ml MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

1 ml CaCl<sub>2</sub> (0,1 M)

1 ml 20 % BSA

1 ml NP<sub>40</sub>

ad 100 ml H<sub>2</sub>O

+ 2 µg/ml Hoechst (Stammlösung: 2 mg/ml)

## **2.3. Molekulare Charakterisierung der B Chromosomen**

### **2.3.1. Extraktion Genomischer DNA**

#### 2.3.1.1. Methode

Die bei -80°C gelagerten Fischorgane wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren, ehe sie in ein geeignetes Homogenisatorgefäß mit 1 ml Extraktionspuffer vorgelegt wurden. Die Zerkleinerung des Materials erfolgte durch Auf- und Abbewegung der Pistille unter leichter Drehung. Nach Überführung der Gewebestandteile in ein Eppendorf-Gefäß wurde das Pottergefäß mit 1 ml Extraktionspuffer ausgespült, es wurde nochmals homogenisiert und das zerkleinerte Restgewebe in das selbe Eppendorfgefäß gegeben. Nun wurde, unter gelegentlichem Schwenken der Reaktionsgefäße, 3 h bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Bei der anschließenden Phenolextraktion wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße in ein SST-Röhrchen gekippt. Nach Zugabe von 0,5 Volumen Phenol kamen die gut verschlossen Röhrchen für 20 min auf den Schwenker. Nun erfolgte die Zugabe von 0,5 Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Nach weiteren 20 min Schütteln wurde 20 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Es wurden noch einmal 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol zugefügt und abzentrifugiert. Der so gewonnene klare Überstand kam nun in ein autoklaviertes Röhrchen. Die Fällung der DNA erfolgte mit 2,5 Volumen 100% EtOH. Es wurde nur kurz auf Eis inkubiert, bevor die DNA mittels Glasstäbchen aufgewickelt wurde. Die Stäbchen wurden nach dem Wickeln 1-2 mal in 70% EtOH eingetaucht und kurz zum Abtrocknen stehen gelassen. Nun kamen die Glashäkchen in Reaktionsgefäße mit 1 ml TE-Puffer. Nachdem sich die DNA gelöst hat (1-7 Tage) erfolgte eine exakte Konzentrationsbestimmung.

TE-Puffer

10 mM Tris-Cl, pH=8,0

1 mM EDTA, pH=8,0

Extraktionspuffer

200 mM NaCl

100 mM EDTA, pH=8,0

0,2 % SDS

100 µg/ml Proteinase K (=&gt;immer frisch zusetzen!)

2.3.1.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA in wässriger Lösung wird bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt, wobei eine  $A_{260}$ -Einheit 50 µg doppelsträngiger DNA entspricht. Ferner gibt der Quotient der Absorption  $A_{260}/A_{280}$  die Reinheit der gelösten DNA wieder. Optimal gelöste, reine doppelsträngige Nukleinsäure sollte einen Wert zwischen 1,8-2,0 aufzeigen.

2.3.1.3. Bestimmung der DNA-Konzentration aus dem Agarosegel

Bei dieser Methode wird ein Marker mit bekannter DNA-Konzentration neben den zu ermittelten DNAs auf einem 0,8% Gel aufgetrennt. Durch Verwendung eines speziellen Softwareprogramms (Easy plus Rev 3.16 von Herolab, Wiesloch) kann nun die Konzentration der unbekannt genomsichen DNA ermittelt werden.

**2.3.2. Herstellung der DNA-Sonde**2.3.2.1. Laser-Mikrosezierung

„UV-Laser Microbeam Microdissection (LMM)“ in Verbindung mit „Laser Pressure Catapulting (LPC)“ ist eine relativ neue Methode, die zur Herstellung Chromosomen-spezifischer DNA-Sonden dient (Schermelleh et al., 1999). Sie hat im Vergleich zur herkömmlichen Glas-Nadel Mikrodisektion den Vorteil, dass es zu keinerlei mechanischem Kontakt mit der Objektträgeroberfläche kommt und somit das Problem einer Kontamination mit unerwünschten Material umgangen werden kann. Der „PALM Robot-MicroBeam“ ist eine Kombination aus einem UV-Laser Mikrostrahl und einem motorisierten, computergesteuerten Mikroskoptisch sowie Mikromanipulator (Robot-Stage und Robot-Manipulator). Voraussetzung für eine präzise Lasermikromanipulation ist die exakte Übereinstimmung der Laserfokusslage mit dem optischen Fokus des Mikroskops. So können dann berührungslos einzelne Chromosomen oder Chromosomenbereiche geschnitten und die dissezierten Teilchen mittels LPC präpariert werden. Die Kooperation zur Durchführung des Laserversuchs erfolgte mit Dr. Stefan Thalhammer und dem Institut für Kristallographie der LMU München.

Nach dem Auftropfen der Chromosomensuspension auf ultradünnen Membranen erfolgt die wahlweise Zerstörung („Ablation“) von unerwünschtem genetischen Material um das Zielchromosom herum. Dies geschieht mit relativ niedriger Laserenergie von 0,2-0,3  $\mu\text{J}/\text{Puls}$ . Das zu untersuchende Chromosom wird nun von den übrigen durch Laserschneiden der Membran getrennt und zwar mit mittlerer Laserenergie von 0,5-0,6  $\mu\text{J}/\text{Puls}$ . Danach wird das Chromosom-Membranareal durch einen „gezielten Laserschuß“ unterhalb der Folienebene und mit einer hohen Energie von 1-2  $\mu\text{J}/\text{Puls}$  in ein geeignetes Reaktionsgefäß katapultiert, über DOP-PCR (degenerated oligonucleotide primed PCR) vervielfältigt und mit Biotin-16-dUTP markiert. Isolierte und markierte DNA-Sonden wurden mittels in situ Hybridisierung nach herkömmlichen Protokoll auf ihre chromosomale Spezifität getestet.

<u>DOP-PCR-Protokoll</u>	<u>PCR</u>		
60 mM Tris-HCl (ph=8,5)	96°C	3'	
15 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	96°C	1'	
0,05% W1-Detergent	30°C	1'	8x
200 $\mu\text{m}$ dNTPs	72°C	2'	
1,5 $\mu\text{m}$ 6MW (DOP-Primer, 50 pmol/ $\mu\text{l}$ )			
1,5 U Taq-Polymerase	94°C	1'	
	50°C	1'	35X
	72°C	2'	
	72°C	5'	

#### 2.3.2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

##### Allgemeines zur Methode

Diese von Vos et al. (1995) beschriebene Methode ist eine sensitive DNA-Fingerprinting Technik zur Untersuchung von DNA jeglichen Ursprungs und Komplexität. Hunderte von Genorte können so, aufgrund dieser stringenten und wiederholbaren PCR-Methode, aus bisher unbeschriebenen Genomen erfasst werden. Im Falle von *Alburnus alburnus* konnten so komplexe Bandenmuster, welche charakteristisch für die untersuchten Individuen waren, erzeugt werden, mit dem Ziel, Unterschiede zwischen Tieren mit und ohne überzähligen Chromosom aufzudecken.



Diese 50 µl Reaktionsansätze wurden danach mit 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH=8,0 im Verhältnis 1:10 verdünnt und können bei –20°C zwischengelagert werden.

#### PCR

In der ersten PCR-Reaktion (20 µl Reaktionsvolumen) werden nun 5 µl des Verdau-Ligationansatzes in 1×PCR-Puffer (10 mM Tris-Cl pH=8,85, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100) mit je 30 ng der +1-Primer (EcoRI+A, MseI+G), 200 µM der 4 dNTPs und 0,4U Taq Polymerase zusammengefügt.

<u>Präselektive Vervielfältigung</u>	94°C	120"	1 Zyklus
	94°C	30"	
	56°C	60"	20 Zyklen
	72°C	60"	
	72°C	120"	1 Zyklus

Nach erneuter 1:10 Verdünnung werden wiederum 5 µl als Matrize in die zweite PCR, mit 30 ng eines Mse+3-Primers und 5 ng des radioaktiv markierten EcoRI+3-Primers, eingesetzt (20 µl Gesamtvolumen).

<u>Selektive Vervielfältigung</u>	94°C	120"	1 Zyklus
	94°C	30"	
	65°C	30"	12 Zyklen
	72°C	60"	1 Zyklus
	94°C	120"	1 Zyklus
	94°C	30"	
	56°C	30"	24 Zyklen
	72°C	120"	1 Zyklus

Nach dem 12 Zyklen lang die Annealingtemperatur jeweils um 0,7°C pro Zyklus verringert wurde, folgten nochmals 24 Zyklen mit exakt 56°C Annealingtemperatur. Der EcoRI+3-Primer (500 ng) wurde vorher in 50 µl Reaktionsvolumen mit 10U T4 Polynukleotidkinase und 100 µCi γ<sup>32</sup>P-ATP in 1×Kinasepuffer radioaktiv markiert.

Radioaktiv markiert und zur Anwendung kamen 8 EcoRI+3-Primer: ACC, AGC, AGG, ACT, ATA, AGA, AAC und ATG und wurden mit 8 MseI+3-Primer, GTG, GAG, GGT, GTC, GCA, GAA, GCC und GAT kombiniert. Alle Amplifikationsschritte erfolgten im Thermal Controller PTC-100 (MJ Research, Inc., Massachusetts, USA).

### Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGA)

Nukleinsäureproben bis zu 1 kb können mit dieser Methode aufgetrennt werden. Der zur Gellösung zugefügte Harnstoff dient der Verhinderung von DNA-Sekundärstrukturen, so dass die Restriktionsfragmente mit einer zur ihrer Länge indirekt-proportionalen Wanderungsgeschwindigkeit die Gelmatrix durchlaufen. Nach erfolgter Zugabe von APS und TEMED zur Gellösung wurde diese, möglichst unter Vermeidung von Luftblasen, zwischen zwei saubere Glasplatten gegossen. Nach dem Einsetzen der Taschenformer und dem Auspolymerisieren der Gelmatrix wurden die Platten vertikal in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Die Reaktionsproben wurden mit dem gleichen Volumen (20 µl) Ladepuffer (98% Formamid, 10 mM EDTA pH=8,0 sowie jeweils 0,05% an Bromphenolblau/Xylencyanol als Markerbanden) 5 min bei 94°C denaturiert und je 3 µl auf ein 5% Polyacrylamidgel (30×40 cm) gegeben. Die ca. 2,5 stündige Auftrennung der Proben erfolgte bei 35 W. Nach dem Vakuumtrocknen wurde eine Autoradiographie erstellt.

### Gellösung (5% PAGE)

*5% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)*

*0,5×TBE*

*0,024% TEMED*

*0,1% APS*

*7 M Harnstoff*

### Bandeneluierung und Reamplifizierung

Durch passgenaues Auflegen und Fixieren des Röntgenfilms auf dem Polyacrylamidgel konnten signifikante Banden mittels einer dünnen Stecknadel durchgestochen und somit markiert werden. Mit einem scharfen Skalpell wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und in einem 50 µl Reaktionsansatz bei 56°C Annealingtemperatur reamplifiziert (40 Zyklen). PCR-Produkte wurden auf einem 1,5% Agarosegel überprüft und aus einem 0,8% Gel, mit 1×TAE als Puffer, ausgeschnitten und über Nucleospin-Säulen aufgereinigt (QUIAEX II von Quiagen).

### 2.3.3. Klonierung rekombinater DNA in E.coli

Eluierte PCR-Fragmente wurden in den Vektor pUC18 ligiert (SureClone™ Ligation Kit/Pharmacia) und in kompetenten Bakterienzellen kloniert. Ligiert wurde unter Ausnutzung der 3'-5' Exonukleaseaktivität der Klenow Polymerase (entfernt 3'-Überhänge) sowie der T4 Polynukleotidkinase (phosphoryliert 5'-Enden der Fragmente). Nach einer Phenol/Chloroform Extraktion und Aufreinigung über Microspin-Säulen konnten die PCR-Produkte in den Vektor pUC18 ligiert werden. Die Ligation erfolgte 1-2 h bei 16°C in einem 20 µl Gesamtvolumen.

#### 2.3.3.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Hitzeschock-Transformation

Da die natürliche Aufnahme von Plasmiden durch Bakterien sehr gering ist, kann durch die vorherige Behandlung der Zellen mit divalenten Kationen eine Transformationsrate von bis zu  $10^7$  Transformanten pro µg Plasmid erzielt werden.

50 ml SOB-Medium wurden mit 2 ml E.coli XL-1 Blue-Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,4-0,7 bei 550 nm kultiviert. Nach Abkühlen auf Eis wurde 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, Zellen in 4-5 ml eiskaltem TFB-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach erneuter Aufnahme in ausreichend TFB-Puffer ( $OD_{600} \times 6$  ml) kamen die Zellen für 15-30 min auf Eis. Zweimal wurden je 35 µl DnD pro ml Medium hinzugefügt und die Bakterien verblieben für weitere 15 min auf Eis. Bei weiterer Lagerung auf Eis sollten die jetzt transformations-kompetenten Zellen binnen 24 h verwendet werden.

#### SOB-Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefe-Extrakt

2,5 mM KCl

10 mM NaCl

=>auf pH=7,6 mit KOH einstellen.

#### DnD

1 M DTT

90% DMSO

10 mM KAc, pH=7,5

#### TFB-Puffer

100 mM KCl

45 mM  $MnCl_2 \times 4H_2O$

10 mM  $CaCl_2 \times 2H_2O$

3 mM Hexamin-Co(III)Chlorid

10 mM MES (pH=6,3 mit KOH)

### 2.3.3.2. Hitzetransformation

In sterilen Reaktionsgefäßen wurden je 10 µl vom Ligationsansatz mit 200 µl kompetenten Zellen versehen und mindestens 10 min auf Eis gelagert. Nun wurden die Zellen einem 90'' Hitzeschock ausgesetzt bevor sie sofort für weitere 2 min auf Eis gestellt wurden. Nach Zugabe von 1,3 ml SOB-Medium wurden die transformierten Bakterienzellen 30-60' unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert und schließlich kurz abzentrifugiert. Nach der Aufnahme in 100 µl SOB-Medium wurden sie in zwei verschiedenen Verdünnungen (10%/90%) mit einem Drygalski-Spatel auf vorgewärmten LB<sup>Amp</sup>-Platten (mit X-Gal/IPTG-Selektionierung) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### LB-Medium

10 g Tryptone

5 g Yeast Extract

10 g NaCl

900 ml H<sub>2</sub>O, mit NaOH auf pH=7,5

=> ad 1 l mit H<sub>2</sub>O, dann sofort autoklavieren.

### 2.3.3.3. Plasmid-Präparation

Einzelkolonien wurden von LB<sup>Amp</sup>-Platten gepickt und in 3-5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C, unter leichtem Schütteln, inkubiert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wird der „Plasmid Spin Prep Kit“ von Quiagen laut Protokoll des Herstellers angewandt. DNA wird mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH=8,0 eluiert. Mittels eines *EcoRI/BamHI*-Doppelverdaus konnte das klonierte DNA-Fragment aus pUC18 ausgeschnitten und für die direkte Sequenzierung, die in situ Hybridisierung und die Southernblot-Analysen verwendet werden.

### **2.3.4. Sequenzierung**

Über die AFLP-Analyse erhaltene DNA-Proben der B Chromosomen von *Alburnus alburnus* wurden direkt oder aus dem Vektor pUC18 mit dem ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaction kit (PE Biosystems) nach entsprechenden Anweisungen sequenziert.

### **2.3.5. FISH mit der „B-Sonde“**

Mehrere Tage alte Chromosomenpräparate wurden in 70% Formamid bei 70°C eine Minute lang denaturiert und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. 100-200 ng an markierter B chromosomaler DNA im Vektor pUC18 wurde in 5 µl Aqua dest. aufgenommen und mit 15 µl 50% Hybridisierungsmix (S. 30) versehen. Nach 10 minütigem Erhitzen auf 75°C kam die Probe kurz auf Eis. Der Mix wurden auf das vordere Drittel der denaturierten Chromosomenpräparate gegeben, ein kleines Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C, meist über 2 Tage, in einer feuchten Kammer. Die Präparate wurden 1×5 min in 2×SSC bei RT sowie 3×5 min bei 37°C in selbigem Puffer gewaschen. Die weitere Entwicklung war identisch mit der bei den anderen in situ Hybridisierungen.

### **2.3.6. Southern blot-Analysen**

#### 2.3.6.1. Allgemeines

Diese von Southern (1975) beschriebene DNA-Transfertechnik erlaubt den Nachweis bestimmter Sequenzen innerhalb genomischer DNA, welche zuvor mit Restriktionsenzymen gespalten wurde. So entstandene Fragmente wurden der Größe nach über horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, denaturiert und vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Zur radioaktiv markierten Sonde komplementäre Sequenzen können nun durch Autoradiographie detektiert werden. Jeweils 10 µg an genomischer DNA wurde mit mehreren verschiedenen Restriktionsenzymen (10U/µg) verdaut und in einem 1,0 bzw. 1,4% Agarosegel 16-20 Stunden bei 1,5 V/cm aufgetrennt. Das Gel wurde danach 30 min in Ethidiumbromid, unter leichtem Schütteln und unter Alufolie, gefärbt. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. wurde es unter UV-Licht analysiert und fotografiert. Zum Depurinisieren wurde es nun 2×15 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Die DNA im Gel wurde, nach kurzem Waschen in H<sub>2</sub>O, 2×15 min mit 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH denaturiert. Der auf Kapillarkräften beruhende Transfer der DNA auf die Nylonmembran, erfolgte mit zwei feuchten Whatman-Papieren, welche mit beiden Enden in eine Wanne mit 0,4 M NaOH eintauchten. Hierauf wurde das Gel möglichst luftblasenfrei platziert. Auf das Gel kam die Nylonmembran und hierauf einige Lagen feuchter und trockener Whatman-Papiere. Mehrere Lagen saugfähiger Papiere sowie eine beschwerte Glasplatte bildeten den Abschluss. Der alkalische DNA-Transfer auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht. Nach dem Entfernen der Papiere konnten die Geltaschen auf der Membran markiert werden.

Nach kurzem Schwenken des Filters in 2×SSC wurde die DNA auf der Membran UV-fixiert. Nun konnte man sich das Gel noch einmal unter UV-Licht betrachten und sich vergewissern, dass auch die gesamte DNA auf den Filter transferiert wurde.

### 2.3.6.2. Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

In der nach Feinberg & Vogelstein (1983) beschriebenen Methode lagert sich ein Gemisch vieler verschiedener Hexanukleotide spezifisch an Zielsequenzen in der DNA an. Bereiche dazwischen werden von der DNA-Polymerase I aufgefüllt und dadurch mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markiert. 100 ng des zu markierenden DNA-Fragments wurden in 33  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen in einem Eppendorfreaktionsgefäß 10 min bei 95°C aufgeschmolzen. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  OLB-Mix wurde 1 min weiterdenaturiert ehe, nach kurzer Abkühlung auf Eis, 3  $\mu\text{l}$  BSA (5 mg/ml) hinzugefügt wurden. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert bevor er im Isotopenlabor mit 3  $\mu\text{l}$  (30  $\mu\text{Ci}$ )  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und 2U Klenow-Polymerase komplementiert wurde. Nach 3 stündiger Markierung auf dem 37°C-Wärmeblock wurden noch 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierungsmix hinzugefügt und es wird 10 min im 95°C-Wasserbad aufgeköcht. Einen Tag vor der eigentlichen Hybridisierung wird der Filter mit einem Hybridisierungsmix aus 50% Formamid und mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Kalbsthymus-DNA, welches der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen diene, bei 42°C vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung mit der markierten Probe erfolgt danach in 4 ml Hybridisierungsmix mit denaturierter Sonden-DNA. Bei der nun folgenden Filterwaschung wird die radioaktive Hybridisierungslösung vorsichtig abgekippt und der Filter kurz in 2×SSC geschwenkt bevor er 20 min bei 42°C in 2×SSC/1% SDS, in der Röhre, gewaschen wird. Hieran schloss sich dann meist ein niedrigstringenter Waschschrift bei 50°C in 1×SSC/1% SDS an, bevor evt. stringenter bei 63°C gewaschen werden musste. Nach erneutem kurzen Spülen in 2×SSC wird der Filter feucht eingeschweißt und in einer Kassette bei –80°C exponiert.

#### OLB-Mix

- Lösung A:*            1 ml 1,25M Tris-HCl, pH=8,0/0,125 M MgCl<sub>2</sub>  
                          18  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol  
                          je 5  $\mu\text{l}$  dATP, dGTP, dTTP (0,1 M in TE)
- Lösung B:*            2 M Hepes, pH=6,6
- Lösung C:*            OD<sub>260</sub> 90/ml Hexanukleotide in TE

Hybridisierungsmix*50% Formamid**0,1% Na-Pyrophosphat**5×SSC**5×Denhardt's**1% SDS**50 mM Tris-HCl, pH=7,5**100 µg/ml Kalbsthymus-DNA***2.3.7. Flossentest**

Diese minimal-invasive Technik soll dem schnellen und harmlosen Auffinden von Fischen mit überzähligen Chromosomen dienen. Ein kleines Stück Flossengewebe wurde abgeschnitten, in 100 µl Lösung 1 vorgelegt und mit einem kleinen Potter zerkleinert. Nach 15 minütigem Kochen wurde der Ansatz auf RT abgekühlt. Nun wurden 100 µl Lösung 2 hinzugefügt und die Chelex-Kügelchen immer wieder aufgeschüttelt. Nach 15 minütigem Inkubieren bei RT, unter gelegentlichem Schütteln, wurde danach wiederum 15 Minuten aufgeköcht. Die so extrahierten Flossen-DNAs können nun bei –20°C zwischengelagert werden. Vor der eigentlichen PCR sollten die Proben allerdings noch 10 Minuten aufgeköcht und anschließend bei 13000 rpm, zum Entfernen der Chelex-Kügelchen, abzentrifugiert werden.

Lösung 1 (100 mM NaCl, 0,5% Sarcosyl)*500 mg N-Lauroylsarcosine**2 ml 5 M NaCl**ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O**=> autoklavieren*Lösung 2 (20% Chelex in H<sub>2</sub>O)*20 g Chelex**100 ml H<sub>2</sub>O**=> ü. N. quellen lassen*

<u>PCR-Programm</u>			<u>PCR-Ansatz (25 <math>\mu</math>l)</u>	
94°C	180''	1 Zyklus	$H_2O$	18,15 $\mu$ l
94°C	30''		10xPuffer	2,5 $\mu$ l
55°C	30''	33 Zyklen	$MgCl_2$ (50 mM)	0,75 $\mu$ l
72°C	30''		dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
72°C	300''	1 Zyklus	primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
			primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
			Taq-Pol	0,1 $\mu$ l
			DNA	1 $\mu$ l

forward primer

5'-TGA GTC CTG AGT AAG CAC CA-3'

reverse primer

5'-TCG GAA ATC AAT ACA GAA CC-3'

## Chemikalienanhang

<i>Agfa, Leverkusen:</i>	- Agfa-Ortho-25-Filme
<i>Bio Labs, Schwalbach:</i>	- DNA-Polymerase/DNase I
<i>Boehringer, Mannheim:</i>	- Ampicillin (25 mg/ml)
	- Biotin-16-dUTP
	- Nukleotide
	- Restriktionsenzyme
	- Streptavidin-Alkalische-Phosphatase
	- Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
<i>DIFCO, Detroit:</i>	- Trypton
<i>Fluka, Buchs:</i>	- Formamid
<i>Gibco BRL:</i>	- 5-Bromdesoxyuridin (BrdU)
	- Colcemid (fertige Gebrauchslösung)
	- Trypsin-EDTA
	- Yeast Extract
<i>Marabu, Hamm:</i>	- Fixogum
<i>Merck, Darmstadt:</i>	- Ameisensäure, 98-100%ig
	- Bariumhydroxid
	- Chromschwefelsäure
	- Chloroform
	- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	- Essigsäure
	- D(+)-Glucose, wasserfrei
	- Gelatine
	- Giemsa-Stammlösung
	- Isoamylalkohol
	- Kaliumchlorid
	- Kalium-di-hydrogenphosphat
	- Lithiumchlorid
	- Magnesiumchlorid
	- Methanol absolut
	- Natriumchlorid
	- Natriumcitrat
	- Saccharose

---

	- Salzsäure
	- Silbernitrat
	- tri-Natriumcitrat-Dihydrat
<i>Pharmacia, Uppsala:</i>	- Dextran-Sulfat
	- Sephadex G 50
	- Telomer-Primer (TAACCC) <sub>7</sub> und (GGGTTA) <sub>7</sub>
<i>Riedel-de Haen, Hannover:</i>	- Pepsin
<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe:</i>	- Ethanol 99,8%
	- Phenol
<i>Serva, Heidelberg:</i>	- BSA ( <b>B</b> ovines <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin)
	- Colchizin
	- DAPI (4' -6' - <b>d</b> iamidino-2- <b>P</b> henylindol)
	- Dodecylsulfat · Na-salt (SDS)
	- Distamycin A-HCl
	- 2-Desoxythymidin (dT)
	- EDTA/Ethylendiamine-tetraacetic acid
	- Ethidiumbromid
	- Mithramycin A
<i>Sigma, Deisendorf:</i>	- BCIP
	- β-Mercaptoethanol
	- E.coli tRNA/E.coli-DNA
	- Nonidet P-40
	- NBT
	- Quinacrin mustard
	- Salmon Testes DNA
	- Tween 20
<i>USB, Buckinghamshire U.K.:</i>	- Tris NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>
<i>Vector, Peterborough U.K.:</i>	- Fluorescein Avidin
	- Biotinylated anti-Avidin

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Zytogenetische Untersuchungen

#### 3.1.1. Häufigkeit der B Chromosomen in den untersuchten Populationen

Im Jahr 1999 konnten 74 Individuen von *Alburnus alburnus* aus dem Edersee (bei Kassel) auf das Vorhandensein überzähliger Chromosomen untersucht werden. Die Standard-Giemsafärbung mitotischer Chromosomen zeigte, dass 11% der Fische 51 Chromosomen aufwiesen und die übrigen 89% die übliche diploide Chromosomenzahl von  $2n=50$  besaßen. Im Jahr 2000 konnte ein völlig anderer Befund dokumentiert werden. Von 54 analysierten Tieren wiesen 56% kein B Chromosom auf, 40% hatten ein überzähliges Chromosom und 4% der Fische sogar zwei übergroße B Chromosomen. Die zweite Gruppe von *Alburnus alburnus* stammte aus einer Population aus dem Main (bei Würzburg). Sowohl die 76 Fische, welche 1999 gefangen und untersucht wurden, als auch die 25 Tiere von 2000 wiesen eine B Chromosomenhäufigkeit von 11% auf. Auch die 24 karyologisch untersuchten Fische aus der Elbe (bei Dresden) im Jahr 1999 zeigten, dass 11% der Individuen ein zusätzliches Chromosom besaßen. Von den schließlich im selben Jahr aus der Donau (bei Passau) gefischten 49 Individuen von *A. alburnus* wiesen lediglich 4% der Tiere ein überzähliges Chromosom auf. Die Frequenz des überzähligen Chromosoms liegt somit zwischen 4 und 40% in den vier verschiedenen untersuchten Populationen (Tabelle 1). Tiere, die ein oder zwei zusätzliche auffällig große Chromosomen besaßen, enthielten diese in sämtlichen analysierten Metaphasen. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Individuen mit einem B Chromosom entdeckt, aber nur zwei weibliche Fische mit jeweils zwei überzähligen Chromosomen. Das Auftreten eines überzähligen Chromosoms bei *A. alburnus* ist somit nicht geschlechtsbezogen. Es wurden in keinen der vier untersuchten Gewässern Fische mit mehr als zwei B Chromosomen entdeckt.

Population	Jahr	Anzahl der untersuchten Tiere	Zahl der B Chromosomen	Frequenz der B Chromosomen (%)
Edersee (Kassel)	1999	74	1	11
	2000	54	1; 2	40; 4
Main (Würzburg)	1999	76	1	11
	2000	25	1	11
Elbe (Dresden)	1999	24	1	11
Donau (Passau)	1999	49	1	11

**Tabelle 1:** Anzahl der untersuchten Tiere und Jahr des Fangens, deren Herkunftsorte, Zahl und Frequenz der B Chromosomen.

### 3.1.2. Chromosomenbänderungen und FISH-Analysen

Mitotische und meiotische Chromosomen von *Alburnus alburnus* wurden mittels konventionellen Bänderungstechniken als auch durch Fluoreszenz in situ Hybridisierungen detailliert untersucht.

Die Spezies *Alburnus alburnus* zeichnet sich durch eine diploide Chromosomenanzahl von  $2n=50$  A Chromosomen sowie 0-2 mitotisch stabilen B Chromosomen aus (Abb. 4). Die meta- bis akrozentrischen Chromosomen wurden nach abnehmender Größe angeordnet. Der mittels Standard-Giemsafärbung dargestellte Karyotyp der A Chromosomen ist gekennzeichnet durch 14 metazentrische, 14 submetazentrische 14 subtelozentrische und 8 telozentrische Chromosomen (Abb. 4a). Die Zahl der Chromosomenarme, der N.F.-Wert (nombre fundamental) liegt zwischen 92 und 96, wegen des Vorkommens von ein oder zwei sehr großen überzähligen Chromosomen in zwei verschiedenen Morphologien (Abb. 4b, c). Die B Chromosomen sind ungefähr 1,5 mal größerer als das größte, 4,4  $\mu\text{m}$  messende A Chromosomenpaar und aufgrund ihrer Kompaktheit deutlich gefärbt. Das kleinere metazentrische überzählige Chromosom ( $B_m$ ) misst 5,5  $\mu\text{m}$ , das größere submetazentrische ( $B_s$ ) ist 6,5  $\mu\text{m}$  lang. Der eingezeichnete Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ . Heteromorphe Geschlechtschromosomen sind bei *Alburnus alburnus* nicht erkennbar.

In den Abbildungen 4d und e wurden die Chromosomen von *Alburnus alburnus* der C-Bänderung unterzogen. Diese Technik diente der Darstellung des konstitutiven Heterochromatins und ist in ihrer Anwendung bei Fischen oft schwierig. Das konstitutive Heterochromatin befindet sich in den zentromerischen bzw. perizentromerischen Bereichen der A Chromosomen sowie über der gesamten Länge der beiden B Chromosomen ( $B_s$ ,  $B_m$ ). Diese sind deshalb deutlich darstellbar, offenbar komplett heterochromatisch und erscheinen somit dunkel. Größere Heterochromatinblöcke findet man des weiteren v.a. in den perizentromerischen Regionen der Chromosomenpaare 1, 2, 5, 8 10, 20 und 24. Interstitielle C-Banden sind, genauso wie telomerische Heterochromatinbanden, mittels herkömmlicher C-Bänderung nicht zu erkennen.

Die Nukleolus Organisator Regionen (NOR) konnten mittels Silberfärbung eindeutig der Telomerregion des subtelozentrischen Chromosomenpaars 16 zugeordnet werden (Abb. 4f). Die offensichtliche NOR-Größenvariation zwischen den homologen Chromosomen kommt wohl durch Unterschiede in der Zahl der 18S/28S rRNA-Gene oder durch differentielle Transkriptionsaktivität zu stande. Zusätzliche aktive NOR konnten bislang weder auf einem weiteren A Chromosom noch auf dem B Chromosom entdeckt werden.



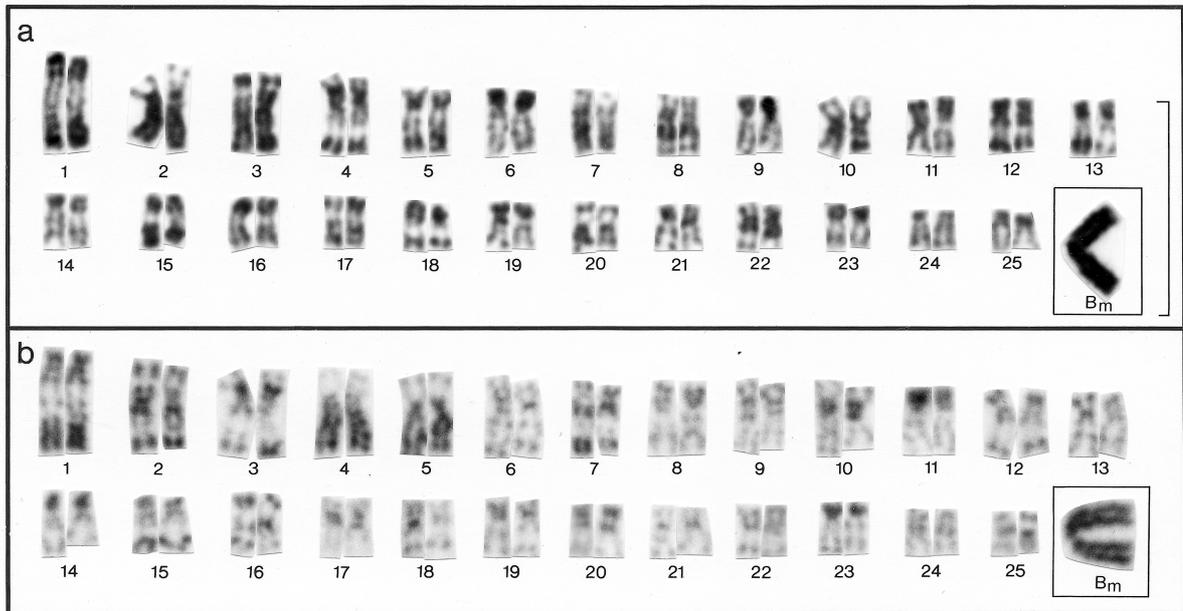
**Abb. 4:** *a-c*: Karyotypen von *Alburnus alburnus* mit 0, 1 und 2 B Chromosomen nach Standard-Giemsafärbung. Es können zwei morphologisch verschiedene überzählige Chromosomen (B<sub>s</sub>, B<sub>m</sub>) unterschieden werden. *d, e*: C-Bänderung. Beide B Chromosomen sind komplett heterochromatisch. *f*: Silberfärbung. Das Chromosomenpaar 16 ist Träger der NOR. Maßstab: 10 µm.

Gibt man das Thymidinanalogon BrdU zu lebenden, mitotisch aktiven Zellen, die nicht synchronisiert wurden, können verschiedene Stadien des BrdU-Einbaus sichtbar gemacht werden. Der Effekt der FPG-Technik beruht auf der geringeren Färbeintensität der Chromosomensegmente, welche BrdU inkorporiert haben. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigen die BrdU-substituierten Chromosomenbereiche eine helle Färbung und haben ihre Replikation in der ersten Hälfte der S-Phase bereits abgeschlossen. Spät replizierende Segmente sind mit Desoxythymidin markiert, welches gegen Ende der S-Phase zur Verfügung stand und dunkel angefärbt. Das Resultat ist ein multiples Bandenmuster, welches immer mit dem Zeitpunkt der BrdU-Inkorporation korreliert (Schmid & Steinlein, 1991).

Die Kultur von Zellen der Schwimmblase gestaltete sich erwartungsgemäß schwierig. Schlechtes Auswachsen der Fibroblasten sowie ein niedriger Mitoseindex sind zu erwähnen. Da auch die Frequenz von Fischen mit B Chromosom (anfänglich nur 11%) sehr niedrig war, konnten Zellkulturabbrüche von einem Tier mit überzähligem Chromosom erst nach 6 Monaten und in einer hohen Passage (20) erzielt werden. Durch die qualitativ gute BrdU-Replikationsbänderung konnten schließlich homologe Chromosomen eindeutig identifiziert werden. Neben der genauen Beschreibung der A Chromosomen, bei der feine Unterschiede zwischen den Chromosomenpaaren deutlich wurden, ist auch das aufgrund seiner heterochromatischen Natur spät replizierende überzählige Chromosom gut erkennbar. Die Zellen wurden vor den Abbrüchen nicht synchronisiert.

Die Abbildungen 5a, b zeigen Chromosomen von *Alburnus alburnus* nach der BrdU-Replikationsbänderung. Die Abb. 5a zeigt ein frühes bis mittleres DNA-Verdopplungsstadium. Viele Chromosomenregionen erscheinen dunkel, haben also überwiegend Desoxythymidin inkorporiert. Nur wenige helle, BrdU-einbauende chromosomale Abschnitte können dokumentiert werden. Das heterochromatische und damit spät-replizierende B Chromosom hat sehr viel Desoxythymidin eingebaut. Die Abb. 5b zeigt ein spätes Replikationsstadium. Viele der A Chromosomen zeigen helle, BrdU-einbauende Chromosomenregionen auf. Nur wenig Desoxythymidin, welches erst spät zur Verfügung stand, wurde inkorporiert. Auch das aufgrund seiner heterochromatischen Natur spät-replizierende überzählige Chromosom erscheint wiederum dunkel. Bereiche, welche mit Desoxythymidin markiert sind findet man in diesem Replikationsstadium zunehmend in den Zentromerregionen der A Chromosomen. Über die Replikationskinetik lassen sich die homologen Chromosomen zweifelsfrei unterscheiden und zum Karyotyp anordnen. In beiden Abbildungen können ferner die B Chromosomen aufgrund der dunklen Anfärbung dokumentiert werden.

Größere Heteromorphismen zwischen den homologen Chromosomen scheinen nicht zu bestehen. Die Detailanalyse lässt ferner einzelne Banden in jedem A Chromosomenpaar erkennen. Geschlechtsspezifische Replikationsbanden können nicht dokumentiert werden.



**Abb. 5:** Karyotypen von *Alburnus alburnus* nach BrdU-Replikationsbänderung.

*a:* Frühes bis mittleres BrdU-Inkorporations-Stadium. Die Chromosomen haben viel Desoxythymidin und nur wenig BrdU eingebaut. Das heterochromatische, spät-replizierende B Chromosom erscheint sehr dunkel.

*b:* Spätes Stadium. Die A Chromosomen haben überwiegend BrdU inkorporiert und zeigen viele helle Abschnitte. Nur die Regionen die bis jetzt noch nicht repliziert haben, konnten Desoxythymidin einbauen, darunter hauptsächlich die Zentromerregionen der A Chromosomen. Auch das überzählige Chromosom erscheint wieder deutlich dunkel. Durch die Replikationsbänderung lassen sich sämtliche homologe Chromosomen sowie die B Chromosomen eindeutig identifizieren. Der Maßstab entspricht 10 µm.

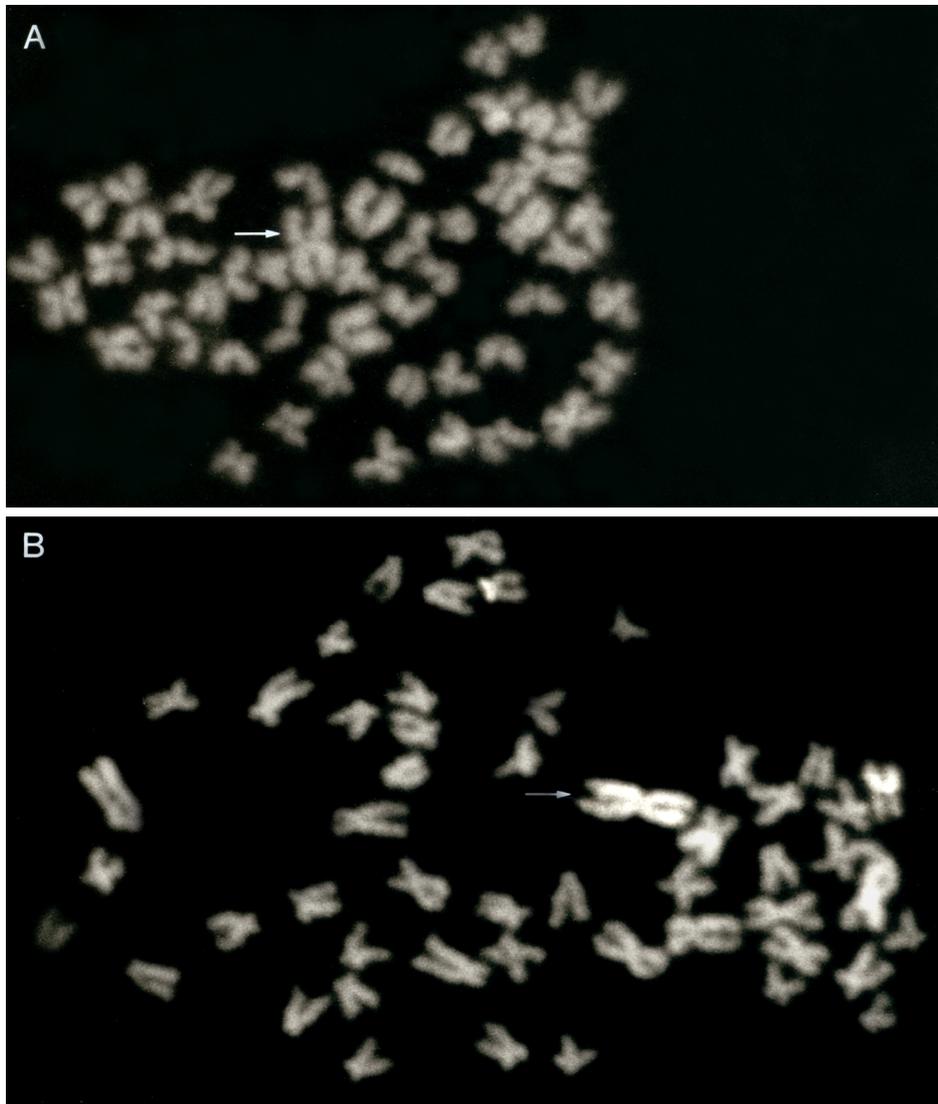
Durch Fluoreszenzfärbungen (Abb. 6/7) kann manchmal die Heterogenität verschiedener Fraktionen des konstitutiven Heterochromatins dargestellt werden.

Die AT-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe Quinacrin, DAPI und Hoechst können ein Chromosomenbanden-Muster erzeugen, welches der konventionellen, auf Protein-Denaturation beruhenden, G-Bänderung entspricht.

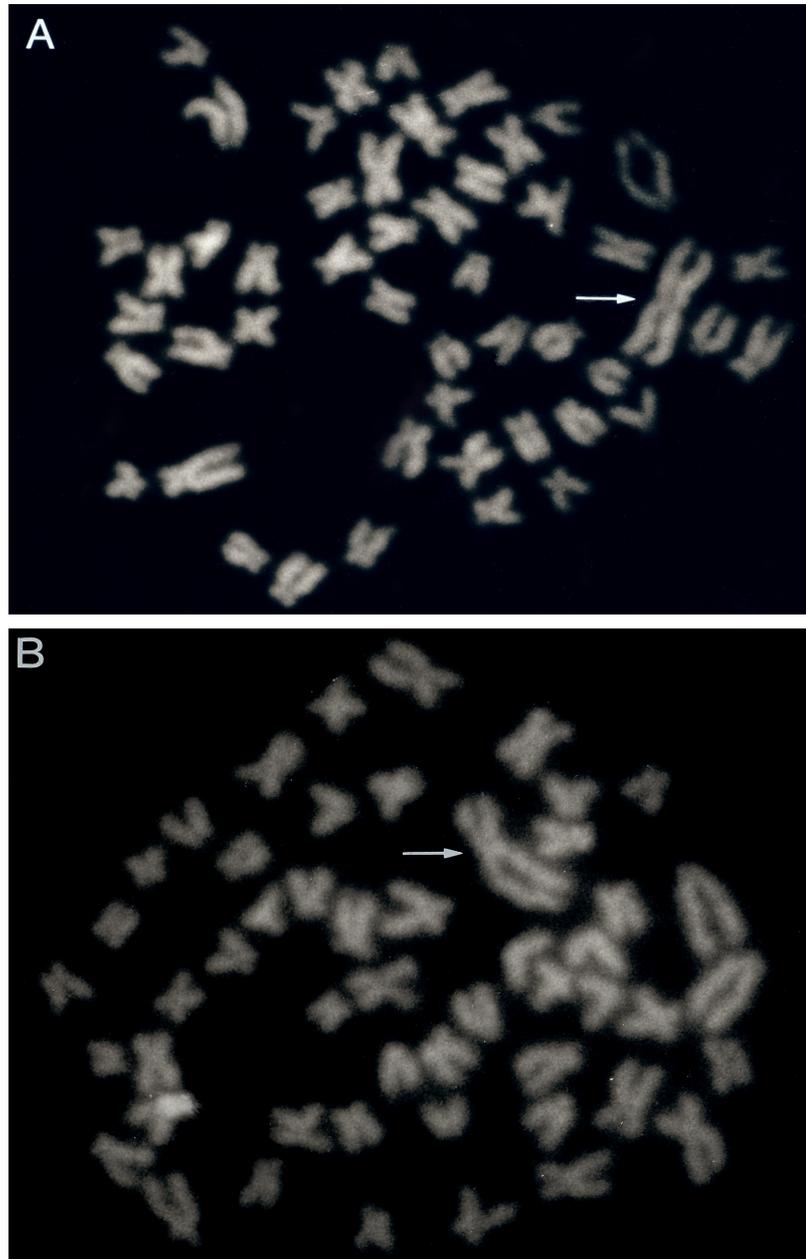
Der AT-reiche Chromosomenabschnitte markierende Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin mustard (Abb. 6A) führt bei *A. alburnus*, wie für Fische erwartet, zu einer einheitlichen Fluoreszenz des Eu- und Heterochromatins. Sowohl die A als auch das B Chromosom zeigen eine uniforme Färbung.

Mithramycin (MM) bildet mit GC-reicher doppelsträngiger DNA stabile Komplexe, wobei eine vorherige Inkubation der Chromosomen mit Distamycin A (DA) kontrastverstärkend wirkt. Im Gegensatz zu den warmblütigen Säugetieren und Vögeln besitzen die euchromatischen Segmente der Chromosomen von Reptilien, Amphibien und Fischen keine multiplen fluoreszierenden R-Banden. Auch Schmid & Guttenbach (1988) konnten zeigen, dass in den Metaphasechromosomen der Osteichthyes und Chondrichthyes durch DA/MM bzw. DA/CMA<sub>3</sub> keine charakteristischen R-Banden erzeugbar sind. Dies zeigt sich auch in den Metaphasechromosomen von *A. alburnus* und liegt an dem Fehlen konkreter GC-reicher Isochoren in den Genomen der kaltblütigen Vertebraten. Andererseits ist in niederen Wirbeltieren eine zuverlässige Identifizierung der NOR-tragenden Chromosomen möglich. Dies bedeutet, dass diese Regionen, welche auf den homologen Chromosomen 16 liegen, von GC-reichen Sequenzabschnitten umgeben sind. Da der restliche Teil der NOR-tragenden Chromosomen dunkler erscheint, besteht er wohl entweder aus AT-reichen oder AT/GC-gemischten Sequenzen. Auch inter- und intraspezifische Größenunterschiede zwischen den homologen NOR können präzise diagnostiziert werden. Bei *A. alburnus* zeigt eines der Chromosomen 16 ebenfalls deutlich stärkere Mithramycin-Fluoreszenz als das Homologe (Abb. 6B). Das B Chromosom ist ferner das hellste Chromosom, welches mit DA/MM darstellbar ist und muss demnach sehr lange GC-reiche Sequenzen aufweisen.

Mit der DA/Hoechst 33258- (Abb. 7A) bzw. DA/DAPI-Färbung (Abb. 7B) konnten ebenfalls keine differenzierten Bänder erzielt werden. So fluoreszieren die Chromosomen immer einheitlich, selten sind kleinere Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zu erkennen, die oftmals auf Färbeartefakte zurückzuführen sind. Insgesamt wird mit den AT-spezifischen Fluorochromen somit nur eine schwache und wenig kontrastreiche Bänderung der Fischchromosomen erzielt.



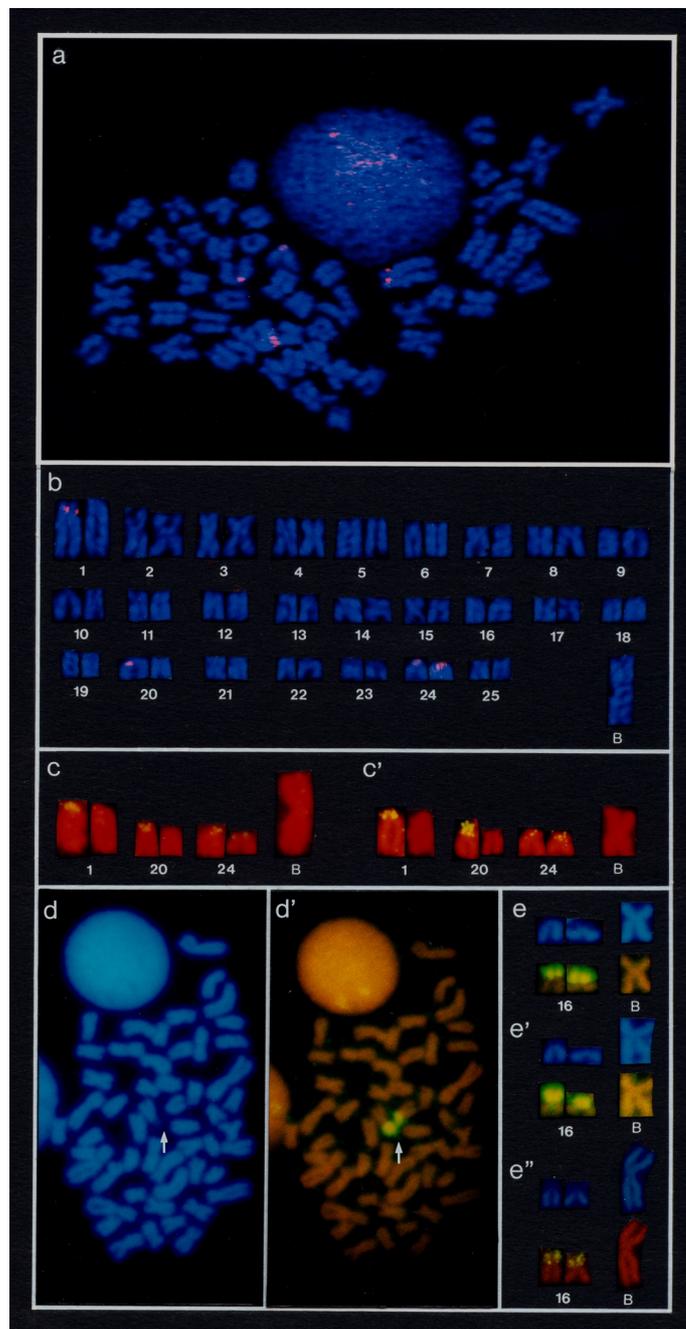
**Abb. 6:** Metaphasechromosomen von *Alburnus alburnus* nach Fluoreszenz-Färbung. A: Quinacrin mustard-Färbung: Die A und das B Chromosom fluoreszieren uniform. B: DA/Mithramycin-Färbung: Zu erkennen sind die NOR-tragenden Chromosomen 16 und das heller fluoreszierende B Chromosom (Pfeil).



**Abb. 7:** Metaphasechromosomen von *Alburnus alburnus* nach Fluoreszenzfärbung.  
A: Färbung der Chromosomen mit DA/Hoechst 33258.  
B: DA/DAPI-Färbung. Die A Chromosomen und das B Chromosom zeigen eine homogene Fluoreszenz. Das B Chromosom (Pfeil) erscheint dunkler als bei der Mithramycin-Färbung.

Die *in situ* Hybridisierung mit der biotinylierten 5S rDNA-Probe (Abb. 8a-c') zeigt, dass die Gene im Zentromerbereich des großen telozentrischen A Chromosoms 1 vorliegen sowie weitere Genorte auf den telozentrischen Chromosomen 20 und 24 zu finden sind. B Chromosomen sind in dieser Spezies keine Träger von 5S rRNA-Sequenzen. Die Abb. 8a zeigt eine Metaphase mit mehreren 5S rDNA-positiven A Chromosomen. Im Karyotyp (Abb. 8b) können vier Chromosomen als eindeutige Träger dieser 120 bp-Tandemrepeats, ein Chromosom 1, ein Chromosom 20 und die homologen Chromosomen 24, erkannt werden. Die mit DAPI und FITC-Fluoreszenz synchron angeregten Chromosomen wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Die Abb. 8c zeigt die drei Paare homologer Chromosomen, auf denen 5S rRNA-Gene gefunden wurden, in der Propidiumiodid-Fluoreszenz mit den FITC-Signalen. Bei jeweils einem der Homologen 1 und 20 sind, wenn überhaupt, dann nur sehr schwache Signale erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass diese Chromosomen wohl auch Träger der 5S rRNA-Gene sind, jedoch kommen die tandemartig repetierten Gene wohl hier in sehr viel geringerer Kopienzahl vor. Eine andere Erklärung wären präparative Probleme, wie z.B. eine schwache Antikörperbindung. Das große submetazentrische B Chromosom besitzt keine 5S rRNA-Gene. In der Abb. 8c' können sehr deutliche Signale an den Enden eines der Chromosomen 1, 20 und den beiden Chromosomen 24 dokumentiert werden. Das kleinere metazentrische überzählige Chromosom ist ebenfalls 5S rDNA-negativ. Bei der Hybridisierung mit der 18S/28S rDNA-Probe (Abb. 8d-e'') konnten die Ergebnisse der Silberfärbung bestätigt werden, d.h. das homologe Chromosomenpaar 16 besitzt diese tandemartig aufgereihten ribosomalen Gene. Auf keinem weiteren A Chromosom bzw. beiden B Chromosomen konnten Sequenzen für die, für die Entwicklung wichtigen 18S/28S rRNA-Gene lokalisiert werden. Die Abb. 8d zeigt eine Metaphase mit 52 Chromosomen, den 50 A Chromosomen und den zwei B Chromosomen, in der DAPI-Übersichtsfärbung. In der Abb. 8d' können zwei homologe Chromosomen als Träger deutlicher 18S/28S Signale dokumentiert werden. Die zwei Hybridisierungs-Signale sind auch gut im Interphasezellkern zu sehen. Aufgrund der Lage der subtelozentrischen rDNA-positiven Chromosomen zueinander wird eine mitotische Assoziation der Chromosomen mit ihren rRNA-Genen begünstigt. Die Abb. 8e/e' und e'' zeigen mehrere homologe Chromosomen 16 aus verschiedenen Metaphasen zuerst in der DAPI-Übersicht und dann in der FITC-Anregung. Deutliche Hybridisierungssignale markieren die kurzen Arme dieser Chromosomen. Größenunterschiede beider Hybridisierungssignale kommen durch variable Zahlen der 18S/28S rRNA-Gene zustande.

Ganz rechts im Bild sind zusätzlich noch die jeweiligen B Chromosomen der Metaphasen abgebildet. Keines der überzähligen Chromosomen ist Träger zusätzlicher 18S/28S rRNA-Gene.

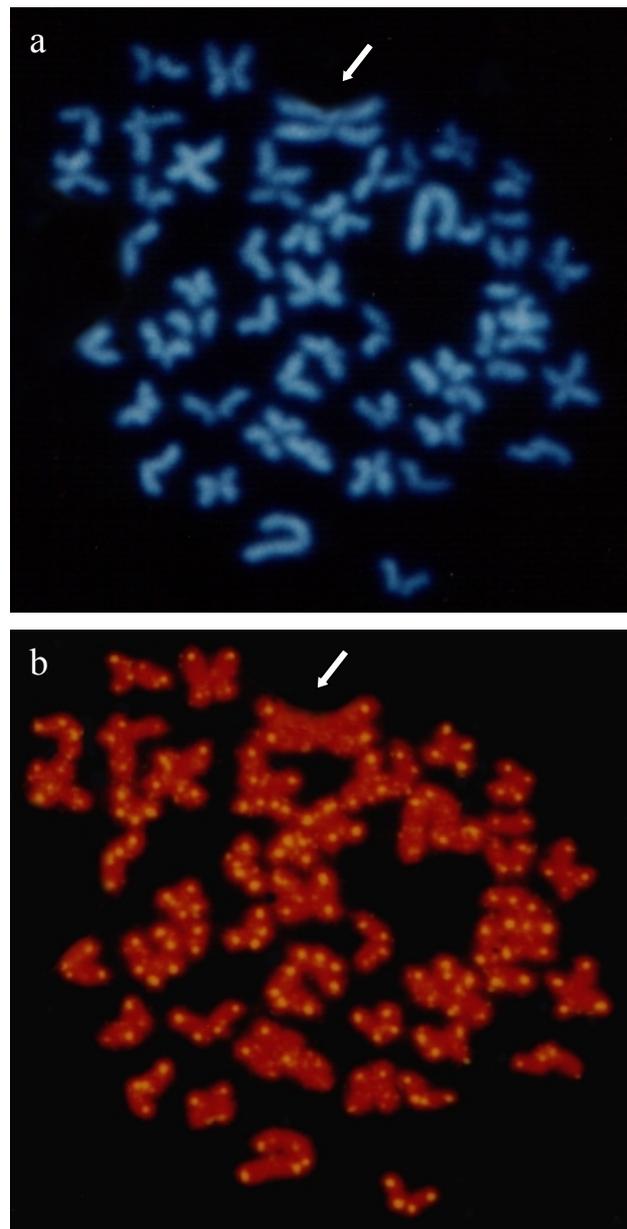


**Abb. 8:** Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit der 5S und der 18S/28S rDNA-Probe.

*a-c'*: FISH mit der biotinylierten 5S rDNA-Probe. *a, b*: Metaphase und Karyotyp von *Alburnus alburnus* mit 5S rDNA-positiven Chromosomen, in synchroner DAPI und FITC-Anregung, aufgenommen mit einer CCD-Kamera. *c/c'*: Von den drei homologen Chromosomenpaaren können Signale auf mindestens vier Chromosomen lokalisiert werden. Sowohl das große submetazentrische als auch das kleinere metazentrische überzählige Chromosom ist 5S rDNA-negativ. *d-d''*: FISH mit der 18S/28S rDNA-Probe. *d/d'*: Metaphase in DAPI und FITC-Anregung. Die homologen Chromosomen 16 sind Träger der ribosomalen 18S/28S rRNA-Gene. *e-e''*: Ausgewählte Chromosomen 16 in DAPI/FITC. Deutliche Hybridisierungssignale kennzeichnen das Chromosomenpaar 16. B Chromosomen sind keine Träger der ribosomalen 18S/28S Tandemgen-Cluster.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit der Vertebraten-Telomersequenz,  $(TTAGGG)_n$ , (Abb. 9) zeigt, dass alle A und das B Chromosom die obligatorischen chromosomalen Sequenzen besitzen. Bei allen Chromosomen können vier Hybridisierungssignale erkannt werden, welche den beiden Enden der zwei Chromatiden entsprechen. Auf dem B Chromosom konnten keine interstitiellen Signale entdeckt werden. Dies hätte einen möglichen Entstehungsmechanismus des überzähligen Chromosoms durch Fusionsereignisse zweier A Chromosomen vermuten lassen können.

Die Abbildung 9 zeigt Metaphasechromosomen von *A. alburnus* nach FISH mit der Telomersequenz.



**Abb. 9:** FISH mit der Vertebraten-Telomersequenz,  $(TTAGGG)_n$ . Die A und das B Chromosom weisen ausschließlich telomerständige Signale auf. *a*: DAPI-Gegenfärbung. *b*: dieselbe Metaphase nach Propidiumiodidfluoreszenz mit den FITC-Signalen.

### **3.2. Durchflußzytometrische DNA-Analysen**

Der absolute DNA-Gehalt (pg) wurde von über 100 Individuen aus verschiedenen Populationen von *A. alburnus* durch Messung frisch entnommener Erythrozyten bzw. eingefrorener ermittelt. Sämtliche Erythrozyten wurden 1-2 Stunden mit dem AT-spezifischen Fluorochrom Hoechst 33258 gefärbt, ehe sie am Partec CA II-Durchflußzytometer analysiert wurden. Als Standard wurden Hoechst-gefärbte Hühnchenerythrozyten mit einem DNA-Gehalt von 2,5 pg/Nukleus (Vinogradov, 1998) und ähnlichem AT-Gehalt wie Knochenfische verwendet. Auch wurden Messungen an DAPI-gefärbten Zellen der Rückenflosse unternommen (Lamatsch et al., 2000), was jedoch zu schlechten Variationskoeffizienten (CV-Werte) führte und auch nicht weiter optimiert wurde. An einem CV-Wert kann man die Qualität der Messung ablesen: Je kleiner der Wert, desto geringer die Streuung und desto besser die Messung. Sowohl Analysen von frischem Blut als auch Blut in Einfriermedium ergaben sehr gute bis gute CV-Werte.

Ziel der Flow-Messungen war es, den absoluten DNA-Gehalt (pg) des übergroßen B Chromosoms von *A. alburnus* zu bestimmen. Dies geschah durch synchrone Messung und Auftrennung der Signale der Erythrozyten von Tieren ohne und mit B Chromosom. Aus der Differenz der Genomgrößen konnte dann der DNA-Gehalt des überzähligen Chromosoms bestimmt werden.

Der gemittelte DNA-Gehalt von 85 Tieren, welche nur die 50 A Chromosomen aufwiesen ( $DNA_A$ ) ergab  $3,43 \pm 0,46$  pg/Nukleus, 16 Fische mit einem überzähligen Chromosom ( $DNA_{A+B}$ ) wiesen durchschnittlich  $3,76 \pm 0,33$  pg/Nukleus auf, so dass sich folgendes ergab:

$$DNA_B = DNA_{A+B} - DNA_A = 0,33 \text{ pg.}$$

Der DNA-Gehalt des B Chromosoms entspricht folglich ungefähr 9% des gesamten DNA-Gehalts von *A. alburnus*. Zwei Tiere mit 2 zusätzlichen Chromosomen besaßen gemittelt  $3,85 \pm 0,21$  pg/Nukleus (Tabelle 2).

Tiere ohne B Chromosom	Tiere mit einem B Chromosom	Tiere mit zwei B Chromosomen	DNA-Gehalt (pg)	Variationskoeffizient (CV-Wert)
AAL 1			3.7	CV= 2.7
AAL 2			3.7	CV= 2.4
AAL 3			3.5	CV= 2.9
AAL 4			3.8	CV= 3.7
AAL 5			3.4	CV= 3.4
AAL 6			3.3	CV= 1.7
AAL 7			3.6	CV= 2.1
AAL 8			3.3	CV= 3.4
AAL 9			3.3	CV= 2.1
AAL 10			3.4	CV= 2.6
AAL 11			3.4	CV= 1.7
AAL 12			3.2	CV= 2.3
AAL 13			3.1	CV= 2.1
AAL 14			3.4	CV= 1.9
AAL 15			3.3	CV= 2.4
AAL 16			3.5	CV= 1.9
AAL 17			3.2	CV= 1.7
AAL 18			3.5	CV= 2.2
AAL 19			3.4	CV= 2.3
AAL 20			3.0	CV= 2.5
AAL 21			4.0	CV= 1.5
AAL 22			3.9	CV= 2.6
	AAL 23		4.0	CV= 1.6
AAL 24			3.6	CV= 1.8
	AAL 25		3.6	CV= 2.2
	AAL 26		4.2	CV= 1.7
AAL 27			3.5	CV= 1.1
AAL 28			3.2	CV= 2.7
AAL 29			3.3	CV= 2.2
	AAL 30		3.3	CV= 2.1
AAL 31			3.0	CV= 2.2
AAL 32			2.9	CV= 2.4
AAL 33			3.0	CV= 2.0
AAL 34			2.9	CV= 2.0
AAL 35			3.2	CV= 2.7
AAL 36			3.6	CV= 1.7
AAL 37			3.6	CV= 2.9
AAL 38			3.5	CV= 2.0
AAL 39			3.4	CV= 2.9
AAL 40			3.1	CV= 3.1

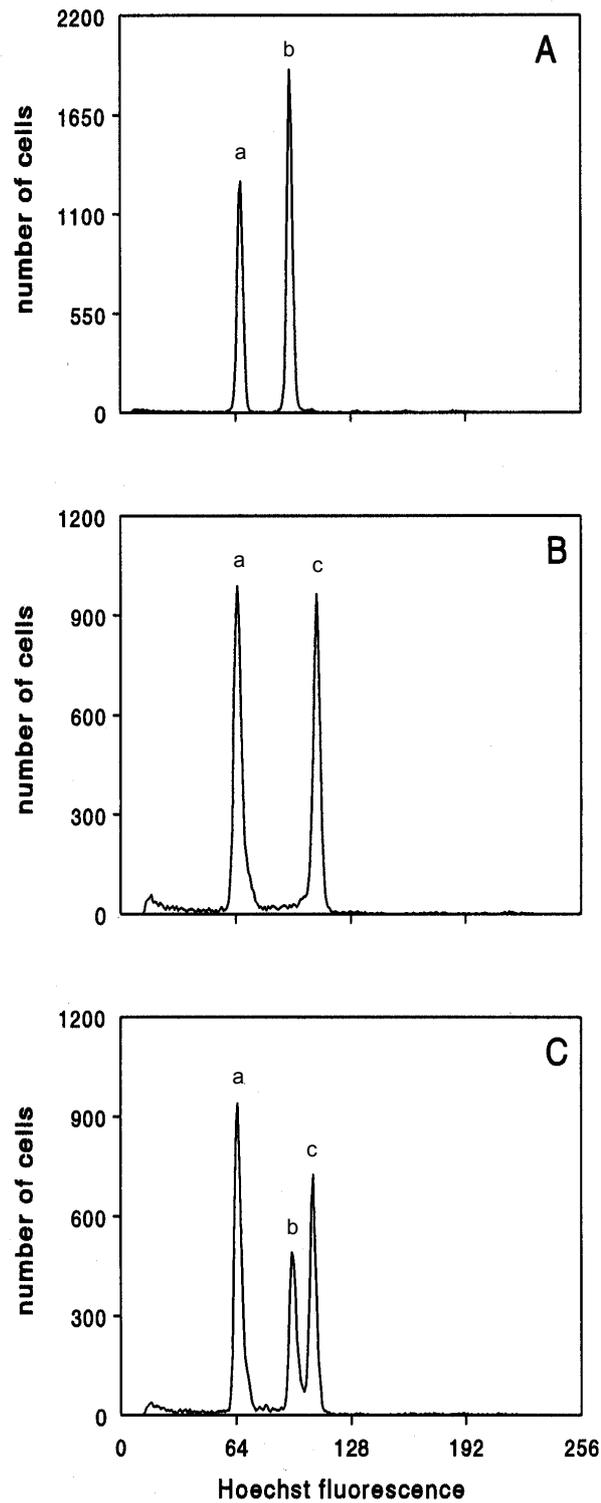
Tiere ohne B Chromosom	Tiere mit einem B Chromosom	Tiere mit zwei B Chromosomen	DNA-Gehalt (pg)	Variationskoeffizient (CV-Wert)
AAL 41			3.3	CV= 2.0
	AAL 42		3.7	CV= 1.8
	AAL 43		3.6	CV= 2.1
AAL 44			2.9	CV= 3.1
AAL 45			3.9	CV= 2.0
	AAL 46		4.1	CV= 2.4
AAL 47			3.3	CV= 2.0
AAL 48			4.0	CV= 2.2
AAL 49			3.2	CV= 2.2
AAL 50			3.5	CV= 1.9
AAL 51			3.7	CV= 2.0
	AAL 52		4.3	CV= 1.4
AAL 53			3.7	CV= 2.0
AAL 54			3.7	CV= 1.9
AAL 55			3.9	CV= 1.5
	AAL 56		4.2	CV= 1.9
AAL 57			3.7	CV= 2.3
	AAL 58		3.7	CV= 2.3
AAL 59			3.9	CV= 1.9
AAL 60			3.7	CV= 2.0
	AAL 61		3.7	CV= 1.9
AAL 62			3.5	CV= 2.6
	AAL 63		4.0	CV= 3.0
AAL 64			3.0	CV= 1.3
AAL 65			3.8	CV= 1.2
AAL 66			3.7	CV= 1.8
AAL 67			3.9	CV= 1.7
AAL 68			4.1	CV= 1.5
AAL 69			3.8	CV= 1.3
AAL 70			3.3	CV= 2.8
AAL 71			3.4	CV= 1.8
AAL 72			3.3	CV= 2.2
AAL 73			3.4	CV= 3.2
AAL 74			3.9	CV= 1.8
AAL 75			3.8	CV= 3.0
AAL 76			3.8	CV= 1.4
AAL 77			4.0	CV= 1.6
AAL 78			3.9	CV= 1.7
AAL 79			3.0	CV= 2.7
AAL 80			3.2	CV= 2.5

Tiere ohne B Chromosom	Tiere mit einem B Chromosom	Tiere mit zwei B Chromosomen	DNA-Gehalt (pg)	Variationskoeffizient (CV-Wert)
AAL 81			3.3	CV= 1.2
AAL 82			3.3	CV= 1.7
AAL 83			3.3	CV= 1.5
AAL 84			3.3	CV= 2.2
		AAL 85	3.7	CV= 1.7
AAL 86			3.3	CV= 4.2
AAL 87			3.4	CV= 1.8
AAL 88			3.4	CV= 1.8
	AAL 89		3.4	CV= 2.6
		AAL 90	4.0	CV= 3.6
	AAL 91		3.4	CV= 3.4
AAL 92			3.4	CV= 3.8
AAL 93			3.4	CV= 2.6
AAL 94			3.4	CV= 2.5
AAL 95			3.4	CV= 1.6
	AAL 96		3.4	CV= 2.7
AAL 98			3.5	CV= 3.7
AAL 99			3.5	CV= 4.3
AAL 100			3.5	CV= 3.9
	AAL 101		3.5	CV= 3.7
AAL 102			3.5	CV= 2.8
AAL 103			3.5	CV= 2.2

**Tabelle 2:** *Alburnus alburnus* (AAL) mit 0, 1 und 2 B Chromosomen, ihr mit Hoechst 33258 bestimmter DNA-Gehalt sowie der Variationskoeffizient (CV) der Messung.

Nachdem festgestellt werden konnte, dass sich der Gesamt-DNA-Gehalt von *A. alburnus* um fast 10% erhöht, falls Tiere eine zusätzliches Chromosoms besitzen, konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Signale der Erythrozyten von Tiere ohne und mit einem überzähligen Chromosom bei einer synchronen Messung durchflußzytometrisch Auftrennung lassen müssten.

Die „Flow-Diagramme“ (Abb. 10-12) zeigen, dass eine solche Trennung von Signalen Fluorochrom-gefärbter Erythrozyten möglich war. Als Farbstoff wurde bei den Messungen Hoechst 33258 verwendet.



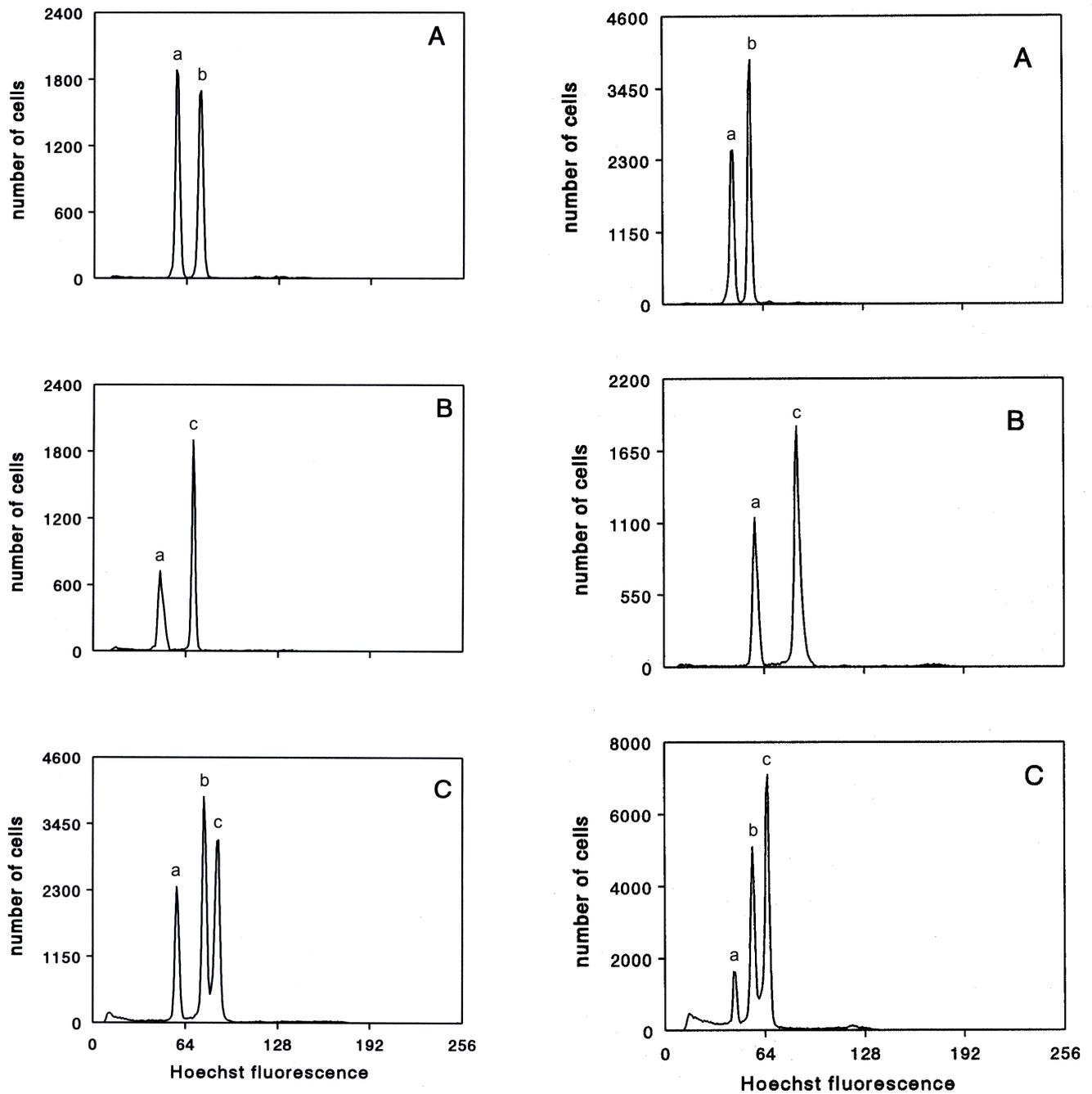
**Abb. 10:** Bei der durchflußzytometrischen DNA-Analyse konnten die Signale von Hoechst 33258 gefärbten Erythrozyten von *Alburnus alburnus* ohne überzähliges Chromosom (*b*) von denen mit B Chromosom (*c*) aufgetrennt werden. Tiere mit einem B Chromosom besitzen einen um etwa 10% höheren Gesamt-DNA Gehalt. Hühnchenerythrozyten (*a*) dienen als Referenzwert.

A: Fisch mit 50 A Chromosomen.

B: Fisch mit 50 A und 1 B Chromosom.

C: Synchrone Auftrennung der Signale von Erythrozyten beider Fische.

Bei den Flow-Messungen wurden immer mindestens 10.000 Zellen analysiert.



**Abb. 11 und 12:** Erythrozyten der Fische ohne B Chromosom (b), und mit einem überzähligen Chromosom (c) wurden jeweils in Relation zum Hühnchenstandard (a) vermessen (Bilder A, B). Bild C zeigt jeweils eine synchrone Auftrennung von Signale der Erythrozyten der Fische von (A) und (B). Dies war aufgrund des leicht unterschiedlichen DNA-Gehalts möglich. Bei den Flow-Messungen wurden immer 10.000 Zellen analysiert.

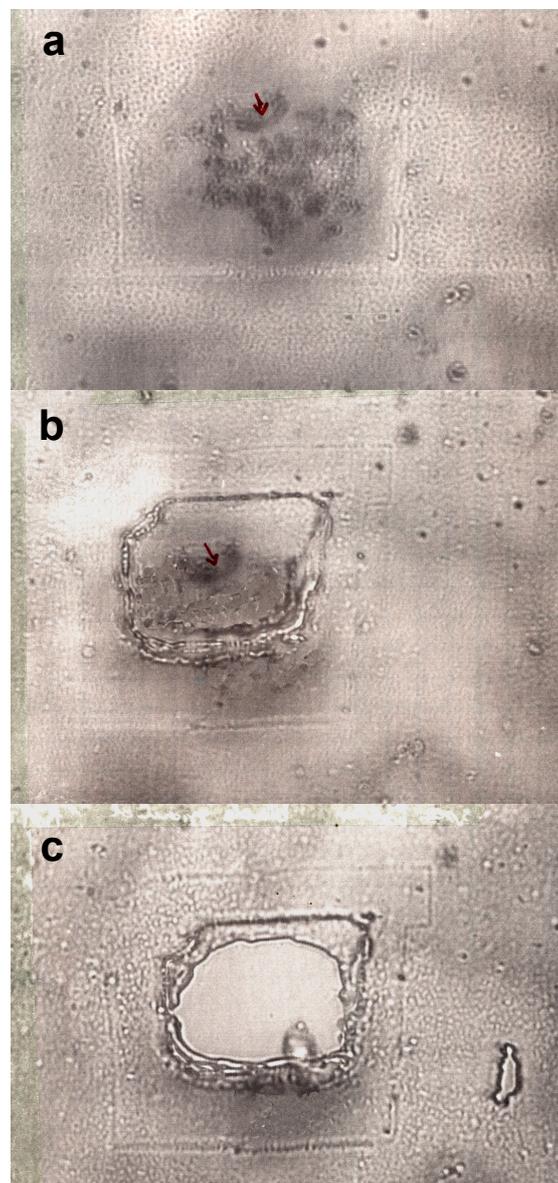
### **3.3. Molekulare Untersuchungen**

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die außergewöhnlich großen B Chromosomen von *A. alburnus* molekularzytogenetisch analysiert werden, v.a. mit dem Ziel eine B Chromosomen-spezifische Hybridisierungssonde zu erstellen. Ferner sollte DNA des überzähligen Chromosoms kloniert und sequenziert werden, um Aufschlüsse über die Basenpaar-Zusammensetzung der repetitiven DNA zu erlangen. Des weiteren wurden Tests durchgeführt, welche zur Auffindung eines möglichen Ursprungs des B Chromosoms in *Alburnus alburnus* dienen, die Transposonanfälligkeit von überzähligen Chromosomen untersuchen sowie der Etablierung einer minimal-invasiven Screening-Methode zur Entdeckung des B Chromosoms in verschiedenen Populationen dienen sollen.

#### **3.3.1. Lasermikromanipulation**

Zuerst wurde ein Ansatz gewählt mit dem versucht wurde, möglichst das komplette B Chromosom von den A Chromosomen zu isolieren und molekular zu analysieren. Dies hätte den Vorteil, dass die gesamte genetische Zusammensetzung des überzähligen Chromosoms untersucht werden könnte, auch mit dem Ziel den Ursprung näher zu ergründen. Leider war es nicht möglich, durch die Technik der Lasermikromanipulation das komplette B Chromosom zu isolieren, um dann in einer anschließenden Rehybridisierung die amplifizierte DNA auf Metaphasen mit und ohne B Chromosom zu lokalisieren. Hier könnte sich beispielsweise ergeben, dass das B Chromosom einige spezifische repetitive Sequenzfamilien besitzt, aber auch andere DNA-Abschnitte aufweist, die auch auf den A Chromosomen zu finden sind. Im Institut für Kristallographie der LMU München wurde, in Kooperation mit Dr. Stefan Thalhammer, in zwei Anläufen versucht das B Chromosom durch UV „laser microbeam microdissection“ (LMM), in Kombination mit „laser pressure catapulting“ (LPC) von den übrigen A Chromosomen zu isolieren und zu reamplifizieren (Schermelleh et al., 1999). Der erste Versuch scheiterte daran, dass durch Auftropfen einer gewöhnlich erstellten Chromosomensuspension auf die ultradünnen Objektträgerfolien die Morphologie und v.a. Spreitung der Metaphasechromosomen unzureichend war. Dies konnte dann in einem zweiten Ansatz durch Verwendung von optimal präparierten Zellkulturchromosomen mit ausreichender Qualität und Spreitung verbessert werden (Abb. 13a). Nun konnten auch zahlreiche freiliegende, aufgrund ihrer Größe eindeutig zu erkennende B Chromosomen durch Laserschneiden der Membran isoliert werden. Auch das Zerstören genetischer Information der umliegenden A Chromosomen (Ablation) machte keine Schwierigkeiten (Abb. 13b).

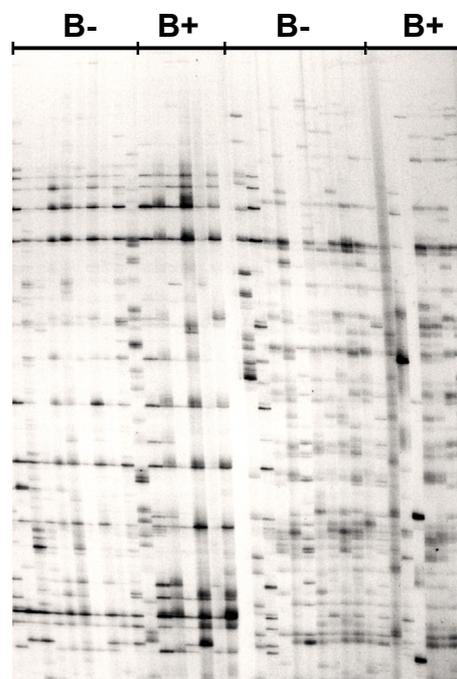
Das Herausschleudern der B Chromosomen durch einen gezielten Laserschuss unterhalb der Folienebene verlief ebenfalls problemlos (Abb. 13c). Das Wiederauffangen dieser Chromosomen-Membraninseln in einem kleinen Glycerintropfen, welcher sich in einem Eppendorfgefäß knapp oberhalb des Objektträgers befand, schlug fehl. Es war nicht möglich die mehrere  $\mu\text{m}$  umfassende Distanz zwischen Folie und dem am Mikromanipulator angebrachten Reaktionsgefäß zu überwinden. Reamplifikationsprobleme der B chromosomalen DNA in folgenden DOP-PCRs wurden durch Testamplifikationen genomischer DNA ausgeschlossen. So konnte beispielsweise genomische DNA von *A. alburnus* noch in hohen Verdünnungen von bis zu 0,05 pg über den gewünschten Bereich vervielfältigt werden.



**Abb. 13:** Die Aufnahmen dokumentieren, dass bei einer gut präparierten Metaphase (*a*) ein B Chromosom erfolgreich isoliert sowie die A Chromosomen ablatiert werden konnten (*b*). Auch das Herauskatapultieren (*c*) des überzähligen Chromosoms gestaltete sich problemlos.

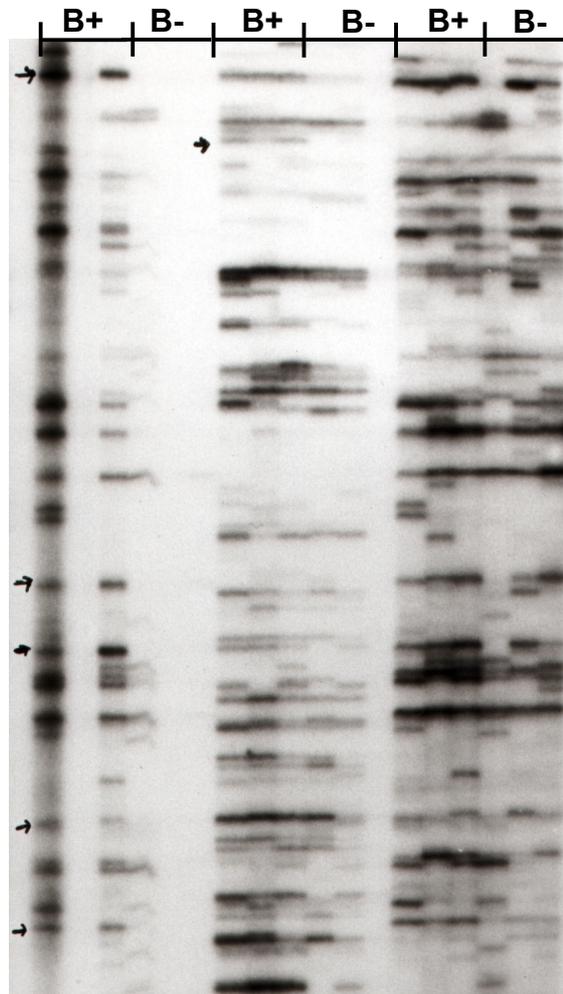
### 3.3.2. AFLP-Analysen

In einem zweiten Ansatz wurde die von Vos et al. (1995) beschriebene Methode des „amplified fragment length polymorphism“ durchgeführt. Mit dieser einfach durchzuführenden und zuverlässig wiederholbaren DNA-Fingerprinting Technik können sehr viele Restriktionsfragmente von bisher unbekanntem Genom in relativ kurzer Zeit auf Polymorphismen hin untersucht werden. Hierzu wurden 500 ng genomische DNA von Fischen mit und ohne B Chromosom mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *MseI* verdaut, so dass in einer zweiten Reaktion an die Fragmentenden spezielle Adapter ligiert werden konnten. Diese wiederum dienten als Bindungsstellen für die verschiedenen AFLP-Primer. Nach zwei PCR-Runden, wobei die letzte einen radioaktiv markierten Primer enthielt, konnten die AFLP-Fragmente auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und ausgewertet werden. Nach ausreichender Exposition konnte ein oftmals komplexes Bandenmuster dokumentiert werden. Ziel war es nun eine spezielle Primerkombination zu finden, bei der signifikante Bandenunterschiede bei Fischen mit und ohne überzähliges Chromosom sichtbar werden. Es wurden 64 verschiedene *EcoRI/MseI*-Primerkombinationen getestet. Die Abbildung 14 zeigt einen häufigen Befund der AFLP-Analysen bei *A. alburnus*. Aus dem oft komplexen Muster vieler Banden konnten keine auffälligen Unterschiede bei Fischen ohne und mit B Chromosomen gefunden werden.

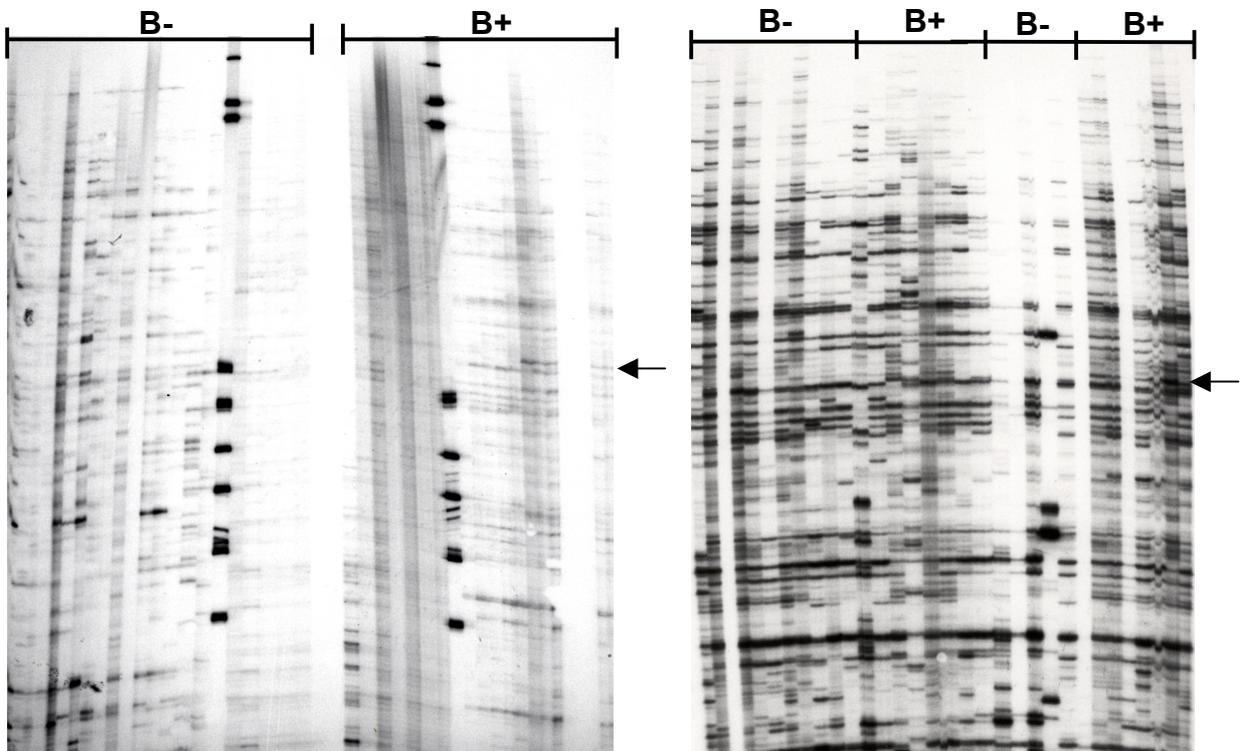


**Abb. 14:** Eine typische AFLP-Untersuchung. Aus dem komplexen Bandenmuster von Fischen mit und ohne überzähliges Chromosom sind keine signifikanten Unterschiede auszumachen. Gezeigt ist ein 5% Polyacrylamidgel mit den Primerkombinationen *EcoRI-AGC/MseI-GCC* und *EcoRI-AGC/MseI-GAT*.

Nur vier Primerkombinationen führten bisher bei den AFLP-Untersuchungen zu informativen Banden, die Fischen mit B Chromosom zugeordnet werden konnten. Bei den ersten drei gezeigten AFLP-Gelen (Abb. 15-17) konnten signifikante Banden aufgespürt werden, welche durch Klonierung und Sequenzierung zukünftig noch zu untersuchen sind.



**Abb. 15:** Bei einer weiteren AFLP-Analyse mit 3 verschiedenen EcoRI/MseI-Primerkombination wurden bei zwei Kombination, EcoRI-ATA/MseI-GAT und EcoRI-ATA/Mse-GTC (Pfeile), Unterschiede im Bandenmuster bei Fischen mit und ohne überzähligem Chromosom sichtbar. Nur die letzte Primerkombination (EcoRI-ATA/MseI-GTC) zeigte keine Bandenunterschiede auf. Ob sich diese Banden (Pfeile) allerdings als informativ herausstellen, muss noch an weiteren Fischen mit überzähligem Chromosom getestet werden.



**Abb. 16 und 17:** Gezeigt sind zwei AFLP-Analysen mit der selben Primerkombination EcoRI-AGA/MseI-GCC. Auch hier konnte eine auffällige Bande (Pfeil) entdeckt werden, welche Fischen ohne B Chromosom fehlt.

Als besonders informativ zeigte sich schließlich die Primerkombination:

**EcoRI-AGA/MseI-GCA.**

Bei der Analyse von jeweils 17 Fischen mit und ohne B Chromosom konnte bei den Trägern des überzähligen Chromosoms eine massive Amplifikation B Chromosomen-spezifischer DNA detektiert werden, was darauf hindeutete, dass offensichtlich eine hochrepetitive DNA-Fraktion des überzähligen Chromosoms gefunden wurde (Abb. 18).

Ob diese DNA-Abschnitte in geringerer Kopienzahl auch auf den A Chromosomen vorkommen, konnte mittels AFLP nicht ermittelt werden.



**Abb. 18:** Mit der Primerkombination **EcoRI-AGA/MseI-GCA** konnte eine auffällig signifikante Bande bei den Fischen mit B Chromosom aufgespürt werden.

### 3.3.3. DNA-Sequenzierung

Nach dem Eluieren der Bande aus dem Polyacrylamidgel und anschließender Klonierung in den Vektor pUC18 wurden 203 bp der B Chromosomen-spezifischen DNA sequenziert (Abb. 19).

GATGAGTCCT	GAGTAAGCAC	CAGAGCTATA	GGATACCTGA
AAGATTCCAG	GTGACCTTGC	AGGAGGAGGT	AGACCTTCTG
CTCCGCTTGG	GCGTTATTGA	ACCTTCGAAC	AGTGAGTGGT
GTCACCCCAT	AGTCCTTGTG	CCAAAGAAGG	ACGAGAGTAT
AAGGTTCTGT	ATTGATTTCC	GATATCTGAA	TTGGTACGCA
GTC			

**Abb. 19:** Sequenz der 203 bp B chromosomaler DNA

Durch Datenbankanalyse konnte eine eindeutige Homologie dieser DNA-Sequenz zu einem Drosophila-Retrotransposon-Element hergestellt werden. Die 203 bp umfassende Sequenz kodiert die erste konservierte Domain (von 7) der Reversen Transkriptase eines Gypsy/Ty3-LTR-Retrotransposons. Ferner konnte in einer Fisch-spezifischen Datenbank (AB073376.1) eine zu Medaka (*Oryzias latipes*) verwandte LTR-Retrotransposon-Sequenz (Gypsy/Ty3) gefunden werden. Eine 83% Ähnlichkeit und 69% Identität auf der Aminosäure-Ebene konnte zu der bei *A. alburnus* gefundenen Sequenz dokumentiert werden (Abb. 20). Diese entspricht wiederum dem N-terminalen Teil der reversen Transkriptase.

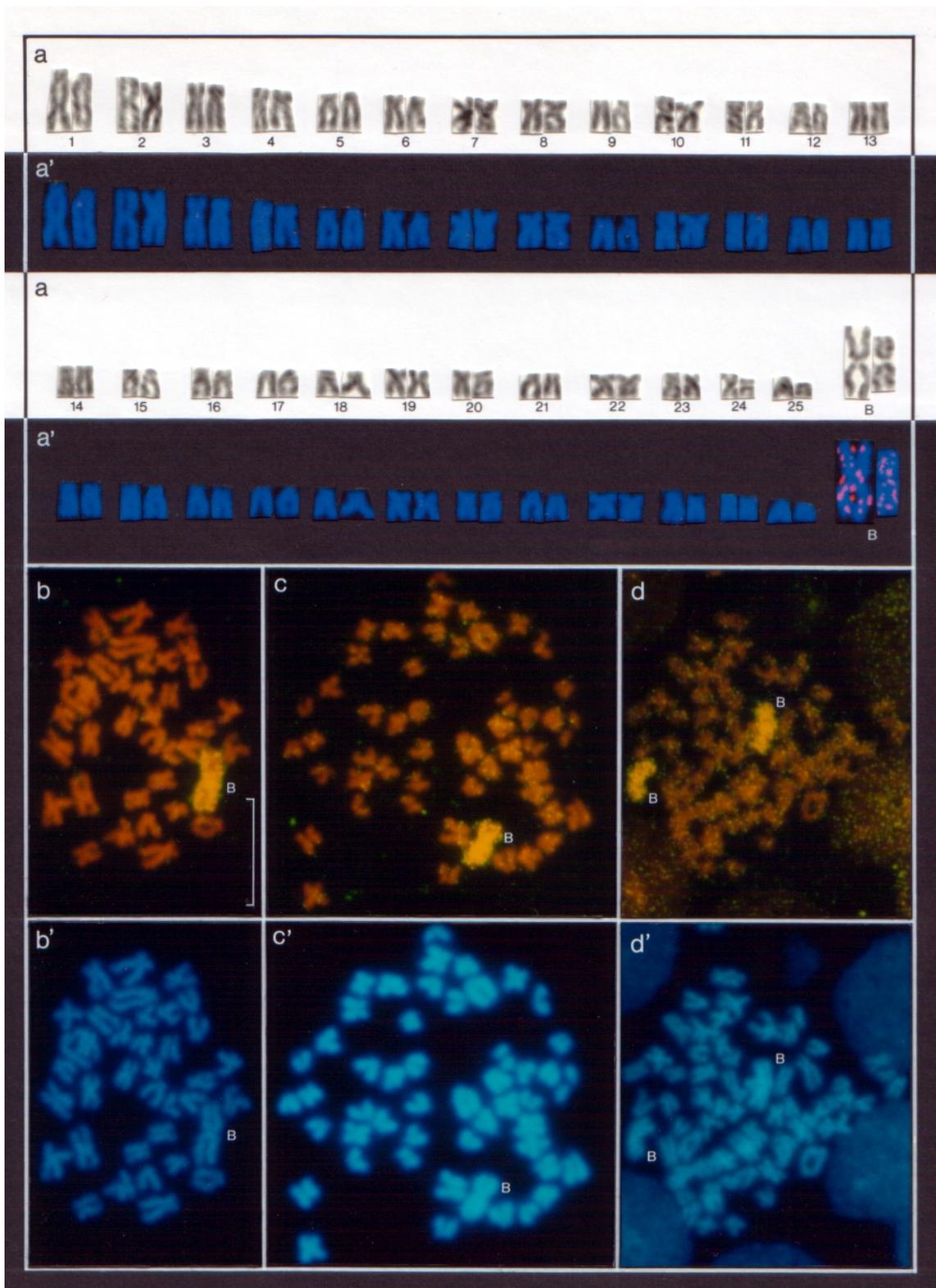
5	KHQS	YRIP	ERFQ	VTLQ	EEVD	LL	LRLG	VI	EPSN	SEWCH	PIVLV	PKKDESI	R	54
:	.													
108	RRRY	YRIP	ERLV	VKLE	KE	IE	LMLK	LG	VI	EPST	SEWC	SPVVLV	PKKDGSLR	1130
55	FCI	DFRYLN	63											
1131	FCI	DFRYLN	1139											

**Abb. 20:** Sequenzvergleich: *Alburnus alburnus* x *Oryzias latipes*.

### 3.3.4. FISH mit der B Chromosomen-Probe an mitotischen Chromosomen

In unseren Untersuchungen konnte mit der AFLP-Technik eine B Chromosomen-spezifische Sequenz isoliert werden. Um die isolierte DNA in den Chromosomen zu lokalisieren, wurde das in pUC18 klonierte B Chromosomen-Fragment über Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP markiert und auf Metaphasen von *Alburnus alburnus* mit B Chromosomen rehybridisiert (Abb. 21). In der Abb. 21a ist ein DAPI-gefärbter Karyotyp von *Alburnus alburnus* nach Invertierung in schwarz-weiß dargestellt. Die Abb. 21a' zeigt den selben Karyotyp nach der in situ Hybridisierung mit der B Chromosomen-spezifischen Sonde. Die Chromosomen wurden mit synchroner DAPI und Propidiumiodid/FITC-Anregung analysiert und mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Es wird deutlich, dass die entdeckte retrotransposable Sequenz über die gesamte Länge der beiden, morphologisch unterschiedlichen, überzähligen Chromosomen hybridisiert. Die gefundene Sequenz erstreckt sich symmetrisch über beide B Chromosomenarme. In den Abbildung 21b-d' sind Metaphasen mit einem B Chromosom bzw. auch eine mit zwei zusätzlichen Chromosomen, zuerst in der FITC-Anregung (Abb. 21b-d), dann in der DAPI-Übersichtsfärbung (Abb. 21b'-d') gezeigt. Deutlich können die Hybridisierungssignale über der gesamten Länge, sowohl des großen submetazentrischen überzähligen Chromosoms (Abb. 21b), als auch des etwas kleineren metazentrischen B Chromosoms (Abb. 21c) erkannt werden. In der Abb. 21d ist ein Tier mit 52 Chromosomen, den 50 A und den beiden morphologisch unterschiedlichen B Chromosomen zu sehen.

Es scheint, als würden die überzähligen Chromosomen ausschließlich aus der gefundenen retrotransposablen Sequenz bestehen. Keines der A Chromosomen weist ein Signal und somit eine Homologie zu der gefunden Sequenz auf, d.h. dass entweder keinerlei Kopien der retrotransposablen Sequenz auf den A Chromosomen zu finden sind, bzw. nur so wenige, dass sie unter der Nachweisgrenze der FISH liegen.



**Abb. 21:** FISH der Metaphasechromosomen von *Alburnus alburnus* mit der B Chromosomen-spezifischen Hybridisierungsprobe. *a/a'*: Karyotyp. *b-d*: Metaphasen mit einem oder zwei B Chromosomen in FITC-Anregung. *b'-d'*: Dieselben Metaphasen in der DAPI-Übersichtsfärbung.

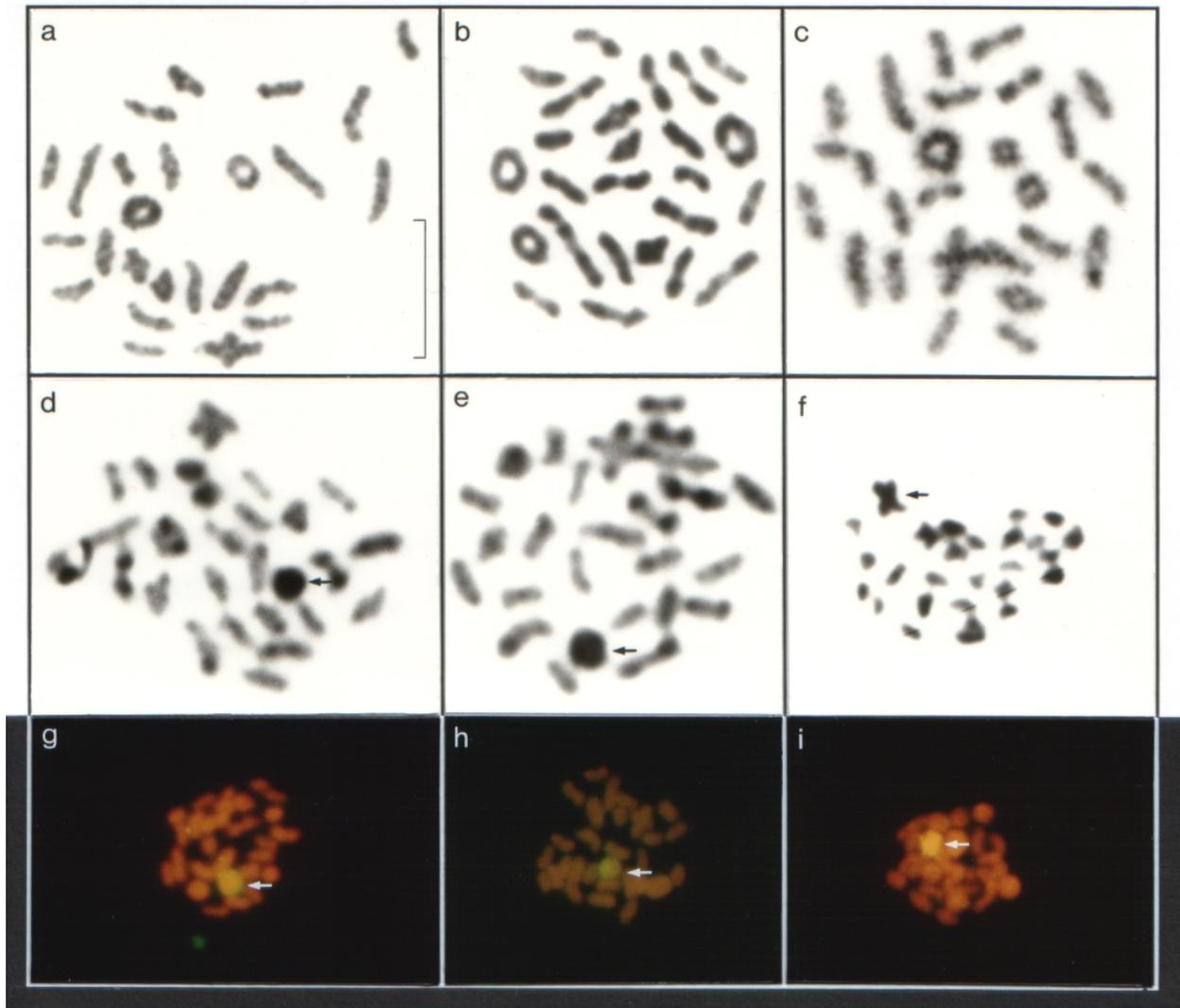
### 3.3.5. FISH mit der B Chromosomen-Probe an meiotischen Chromosomen

Tiere konnten nur in den Monaten der Fortpflanzungszeit (Mai bis Juli) als männlich oder weiblich unterschieden werden. Aufgrund des geringen Vorkommens von Fischen mit zwei B Chromosomen konnte kein männliches Exemplar mit dieser Konstellation gefunden werden. Dies wäre für die Aufklärung des Paarungsverhaltens zweier zusätzlicher Chromosomen entscheidend gewesen. So könnten sie entweder gepaart oder als zwei separate Univalente liegen.

Die Analyse meiotischer Chromosomen von *A. alburnus* erfolgte deshalb von einem geschlechtsreifem männlichen Individuum mit einem zusätzlichen Chromosom. Die Abbildung 22 zeigt Diakinesestadien mit typischer Homologenpaarung in Ring- und Kreuzkonfigurationen. Bivalente mit einem Chiasma gehen in die entspannte Kreuzform über. Sind mehr Chiasmata da, so entstehen Ringfiguren (Traut, 1991).

In der Giemsafärbung (Abb. 22a-c) kann das B Chromosom von den übrigen 25 A Bivalenten nicht zweifelsfrei unterschieden werden. Die Abb. 22d-f zeigen meiotische Chromosomen nach der C-Bänderung. In den Diakinesestadien (Abb. 22d/e) fällt so die heterochromatische Natur des univalent liegenden überzähligen Chromosoms auf. In der Abb. 22f ist eine Metaphase II gezeigt. Das heterochromatische und damit komplett dunkle B Chromosom kann wiederum deutlich erkannt und von den übrigen 25 A Chromosomen unterschieden werden. Dass das B Chromosom als univalentes Ringchromosom vorliegt und mit keinem der A Chromosomen assoziiert ist, wird aber v.a. bei den mit der B Chromosomen-Probe in situ hybridisierten Diakinesestadien (Abb. 22g-i) deutlich.

Erneut wird erkennbar, dass die retrotransposable Sequenz über beide B Chromosomenarme gleichmäßig verteilt ist. Es sieht deshalb so aus, als bestünde das überzählige Chromosom ausschließlich aus der gefundenen Sequenz.



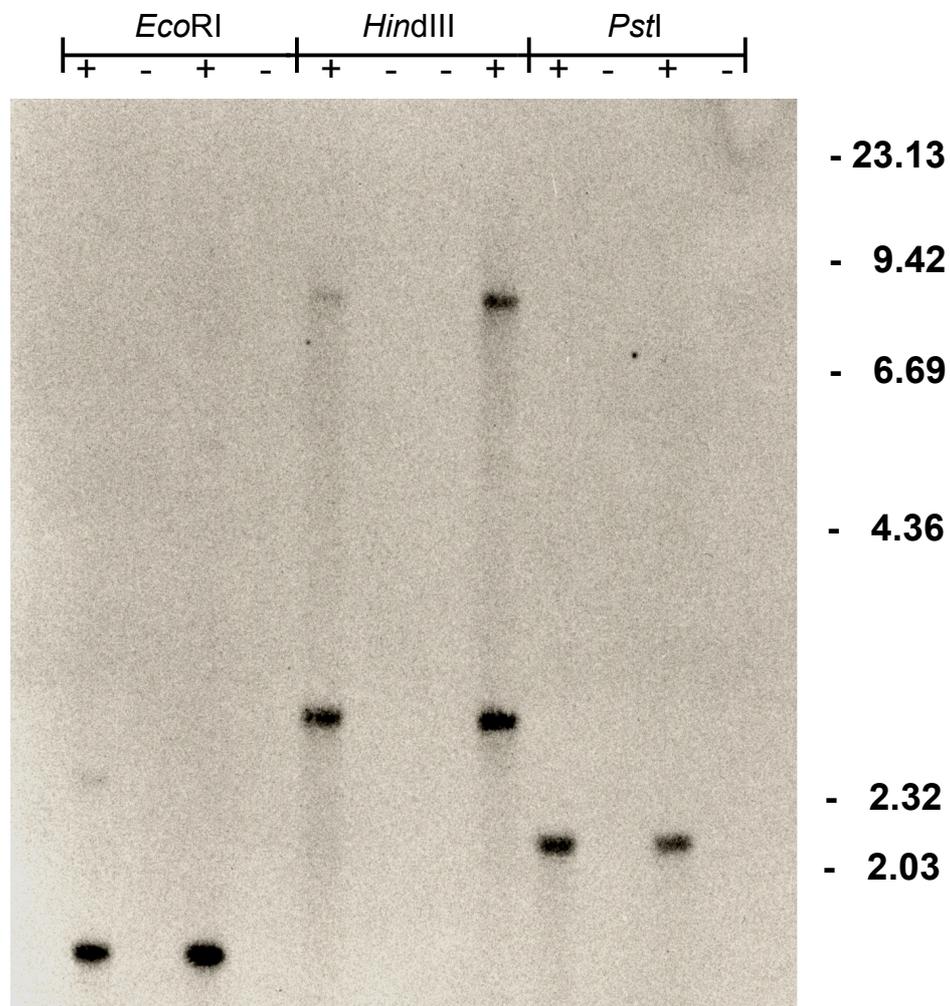
**Abb. 22:** Meiotische Chromosomen von *Alburnus alburnus*.

*a-c*: Giemsa-Färbung. Diakinese-Stadien mit Chromosomen in Ring- und Kreuzkonfigurationen. Das B Chromosom kann nicht eindeutig erkannt werden. *d-f*: C-Bänderung. Das B Chromosom ist komplett heterochromatisch und liegt als Ring vor (*d/e*). *f* zeigt eine Metaphase II. Das heterochromatische überzählige Chromosom kann eindeutig erkannt werden (Pfeil). *g-i*: FISH mit der B Chromosomen-spezifischen Probe. Das überzählige Chromosom liegt als univalentes Ringchromosom vor und kann in den Diakinesen eindeutig dokumentiert werden (Pfeile). Der Maßstab beträgt 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.6. Southern blot-Untersuchung

#### 3.3.6.1. B Chromosomen-Spezifität der DNA-Sequenz

Da aus der FISH-Analyse nicht ersichtlich war, ob es sich tatsächlich um eine ausschließlich auf den B Chromosomen vorkommende DNA-Sequenz handelt, wurde noch ein Southernblot-Test durchgeführt (Abb. 23). Hier wurden je 10 µg genomische DNA von *Alburnus alburnus* mit und ohne B Chromosom mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (*EcoRI*, *HindIII* und *PstI*) gespalten. Deutlich ist zu erkennen, dass nur die Tiere mit B Chromosom ein Hybridisierungssignal aufweisen. Es kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Sequenz auch in niedriger Konzentration auf den A Chromosomen vorkommt.

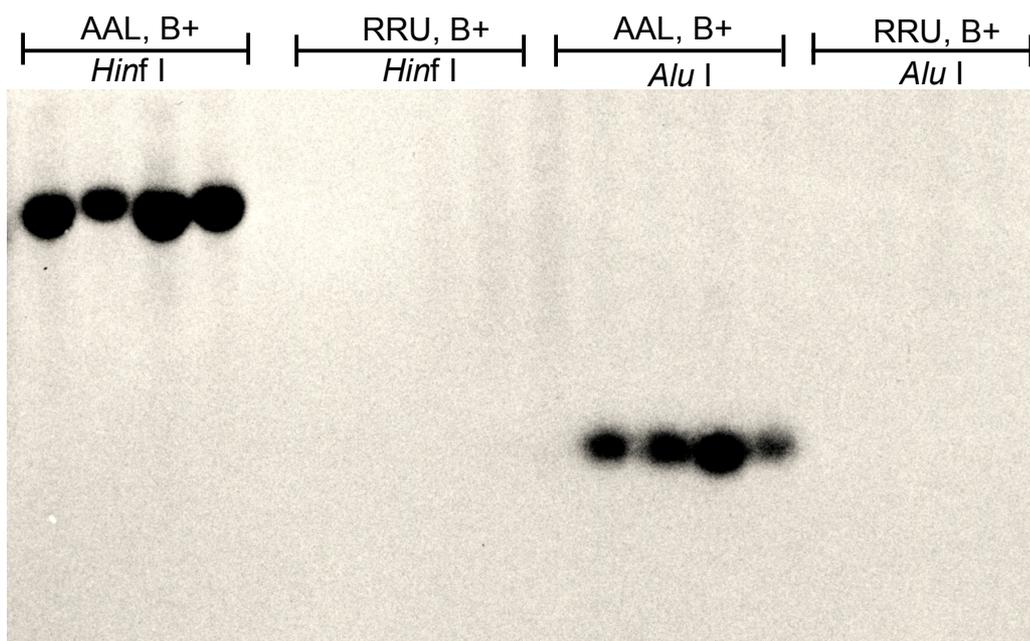


**Abb. 23:** Southern Hybridisierung genomischer DNA von Tieren mit einem B Chromosom (+) und ohne B Chromosom (-), welche zuvor mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten wurden.

Durch AFLP und FISH sowie Southern blot und PCR (S. 77) wird ersichtlich, dass die gefundene und 203-bp umfassende Sequenz B Chromosomen-spezifisch ist und wohl auch den Hauptteil der repetitiven DNA-Sequenz des überzähligen Chromosoms darstellt. Ferner wurden keine populationsspezifischen Unterschiede in der Intensität der Hybridisierungssignale von Tieren aus Main, Edersee, Elbe oder Donau ersichtlich.

### 3.3.6.2. Überprüfung einer interspezifischen Hybridisierung

Der Fisch *Rutilus rutilus* (Cyprinidae) ist ein naher Verwandter von *Alburnus alburnus* und teilt auch dessen Lebensraum. Frühere zytogenetische Untersuchungen zeigten, dass auch dieser ein übergroßes B Chromosom mit ähnlicher Morphologie besitzt (Hafez et al., 1978). Des weitern ist bekannt, dass überzählige Chromosomen einer bestimmten Spezies ihren Ursprung in den Chromosomen einer nah verwandten Spezies haben können (interspezifische Hybridisierung). Deshalb wurde eine Population von *R. rutilus* aus dem Main mit der B Chromosomen-Sonde von *A. alburnus* getestet. Von 23 Fischen wiesen 6 Tiere ein großes, heterochromatisches (C-Bänderung) überzähliges Chromosom auf (Frequenz: 40%). Sowohl die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit der „*A. alburnus*-Sonde“ als auch die Southern Blot-Untersuchung (Abb. 24) zeigten jedoch, dass das B Chromosom von *Rutilus rutilus* aus anderen repetitiven Sequenzen bestehen muss.



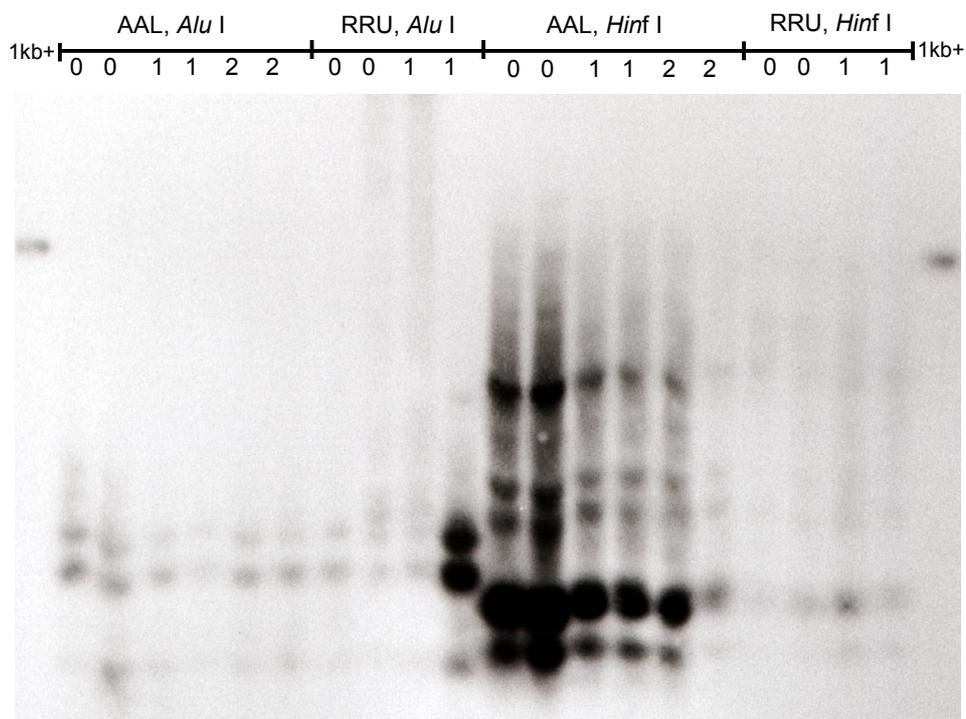
**Abb. 24:** Die Southern blot-Untersuchung zeigt, dass die B Chromosomen-spezifische DNA von *Alburnus alburnus* (AAL) im Genom von B Chromosomen-besitzenden *Rutilus rutilus* (RRU) fehlt.

### 3.3.6.3. Überprüfung einer möglichen Transposonintegration

Ziel dieser Fragestellung war es zu ergründen, ob B Chromosomen generell, auch aufgrund ihres nur geringen Selektionsdrucks zur Aufrechterhaltung aktiver Genfunktionen, zur Transposonintegration neigen oder genauso anfällig für Zufallsintegration retrotransposabler DNA sind wie A Chromosomen. Mehrere Sequenzstudien über B Chromosomen zeigten, dass transposable DNA-Bereiche gefunden wurden (siehe S. 92).

Als Sonde wurde ein in Fischen häufig vorkommendes Retrotransposon, Rex III (1,1 kb-Fragment aus *Xiphophorus maculatus*) bei *Alburnus alburnus* untersucht.

Dieses Retrotransposon wurde sowohl als Sonde in einer FISH-Analyse als auch einem Southern blot eingesetzt. Bei dem Versuch die markierte Sonde auf die Metaphasechromosomen von *A. alburnus* zu hybridisieren, zeigten sich Signale, welche gleichmäßig über alle Chromosomen verteilt waren. Die Southern blot Analyse (Abb. 25) verdeutlicht, dass Rex III-Sequenzen in den A Chromosomen, sowohl von *A. alburnus* als auch *R. rutilus* vorkommen, ob sie auch auf den B Chromosomen vorkommen geht aus diesem Experiment nicht hervor.

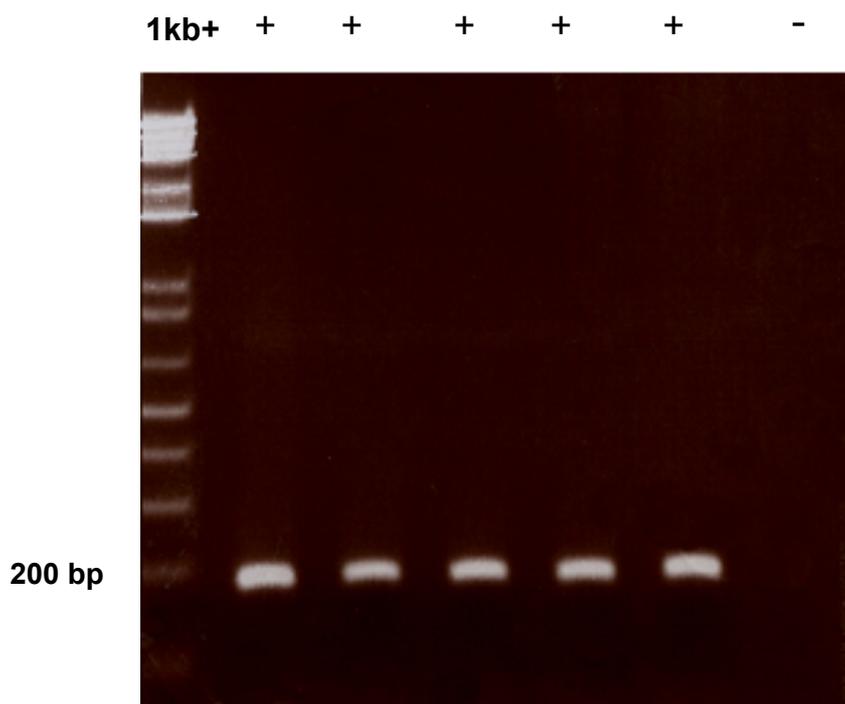


**Abb. 25:** Das Rex III-Retrotransposon kommt mit ähnlicher Kopienzahl in den A Chromosomen sowohl von *Alburnus alburnus* (AAL) als auch *Rutilus rutilus* (RRU) vor. Stärkere Signale sind auf unangeglichene DNA-Konzentrationen in manchen Gelspuren zurückzuführen.

### 3.3.7. Minimal-invasiver Flossentest

Basierend auf Sequenzinformationen von B chromosomaler DNA sollten nun, durch einen einfachen PCR-Test, Fische auf die Anwesenheit des B Chromosoms hin untersucht werden (Abb. 26). Hierzu wurde ein Stück Flossengewebe abgetrennt und genomische DNA extrahiert. Die durch die AFLP-Analyse gewonnenen und sequenzierten 203 bp an B chromosomaler DNA dienten zur Konstruktion spezifischer „forward“ und „reverse“ Primer für einen Schnelltest auf das Vorhandensein des überzähligen Chromosoms mittels PCR.

Dieser Test kann nun zum Auffinden von B Chromosomenträgern in verschiedenen *Alburnus alburnus*-Populationen dienen. Er ist schnell und einfach durchzuführen. Da nur ein kleines Stück der Flosse genutzt werden kann, bietet diese minimal-invasive Methode eine Alternative zur konventionellen Chromosomenpräparation. Fische müssen hierbei zur B Chromosomen Frequenzanalyse nicht mehr getötet werden.



**Abb. 26:** In einem PCR-Test wurden interne Primer zu der isolierten DNA Sequenz verwendet. Fünf Tiere mit (+) und fünf Tiere ohne (-) B Chromosom (hier nur ein Vertreter gezeigt) wurden getestet. Die hohe Sensitivität der PCR-Methode beweist, dass die Sequenz im Genom der Fische ohne überzähligen Chromosom nicht nachweisbar ist.

## 4. Diskussion

### 4.1. Karyotypevolution bei Cypriniden

Cypriniden stellen mit 194 Gattungen und mindestens 2000 Arten die größte Fischfamilie da (Hellmer et al., 1991). In Bezug auf ihre Chromosomenzahl sind sie erstaunlich konservativ. Abgesehen von einigen seltenen polyploiden Arten, variiert die Zahl der Chromosomen in dieser Gruppe nur wenig. Eine diploide Chromosomenzahl von 48-50 und eine Chromosomen-Armzahl von 92-98 ist für die große Mehrzahl der Cyprinidenarten typisch. Jedoch ist eine vergleichende Zuordnung homologer Chromosomen zwischen den einzelnen Weißfisch-Arten aufgrund der geringen Größe der Chromosomen und der bekannten Probleme bei der Erzeugung differentieller Chromosomenbänder schwierig. Eine Besonderheit aller Cypriniden ist ferner das Vorhandensein des großen telozentrischen Chromosomenpaars 1. In wie fern sich dieses allerdings bei den verschiedenen Vertretern gleicht, ist zytogenetisch noch zu untersuchen. Deutlich höhere Chromosomenzahlen können auf diploid-tetraploide Verwandtschaftsverhältnisse zurückgeführt werden (Ohno, 1967).

Diese bei Weißfischen entdeckte Polyploidie ist allerdings ein komplexes Phänomen und hat verschiedene Ursprünge. In der Ordnung der Karpfenfische sind polyploide Tiere in drei Familien aufgetreten, den Cyprinidae, Cobitidae und Catostomidae; unter den Weißfischen v.a. in den Unterfamilien Barbinae und Cyprininae. Der Karpfen, *Cyprinus carpio*, und der Goldfisch, *Carassius auratus*, haben beispielsweise 104 Chromosomen pro somatischem Zellkern, während andere Vertreter der Familie nur 44-54 Chromosomen besitzen. Der DNA-Gehalt pro Kern ist entsprechend unterschiedlich. Während eines bestimmten Abschnittes in der Evolution müssen demnach Karpfen und Goldfisch polyploid geworden sein. Neben ancestral rein tetraploiden Formen wurden aber auch triploide Arten, die von ursprünglich tetraploiden Arten abstammen, entdeckt, was mit einem unisexuellen Fortpflanzungsmechanismus erklärt werden kann. Das Überleben polyploider Formen unter diesen Fischen hängt offenbar mit dem relativ simplen Typ der genetischen Geschlechtsdeterminierung und den oft nicht vorhandenen Geschlechtschromosomen in mehreren Gruppen zusammen (Viktorovsky, 1969). Eine Genompolyploidisierung bei Weißfischen scheint ferner vor über 50 Mio Jahren (mittleres Tertiär) in Südostasien vonstatten gegangen zu sein (Uyeno & Smith, 1972). Den wohl wichtigsten Trend in der Evolution der Karpfenfische stellte dann eine Reduktion der Chromosomenzahl dar.

Diese Tendenz ist unter den relativ spezialisierten Familien der Characidae und Lebiasinidae deutlich nachvollziehbar, wo die Zahl der Chromosomen bei mehreren Spezies auf 22-24 verringert wurde. Die Abnahme der Chromosomenzahlen geschah hauptsächlich durch Erhöhung der Zahl metazentrischer Chromosomen durch zentrische Fusionen akrozentrischer Chromosomen (Scheel, 1972).

Allgemein lässt sich feststellen, dass während der Evolution speziell der Weißfische Robertsonsche Translokationen die häufigste Form chromosomaler Veränderungen darstellten, auch Duplikationen spielten eine wichtige Rolle. Während haploide Individuen bei Fischen nicht lebensfähig sind, scheinen triploide Formen häufig vorzukommen.

#### **4.2. Karyotypstruktur der Spezies *Alburnus alburnus***

In der vorliegenden Arbeit wurden Tiere mit einer diploiden Chromosomenanzahl von 50, 51 und 52 gefunden. Fische, welche nur die „regulären“ 50 A Chromosomen besitzen, wiesen 14 metazentrische, 14 submetazentrische, 14 subtelozentrische und 8 telozentrische Chromosomen, mit einem N.F.-Wert von 92, auf. Cataudella et al. (1977) fanden bei ihren Untersuchungen von *Alburnus alburnus* 16 metazentrische, 10 submetazentrische, 16 subtelozentrische und 8 telozentrische A Chromosomen und ebenfalls eine N.F. von 92.

Ein oder zwei zusätzliche B Chromosomen wurden bei *Rutilus rutilus* und *Alburnus alburnus* entdeckt. Bei ersterem findet man ein großes metazentrisches überzähliges Chromosom, bei *A. alburnus* darüber hinaus noch ein zweites sehr großes submetazentrisches B Chromosom, so dass sich die Zahl der Chromosomenarme auf 94 bzw. 96 erhöht. Weitere Fischarten mit vergleichbar großen überzähligen Chromosomen sind *Astyanax scabripinnis* und *Microlipidogaster leucofrenatus*. Die hier entdeckten zusätzlichen Chromosomen sind aber höchstens gleichgroß wie das größte A Chromosomenpaar. Da aber B Chromosomen gewöhnlich kleiner als die regulären Chromosomen des Karyotyps sind, stellen wohl Fische mit derart großen überzähligen Chromosomen eine Ausnahmeerscheinung dar. Intra- und interspezifische Variabilitäten hinsichtlich der Chromosomenzahlen sind von mehreren Fischarten bekannt (Ohno et al., 1965). Eine mögliche Erklärung wäre, dass Populationen mit unterschiedlichen Chromosomensätzen vorkommen. Im Falle von *Alburnus alburnus* kann jedoch, auch aufgrund der heterochromatischen Natur der zusätzlichen Chromosomen, davon ausgegangen werden, dass es sich tatsächlich um B Chromosomen und nicht um eine andere Art von Polymorphismus handelt.

### **4.3. Meiotische Chromosomen**

Über Studien an meiotischen Chromosomen bei Cypriniden wurde bislang nur von wenigen Arten berichtet, wie z.B.: *Abramis brama*, *A. abllerus*, *Aspius aspius*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Gobio gobio* und von einigen wenigen *Leuciscus*-Arten (Nygren et al., 1975). Immer wurden normal gepaarte Bivalente beschrieben, die auf den evolutiv diploiden Stand der Arten verweisen. Bei tetraploiden Arten wurde bislang die männliche Diakinese bei *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* (Ohno et al., 1967) und in *Barbus barbus* (Ohno, 1970) untersucht. Auch in diesen Analysen wurden gewöhnlich gepaarte Bivalente beschrieben. Chromosomen-Bänderungstechniken wurden auf meiotische Chromosomen bislang nicht angewandt.

Der Schwerpunkt bei der Analyse meiotischer Chromosomen von *Alburnus alburnus* lag bei der Aufdeckung des Paarungsverhaltens der beiden B Chromosomen. Diese könnten entweder ein normal gepaartes Bivalent in der meiotischen Prophase ausbilden oder als zwei getrennte Univalente vorliegen. Bei *Moenkhausia sanctaefilomenae* bildeten beispielsweise zwei B Chromosomen ein Bivalent in der Metaphase I und im Pachytän, auch wurde ein univalent liegendes überzähliges Chromosom gefunden (Portela-Castro et al., 2001). Eine derartige Analyse war bei der Ukelei nicht möglich, da hierfür geschlechtsreife männliche Tiere mit zwei B Chromosomen benötigt werden, im Lauf der vorliegenden Untersuchung aber nur zwei Individuen von *A. alburnus* (aus über 300 Fischen) mit zwei zusätzlichen Chromosomen entdeckt wurden, die zudem weiblichen Geschlechts waren. Lediglich bei einem geschlechtsreifen männlichen Exemplar konnten überhaupt Meiosestadien mit einem B Chromosom studiert werden. So zeigte sich, dass das zusätzliche Chromosom als univalentes Ringchromosom vorliegt und mit keinem der A Chromosomen paart. Aufgrund der symmetrischen Verteilung der gefundenen retrotransposablen Sequenz über beide B Chromosomenarme wird eine solche Ring-Formation begünstigt. Ein funktioneller Beweis der Selbstpaarung des überzähligen Chromosoms muss durch die Analyse von synaptonemalen Komplexen noch erbracht werden. Die A Chromosomen paaren in typischen Ring- und Kreuzkonfigurationen. Die Ausbildung dieser Strukturen der Bivalente im Diplotän, in der Diakinese und in der Metaphase I hängt von der Lage der Chiasmata ab. Beim Übergang vom Diplotän zur Diakinese verkürzen sich die Chromatiden und die Homologen entfernen sich so weit voneinander, wie es die Verknüpfung über die Chiasmata zulässt. Der relativ entspannteste Zustand ist offenbar der, bei dem die Ebenen der Homologen vor und nach einem Chiasma senkrecht zueinander stehen.

Aus einem Bivalent mit einem Chiasma entsteht so ein Kreuz ohne Überschneidungen in der Diakinese, aus einem Bivalent mit zwei Chiasmata bilden sich mehr oder weniger komplizierte Ringfiguren (Schmid et al., 1988; Traut, 1991). Nicht selten sieht man Bivalente, die nur noch an ihren Enden zusammenhängen („terminal association“). Einen besonderen Effekt kann die Anwesenheit von B Chromosomen auf die Chiasmafrequenz im Chromosomensatz haben. Meist erhöhen B Chromosomen die Chiasmafrequenz, selten erniedrigen sie sie (Traut, 1991). Ein B Chromosomeneffekt konnte bei *A. alburnus* nicht dokumentiert werden.

Auch bei *Astyanax scabripinnis* wurde das Paarungsverhalten eines B Chromosoms untersucht (Mestriner et al., 2000). Analysen synaptonemaler Komplexe (SCs) zeigten hier 26 komplett paarende SCs bei männlichen Individuen mit einem überzähligen Chromosom auf. 25 entsprechen den A Bivalenten einer dem selbstpaarenden B Chromosom. Die Ringkonfiguration des univalenten B Chromosoms verblieb bis zur Metaphase I und ließ vermuten, dass die beiden Arme ein Chiasmata formten. Aufgrund zusätzlicher Daten über das C-Bandenmuster schlossen die Autoren, dass das B Chromosom von *Astyanax scabripinnis* ein Isochromosom eines der A Chromosomen 24 darstellt.

## **4.4. Populationsstudien**

### **4.4.1. Studien bei *Alburnus alburnus***

Die Populationsstudien zur Ermittlung der B Chromosomenfrequenz bezogen sich allesamt auf Deutschland. Es konnten Fische von Fundorten aus Ost-, Süd- und Mitteldeutschland untersucht werden. Im November 1997 wurden bereits Stichproben an etwa 30 Jungfischen aus dem Edersee durchgeführt. B Chromosomen waren bei 30 % der Tiere vorhanden. Diese Erscheinungshäufigkeit der überzähligen Chromosomen entsprach in etwa der von Hafez et al. (1978) beschriebenen. Eine französische Population von *Alburnus alburnus* mit 56 analysierten Tieren zeigte, dass 28% der Individuen ein und 2% sogar zwei übergroße, metazentrische B Chromosomen besaßen. Die Frequenz der B Chromosomen schien in den Populationen, wo sie vorhanden waren relativ hoch zu sein, allerdings waren zusätzliche Chromosomen auch nur auf gewisse Populationen beschränkt.

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten einige wichtige Fragen zur Erscheinungshäufigkeit der B Chromosomen in verschiedenen Populationen von *A. alburnus* beantwortet werden. Allerdings stellte sich heraus, dass im Vergleich zu den Untersuchungen von Hafez et al. (1978), die Frequenz bei 5 Analysen deutlich niedriger war (Edersee 1: 11%, Main 1 und 2: 11%, Elbe: 11% und Donau: 4%).

Fische mit B Chromosomen zeigten entweder ein etwas kleineres metazentrisches oder ein größeres submetazentrisches. Die zweite Untersuchung von Tieren aus dem Edersee zeigte eine deutlich höhere Erscheinungshäufigkeit der überzähligen Chromosomen. So besaßen 40% der Fische ein zusätzliches Chromosom und 4% sogar zwei. Eines dieser weiblichen Tiere zeigte zwei homologe metazentrische B Chromosomen auf. Der zweite Fisch besaß die zwei morphologisch unterschiedlichen B Chromosomen, welche bereits bei den anderen Populationsstudien beobachtet wurden. Diese B Chromosomenfrequenz zeigt wiederum eine relativ gute Übereinstimmung mit den Funden von Hafez et al. (1978). Die B Chromosomen-Frequenzanalyse der Flüsse Main, Elbe und Donau zeigt, dass B Chromosomenträger mit einer relativ konstanten Häufigkeit gefunden wurden. Da immer 30-70 Fische untersucht wurden, scheint die Erscheinungshäufigkeit von Tieren mit B Chromosom der tatsächlichen dort vorkommenden Frequenz zu entsprechen. Die höherer Frequenz des überzähligen Chromosoms in der Edersee-Population des Jahres 2000 könnte dadurch erklärt werden, dass in dieser relativ kleinen und geschlossenen Population intensiv Fischerei betrieben wird. Dies könnte die genetische Zusammensetzung der Spezies beeinflussen. Da Tiere nicht migrieren können, könnte sich dann in solch einem System, aufgrund des Gründereffekts („genetischer Flaschenhals“) die B Chromosomenfrequenz in den zwei aufeinanderfolgenden Jahren „hochgeschaukelt“ haben. Dies bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, so müssen zusätzlich Kreuzungsexperiment unternommen werden um die Keimbahn-Weitergabe des B Chromosoms zu studieren.

#### 4.4.2. Ergebnisse an anderen Spezies

Grundsätzlich ist festzustellen, dass ganz gleich welche Spezies mit B Chromosomen auch untersucht wird, Schwankungen innerhalb diverser Population auftreten können. Bei *Astyanax scabripinnis* konnte beispielsweise neben B Chromosomen-Frequenzschwankungen in Population aus verschiedenen Höhenlagen auch eine signifikante Assoziation der B Chromosomen mit dem weiblichen Geschlecht festgestellt werden (Neo et al., 2000; Mestriner et al., 2000). Deutlich mehr B Chromosomen konnten ferner auch in weiblichen Fischen von *Microlepidogaster leucofrenatus* (Andreatta et al., 1993) und auch bei einer der Untersuchungen von *Alburnus alburnus* aus dem Edersee registriert werden. Bei *Moenkhausia sanctafilomenae* (Portela-Castro et al., 2001) verhielt es sich jedoch umgekehrt, d.h. männliche Tiere besaßen zwei mikro-B Chromosomen (Tabelle 3). Ob generell weibliche Individuen, speziell kaltblütiger Vertebraten, eine höhere Zahl an B Chromosomen tolerieren können muss noch an weiteren Spezies untersucht werden.

Möglich wäre, dass bei *A. alburnus* ein auf zwei überzähligen Chromosomen beruhender alternativer Geschlechtsbestimmungsmechanismus vorkommt, welcher die Differenzierung zum weiblichen Geschlecht verursacht. Hierfür müssten allerdings Gene auf den B Chromosomen gefunden werden, welche die Differenzierung zum weiblichen Geschlecht begünstigen. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da auf überzähligen Chromosomen kaum Gene gefunden wurden und diese meist mit der Fruchtbarkeit und Entwicklungsrate von Pflanzen zu tun haben (Jones & Rees, 1982). Bei dem neuseeländischen Frosch *Leiopelma hochstetteri* wurde dennoch ein ♀OW/♂OO-Geschlechtsbestimmungssystem gefunden, das auf einem univalenten, das weibliche Geschlecht determinierenden B Chromosom basiert (Green, 1988). Auszuschließen ist aber auch nicht, dass in einer zukünftigen Untersuchung, welche eine größere Zahl an Fischen mit einbezieht, auch männliche Tiere mit 2 B Chromosomen im Edersee gefunden werden könnten. Eine zweite mögliche Erklärung für das Vorkommen von weiblichen Fischen mit mehr überzähligen Chromosomen könnte auch ein selektiver Nachteil für männliche Embryonen mit mehreren B Chromosomen sein. Eine dritte Möglichkeit wäre die Eliminierung überzähliger Chromosomen in der frühen männlichen Embryogenese (Schmid et al., im Druck 2002). Unterschiede in der B Chromosomen-Frequenz zwischen den Populationen können des Weiteren auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. So können selektive Einflüsse, wie z.B. die ökologische Toleranz unter gewissen (ungünstigen) Umwelteinflüssen gegenüber B Chromosomenträgern einer Population, eine Rolle spielen. Aber auch „historische“ Faktoren, wie beispielsweise die Anzahl der Generationen seit der Entstehung des B Chromosoms müssen berücksichtigt werden. Ferner spielt auch die Transmissionsrate eine entscheidende Rolle, so können B Chromosomen in verschiedenen Populationen unterschiedlich stark akkumulieren. Schließlich seien noch Zufallsfaktoren zu nennen, z.B. die Wirkung von genetischem Drift auf Populationen einer bestimmten Größe. Alle diese genannten Faktoren können natürlich auch gleichzeitig einwirken, so dass der Einfluss jeder einzelnen Komponente schwer nachvollziehbar ist. Die maximale Anzahl an B Chromosomen, welche eine bestimmte Art toleriert kann somit, aufgrund der genannten Einflüsse, stark variieren. B Chromosomen erreichen ihre höchste Frequenz unter Bedingungen, die für das Wachstum der betreffenden Spezies am günstigsten sind. Als Rekorde sind die Pflanze *Zea mays* mit 34 B Chromosomen, sowie bei Tieren *Xylofa nemorum* (Diptera) mit 20 zusätzlichen Chromosomen zu nennen (nach Jones & Rees, 1982). Pflanzen können aufgrund der Nutzbarmachung wohl eher eine größere Zahl überzähliger Chromosomen tolerieren.

Intra- und interspezifische Variabilität in der Zahl und der Häufigkeit von B Chromosomen ist demnach ein allgemein bekanntes Charakteristikum und kann verschiedene Ursachen haben (Beukeboom, 1994).

Zusammenfassend lässt sich speziell zu den bisher bei Fischen beschriebenen B Chromosomen sagen, dass sie sehr klein und variabel in ihrer Zahl zwischen verschiedenen Zellen, Individuen und/oder Populationen sind, wie bei Salmonoiden und Characoiden (Pauls & Bertollo, 1983), oder sehr groß und recht stabil in ihrer Zahl bei den eigentlichen Weißfischen, wie *Alburnus alburnus* (Hafez et al., 1978).

untersuchte Fischspezies	Anzahl der Tiere	mit Bs	2n	Zahl der B Chromosomen	Größe	Typ	Assoziation mit Geschlecht
<b>Prochilodontidae</b>							
<i>Prochilodus scrofa</i>	62	61	54	0 bis 5	mikro	/	/
<i>P.cerenis</i>	7	5	54	0 bis 2	mikro	/	/
<b>Curimatidae</b>							
<i>Cyphocharax modesta</i>	17	1	54	1	mikro	/	/
<b>Paradontidae</b>							
<i>Apareidon piracicabae</i>	20	1	54	1	groß	m	/
<b>Characidae</b>							
<i>Oligosarcus pintoii cit.</i>	19	2	50	1	groß	m	/
<i>Moenkhausia intermedia</i>	14	8	50	1	klein	/	/
<i>M. sanctafilomenae</i>	30	30	50	1 bis 8	mikro	/	/
<i>M. sanctafilomenae</i>	18	18	50	0 bis 2	mikro	a	mehr ♂
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	3	1	50	1	groß	m	/
<i>A.scabripinnis</i>	29	3	50	0 bis 2	klein	/	/
<i>A.scabripinnis</i>	15	1	50	1	groß	m	/
<i>A.scabripinnis</i>	32	28	50	0 bis 2	groß	m	/
<i>A.scabripinnis</i>	92	73	50	0 bis 2	groß	m	mehr ♀
<i>Characidium cf zebra</i>	28	1	50	1 oder 2	klein	a	/
<i>Piabina argentea</i>	12	1	52	1	klein	/	/
<b>Primelodidae</b>							
<i>Primilodella kronei</i>	5	1	50	1	mikro	/	/
<i>Bergiaria westermanni</i>	7	7	56	1 bis 5	klein	/	/
<i>Rhadia quelen</i>	30	13	58	0 bis 2	klein	/	/
<i>R. hilarii</i>	51	50	58	0 bis 5	klein	/	/
<b>Callichthyidae</b>							
<i>Corydoras aeneus</i>	33	9	60	0 bis 3	klein	/	/
<i>Callichthys callichthys</i>	27	18	58	0 bis 16	mittel	m/sm	/
<b>Loricariidae</b>							
<i>Microlepidogaster leucofrenatus</i>	34	9	54	0 bis 2	groß	m/sm	mehr ♀
<b>Cichlidae</b>							
<i>Gymnogeophagus balzanii</i>	4	3	48	0 bis 4	mikro	/	/

<b>Cyprinidae*</b>							
<i>Rutilus rutilus</i>	23	6	50	1	groß	m	/
<i>Alburnus alburnus</i> (Edersee)	54	24	50	1	groß	m/sm	7 ♂, 15 ♀
	54	2	50	2	groß	m/sm	0 ♂, 2 ♀
<i>Alburnus alburnus</i> (Main)	23	2	50	1	groß	m/sm	1 ♂, 1 ♀

**Tabelle 3:** Untersuchungen zur B Chromosomenfrequenz in Knochenfischen (modifiziert nach Salvador & Moreira-Filho, 1992). a = akrozentrisch; m = metazentrisch; sm = submetazentrisch; / = keine Angaben, \* aktuelle Analyse.

#### 4.4.3. Modelle zur B Chromosomendynamik

B Chromosomen können als Art von Genomsymbionten angesehen werden, deren Populationsdynamik von zwei wichtigen Eigenschaften abhängt, ihrem Effekt auf die Genomfitness und ihrem Weitergabemechanismus. So sollten sie kurz nach ihrer Entstehung einen Anhäufungsmechanismus besitzen, ansonsten könnte ihre Proliferation nur dadurch herrühren, dass sie irgendeinen Vorteil für den betreffenden Organismus haben. Dies sind die zwei einzigen erklärlichen Wege, die zur Etablierung eines dauerhaften Polymorphismus in natürlichen Populationen führen, denn falls B Chromosomen für ihre Besitzer schädlich wären, könnten sie nur bestehen, falls ihre Fähigkeit zum Akkumulieren größer ist, als die negativen Effekte auf ihre Träger. Es gibt zwei verschiedene Modelle, die versuchen die B Chromosomendynamik zu erklären, das „heterotische Modell“ (White, 1973) und das „parasitische oder selbstsüchtige“ Modell (Nur, 1966; Jones, 1985). Beide Modelle nehmen an, dass die B Chromosomen-Frequenz in aktuell betrachteten Populationen im Gleichgewicht ist. Der erste Ansatz geht nun von einer Balance zwischen den positiven Einflüssen von B Chromosomen auf die Fitness aus, falls sie in nur geringer Zahl vorkommen, und deren negativen Effekten in hoher Zahl. Ein Beispiel hierfür wäre, der Schnittlauch, *Allium schoenoprasum*, wo Pflanzen mit überzähligen Chromosomen in natürlichen Populationen eine höhere Überlebensrate haben, als die ohne (Plowman & Bougourd, 1994). Auch beim Pilz *Nectria haematococca* (Miao et al., 1991) wurde ein B Chromosom mit einem Nutzen für den Träger gefunden (Toxinresistenz). Die parasitisch-selbstsüchtige Betrachtungsweise nimmt einen Gleichgewichtszustand, als Ergebnis der B Chromosomenanhäufung und deren nachteiligen Einflüssen auf die Träger der überzähligen Chromosomen, an. Ein Beispiel hierfür ist die parasitierende Wespe *Nasonia vitripennis* (Nur et al., 1988). Eine dritte Betrachtungsweise wäre die, dass in natürlichen Populationen B Chromosomenträger eine gewisse Toleranz („B Resistenzgene“) gegenüber diesen Genomelementen ausbilden.

Bei der Heuschrecke *Locusta migratoria* (Castro et al., 1998) kommen beispielsweise „neutrale“ überzählige Chromosomen vor, ohne erkennbar schädliche Auswirkungen.

#### **4.5. Zytogenetische Charakteristika der B Chromosomen**

Im Karpfenfisch *Alburnus alburnus* wurden die bislang größten überzähligen Chromosomen unter den Vertebraten entdeckt. Vergleichbar große B Chromosomen konnten bislang nur bei drei weiteren Arten, allesamt Fische, entdeckt werden: *Astyanax scabripinnis*, *Microlipidogaster leucofrenatus* und *Rutilus rutilus*. Diese überzähligen Chromosomen sind aber entweder kleiner oder höchstens gleichgroß wie die A Chromosomen.

Bei der zytogenetischen Bänderanalyse zeigte sich, dass die Erzeugung qualitativ guter C-Bänder bei Fischchromosomen generell und auch bei *Alburnus alburnus* problematisch ist. Bei *A. alburnus* konnte so Auskunft über die Verteilung des konstitutiven Heterochromatins in den A und B Chromosomen gewonnen werden. C-Banden-positive Bereiche konnten den zentromerischen bzw. perizentromerischen Regionen der A Chromosomen sowie dem gesamten Bereich der B Chromosomen zugeordnet werden. Die heterochromatische Natur zusätzlicher Chromosomen ist meist ein generelles Kennzeichen. Auch bei *Astyanax scabripinnis* sind alle drei vorkommenden B Chromosomentypen überwiegend aus diesen hochrepetitiven Sequenzen aufgebaut (Neo et al., 2000), das selbe gilt auch für das große überzählige Chromosom von *Rutilus rutilus* (Rab & Roth, 1989). Es gibt aber auch Berichte über euchromatische überzählige Chromosomen bei Fischen, wie *Steindachnerina inssculpta* (Oliveira & Foresti, 1993) oder über nur teilweise heterochromatische B Chromosomen: *Rhamdia hilarii* (Fenocchio & Bertollo, 1990).

Die Lage der aktiven Nukleolus Organisator Regionen konnte mittels AgNO<sub>3</sub>-Färbung eindeutig dem subtelozentrischen Chromosomenpaar 16 zugeordnet werden. Bei vielen weiteren Cypriniden, besonders aus der Unterfamilie der Leuciscinae konnten aktive NOR durch die Silberfärbung nachgewiesen werden. Bei vielen Vertretern lagen diese an den Enden der kurzen Arme der kleinen subtelozentrischen Chromosomen, mit Ausnahme von *Aspius aspius*, wo die NOR, wohl aufgrund einer Inversion oder Translokation, an den Enden der langen Arme lagen (Rab et al., 1991). Ein völlig anderer Ort wurde jedoch für *Tinca tinca* übermittelt. Hier konnten die NOR interstitiell auf dem drittgrößten Paar der metazentrischen Chromosomen lokalisiert werden (Mayr et al., 1986). Die Übereinstimmung von Signalen der GC-spezifischen Fluorochrome und der mittels Silberfärbung gefundenen Lage der NOR konnte für mehrere Weißfischarten bewiesen werden (Mayr et al., 1986; Schmid & Guttenbach, 1988).

Zusätzliche aktive NOR-Loci konnten bislang weder auf weiteren A Chromosomen noch den B Chromosomen von *A. alburnus* nachgewiesen werden. Aktive NOR wurden zwar bereits öfters auf überzähligen Chromosomen entdeckt, wie z.B. bei *Leiopelma hochstetteri* (Green, 1988) oder bei der Fliege *Simulium juxtacrenobium* (Brockhouse et al., 1989), allerdings gibt es keine genauen Informationen über deren Vorkommen auf B Chromosomen von Fischen.

Bei der Untersuchung des Replikationsverhaltens der B Chromosomen in *Alburnus alburnus* konnten durch Zugabe von BrdU zu Zellkulturen früh und spät replizierende Chromosomenbereiche/Chromosomen sichtbar gemacht werden. Gute Replikationsbanden konnten in den A Chromosomen von *A. alburnus* erzeugt werden. Vor allem wurde aber die heterochromatische Natur und das damit verbundene, späte Replizieren der B Chromosomen deutlich. Überzählige Chromosomen erscheinen wegen des ausschließlichen Desoxythymidin-Einbaus sehr dunkel. Auch bei *Prochilodus lineatus* konnte durch 5-BrdU-Einbau das späte Replizieren der Fisch B Chromosomen verdeutlicht werden (Maistro et al., 2000). Qualitativ gute bis sehr gute Replikationsbanden und damit eine eindeutige Zuordnung homologer Chromosomen bei Fischen konnten des weiteren bei zwei Spezies der Gattung *Eigenmannia* (Toledo Almeida et al., 1988), bei *Rutilus rutilus* und *Scardinius erythrophthalmus* (Hellmer et al., 1991) erzeugt werden. Die Erzeugung typischer G-Banden mittels klassischer Protein-denaturierender Prozeduren ist bei kaltblütigen Vertebraten nur selten möglich, bzw. umstritten (Schmid, 1978a). Dass allerdings strukturelle R-Banden der frühen Replikationsphase und strukturelle G-Banden den spät replizierenden Abschnitten zugeordnet werden, konnte bereits bei der Fischart *Monopterus albus* gezeigt werden (Liu, 1983).

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbungen konnte keine differenzierende Bänderung dargestellt werden. Die Erzeugung klassischer G- und R-Banden im Euchromatin der Fischchromosomen war, wie auch generell bei kaltblütigen Vertebraten (Schmid et al., 1983), nicht möglich. Dies liegt an dem Fehlen GC-reicher Isochoren dieser Genomen (Schmid & Guttenbach, 1988). Neben dem europäischen Aal, *Anguilla anguilla*, bei dem ein klares Bandenmuster im Euchromatin dargestellt werden konnte (Wiberg, 1983), ist nur noch eine weitere Fischart, *Labeo bicolor* (Cypriniformes) mit sehr schwacher euchromatischer Bänderung beschrieben (Medrano et al., 1988). Mit der DA/Mithramycin bzw. DA/Chromomycin A<sub>3</sub>-Fluoreszenzfärbung konnten bei *Alburnus alburnus* die NOR auf Chromosomenpaar 16 nachgewiesen werden, ansonsten zeigten einige homologe Chromosomen hellere, Mithramycin-positive Abschnitte, ohne dass konkrete Bandenmuster zu erkennen waren.

Das wohl zur Mehrzahl aus GC-reichen-Sequenzen bestehende B Chromosom ist das hellste Chromosom im Karyotyp. Mit den AT-spezifischen Fluorochromen DA/DAPI, DA/Hoechst 33258 bzw. Quinacrin mustard konnte nur eine weitgehend uniforme Färbung der Fischchromosomen erzielt werden, ohne dass irgendeine Bänderung zu erkennen war.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit der biotinylierten 18S/28S rDNA-Probe führten bei *Alburnus alburnus* zu einer Bestätigung des bereits mit der Silberfärbung gefundenen Ergebnisses, d.h. das homologe Chromosomenpaar 16 trägt die 18S/28S rRNA-Gene. Eine mitotische Assoziation der Chromosomen mit ihren rRNA-Genen konnte dokumentiert werden. Dies kann als Zeichen für die Organisation eines gemeinsamen Nukleolus der beiden NOR im vorhergehenden Interphasekern gedeutet werden (Schmid & Steinlein, 1991). Auf keinen weiteren A Chromosomen oder B Chromosomen konnten ribosomale Gene lokalisiert werden. Bei vielen verschiedenen Fischen wurden bereits in situ Hybridisierungen mit markierten 18S/28S rDNA-Proben durchgeführt. Information, dass diese Gene auf B Chromosomen von Fischen gefunden wurden, gibt es jedoch keine. Auf überzähligen Chromosomen anderer Vertebraten können aber durchaus die ribosomalen 18S/28S Sequenzen lokalisiert werden. Ferner stellt rDNA die bisher häufigste Form tandemartig wiederholter DNA auf B Chromosomen dar (Green, 1990; Cabrero et al., 1999). Da NOR Regionen zu Chromosomenbrüchen neigen, könnten sie einen Mechanismus darstellen, der zur Erzeugung von B Chromosomen beiträgt. Bei dem südamerikanischen Beutelfrosch *Gastrotheca espeletia* wurde beispielsweise ein NOR-tragendes B Chromosom nach Silberfärbung/FISH entdeckt (Schmid et al., im Druck 2002). Solch ein B Chromosom, das möglicherweise ein autosomales Fragment mit NOR-Region darstellt, könnte die rDNA durch intrachromosomale Rekombination wieder verlieren. Dies könnte zum Teil erklären, wie überzählige Chromosomen degenerieren, da Variationen in der Zahl der rDNA-Sequenzen die Chromosomengröße oft erheblich beeinflussen. Das Vorhandensein ribosomaler DNA auf B Chromosomen könnte rein zufällig, aufgrund der Transposonkapazität von rDNA zustande kommen. Ferner kann zusätzliche rDNA auf B Chromosomen auch einen selektiven Vorteil für die Träger bedeuten. Beim Salamander *Dicamptodon tenebrosus* wurde auch rDNA auf einem B Chromosom gefunden. Sessions (1984) schreibt ihr eine adaptive Bedeutung zu. So könnte es, aufgrund zusätzlicher Amplifikation der rRNA-Gene, zu einem schnelleren Wachstum der Tiere bei kalten Temperaturen kommen.

Die in situ Hybridisierungen mit der biotinylierten 5S rDNA-Probe zeigen, dass wohl insgesamt sechs Chromosomen Träger dieser Gene sind, wobei auf zweien keine eindeutigen Signale erkannt werden konnten. Dies ist möglich, wenn die mittelrepetitiven 5S rRNA-Gene hier nur in einer so geringen Kopienzahl vorkommen, dass sie unter der Nachweisgrenze der FISH liegen. Eine weitere Erklärung könnten präparative Probleme, bei der Denaturierung, der Hybridisierung oder der Antikörperbindung dieser Chromosomen sein. B Chromosomen beider Morphologien waren 5S rDNA-negativ. Bei vielen Fischarten liegen die 5S rDNA-Sequenzen ebenfalls nicht auf den Chromosomen, auf denen die 18S/28S rDNA vorkommt. Ein Beispiel ist *Astyanax scabripinnis*. Hier hybridisierte die 5S rDNA-Sonde an 8 Orten auf 4 verschiedenen Chromosomenpaaren (Ferro et al., 2001). Auch bei der südamerikanischen Fischgattung *Leporinus* (Characiformes) wurden die 5S rRNA-Genorte lokalisiert. Untersucht wurden *Leporinus elongatus*, *Leporinus obtusidens*, *Leporinus friderici* (Martins & Galetti, Jr., 1999). Zu den 18S/28S rRNA-Genorten verschiedene Chromosomenloci wurden ferner bei *Anguilla anguilla* (Pendas et al., 1994; Martinez et al., 1996), *Salmo trutta* (Moran et al., 1996) und *Hoplias malabaricus* (Born & Bertollo, 2001) entdeckt. In einigen Spezies konnten 5S rDNA-Sequenzen auf den gleichen Chromosomen wie die 18S/28S rDNA lokalisiert werden, wie bei *Salmo salar* (Pendas et al., 1994) und *Oncorhynchus mykiss* (Moran et al., 1996). Nach wie vor gibt es keinerlei Information, ob auf B Chromosomen überhaupt und im Speziellen bei Fischen 5S rRNA Gene gefunden wurden.

Die in situ Hybridisierungen mit der bei Vertebraten universellen Telomerprobe (TTAGGG)<sub>n</sub> zeigten, dass sowohl die A als auch das B Chromosom normale vier Endsignale aufweisen. Fehlende Endschutzkappen, wie sie beispielsweise bei einem B Chromosom des südamerikanischen Frosches *Gastrotheca espeletia* entdeckt wurden, könnten einen Mechanismus darstellen, durch welchen überzählige Chromosomen verloren gehen können (Schmid et al., im Druck 2002). Keinerlei interstitielle Telomersequenzen konnten ferner im überzähligen Chromosom lokalisiert werden. Dies hätte auf einen möglichen Entstehungsmechanismus des großen B Chromosoms aus Fusionsereignissen akrozentrischer A Chromosomen hindeuten können. Bisher gibt es auch nur wenig Literatur über Fischchromosomen, bei denen versucht wurde, die Telomerrepeats zu lokalisieren. Neben vier Störarten (Fontana et al., 1998) untersuchten Meyne et al. (1990) zwei weitere Fischordnungen, Cypriniformes und Salmoniformes. Die 3 Arten *Gambusia affinis*, *Eigenmannia virescence* und *Eigenmannia sp.* wiesen alle telomerspezifische Signale auf.

Zusammenfassend ließ sich aus der zytogenetischen Bänderanalyse zeigen, dass die B Chromosomen von *Alburnus alburnus* sehr groß, heterochromatisch, spät-replizierend und reich an GC-Basenpaaren sind. Weder heteromorphe Geschlechtschromosomen noch geschlechtsbezogene heterochromatische Regionen bzw. geschlechtsspezifische Unterschiede bei den BrdU/dT-Replikationsbanden konnten bei *A. alburnus* gefunden werden.

#### **4.6. Genomgröße und DNA-Gehalt bei Cypriniden**

Die minimal-invasive Bestimmung der Genomgröße von *Alburnus alburnus* mittels Durchflußzytophotometrie von Rückenflossengewebe ergab nach Lamatsch et al. (2000) einen DNA-Gehalt 3,08 pg/Nukleus (CV=3,36). Mehrere durchflußzytophotometrische Messungen von Flossenzellen wurden nochmals durchgeführt und ergaben durchschnittlich 3,2 pg, allerdings war der Variationskoeffizient (CV), welcher die Qualität der Messungen angibt ebenfalls sehr schlecht, mit CV=3,5. Sehr gute bis gute CV-Werte liegen zwischen 1-2 und waren nur bei Messungen von Erythrozyten zu erreichen. Der absolute DNA-Gehalt wurde deshalb im weiteren durch die sehr viel genaueren Messungen an frisch entnommenen oder eingefrorenen Erythrozyten ermittelt.

103 Individuen aus verschiedenen Populationen von *Alburnus alburnus* konnten analysiert werden. Der gemittelte Wert von Tieren ohne B Chromosom ergab  $3,43 \pm 0,46$  pg DNA/Nukleus und entspricht somit fast den zytophotometrisch an Flossenzellen gemessenen 3,2 pg bzw.  $\sim 3,1$  pg (Lamatsch et al., 2000), führt also zu übereinstimmenden Bestimmungen des DNA-Gehalts in *A. alburnus*. Fische mit überzähligem Chromosom wiesen durchschnittlich  $3,76 \pm 0,33$  pg DNA/Kern auf. Der DNA-Gehalt des B Chromosoms entspricht folglich 9% des gesamten DNA-Gehalts. Wie diese Messungen deutlich zeigen, können B Chromosomen den Gesamt-DNA-Gehalt oft erheblich steigern, so dass Individuen mit und ohne überzählige Chromosomen, aufgrund des damit gestiegenen AT-Reichtums, leicht bei der Messung mit dem Fluorochrom Hoechst 33258 identifiziert werden können.

Mauro & Micheli (1979) bestimmten bereits vor über 20 Jahren die Chromosomenanzahl und den DNA-Gehalt von insgesamt sieben Vertretern aus der Familie der Weißfische. Diploide Arten wiesen eine durchschnittliche Chromosomenzahl von  $2n = 48-50$  auf. Der über DNA Reassoziationskinetik bestimmte DNA-Gehalt ( $10^{-12}$  g DNA/2C) betrug für *Tinca tinca* = 1,62, für *Scardinius erythrophthalmus* = 1,87, für *Leuciscus cephalus* = 2,53 und für *Alburnus alburnus* = 2,75.

Phylogenetisch tetraploide Vertreter hatten  $2n = 100-104$  Chromosomen und einen DNA-Gehalt von 3,40 (*Carassius auratus*), 3,66 (*Barbus barbus*) und 3,80 (*Cyprinus carpio*).

Abschließend lässt sich somit sagen, dass alle diese Techniken zu ähnlichen und damit realistischen Bestimmungen des DNA-Gehalts führen, auch wird ersichtlich, welchen Anteil das B Chromosom am Gesamt-DNA-Gehalt von *Alburnus alburnus* hat.

#### **4.7. Molekulare Besonderheiten der B Chromosomen**

Aufgrund technischer Schwierigkeiten war es nicht möglich, die sehr großen B Chromosomen von *Alburnus alburnus* durch die Methode der Lasermikromanipulation von den übrigen A Chromosomen zu isolieren, um größere Sequenzabschnitte analysieren zu können. Eine Isolierung der überzähligen Chromosomen über Glasnadelmikrosezierung wurde nicht durchgeführt. Eine alternative Technik wäre auch die durchflußzytometrische Abtrennung der übergroßen B von den A Chromosomen. Dies ist theoretisch möglich, würde eine ausreichend hohe Zahl von Metaphasechromosomen die Zellkammer durchlaufen. Leider gestaltete sich aber die Kultur von *A. alburnus* Zellen, wie auch die meisten Zellkulturen bei Fischen schwierig, und es wurde nur ein geringer Mitoseindex erzielt.

Die AFLP-Analysen erwiesen sich schließlich als sehr hilfreich, um die gewünschte B Chromosomen-spezifische Hybridisierungssonde zu erstellen. Mit dieser Methode können ohne großen technischen Aufwand genetische Marker aus bisher noch nicht charakterisierten Genomen erzeugt werden können (Vos et al., 1995). Auf diese Weise konnte eine B Chromosomen-spezifische Bande mit 203 bp isoliert werden. Es zeigte sich, dass die gefundene Sequenz hochrepetitiv und relativ gleichmäßig über die beiden morphologisch verschiedenen B Chromosomen verteilt ist. Die genaue Abfolge der Basenpaare lässt eine deutliche Homologie zu einem Drosophila-Retrotransposon, nämlich einem Gypsy/Ty3-Element erkennen.

Das Durchsuchen einer Fisch-spezifischen Datenbank (siehe S. 69) zeigt schließlich, dass die Sequenz auch zu Medaka, *Oryzias latipes*, verwandte ist und dem N-terminalen Teil der reversen Transkriptase entspricht. Viele bisher sequenzierte überzählige Chromosomen zeigten, dass sie entweder aus tandemartig wiederholter Satelliten DNA bestehen bzw. retrotransposable Abschnitte besitzen. Ein Kennzeichen von repetitiven Satelliten Sequenzen ist die Assoziation mit Heterochromatin, das späte Replizieren in der S-Phase und auch, dass diese DNA-Sequenzen nicht transkribiert werden.

Die ersten beiden Kennzeichen konnten zytogenetisch, durch die C-Bänderung und die BrdU-Replikationsbänderung den B Chromosomen von *A. alburnus* zugeordnet werden. Satelliten DNA wurde ferner auch auf den B Chromosomen der Pflanze *Crepis capillaris* (Jamilena et al., 1995) und dem Insekt *Drosophila subsilvestries* (Gutknecht et al., 1995) entdeckt, des weiteren umfangreich in den Genomen von Wirbeltieren und Säugetieren untersucht. Es gibt jedoch nur sehr wenig Information über Sequenzen und Genomorganisation von Fisch-Satelliten-DNAs (Haaf et al., 1993). Dass in den Genen welche auf B Chromosomen von *A. alburnus* vorkommen könnten keine offenen Leserahmen vorhanden sind, muss jedoch durch die Sequenzierung wesentlich längerer Bereiche des überzähligen Chromosoms noch bestätigt werden. Überzählige Chromosomen können funktionelle Gene besitzen und in mindestens zwei Pilzarten können derartige Gene eine wichtige Rolle in Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen spielen (Covert, 1998). Einst auf B Chromosomen tatsächlich vorhandene aktive Gene könnten auch durch die bereits erwähnte Transposonintegration „verstummt“ sein. Transposons häufen sich oftmals in Regionen an, welche von Rekombinationsprozessen ausgeschlossen sind (Zeyl & Bell, 1996). Die massive Transposon-Invasion der B Chromosomen von *Alburnus alburnus* zeigt sich in einer gleichmäßigen Verteilung der hochrepetitiven Sequenz über die kompletten überzähligen Chromosomen. Es handelt sich offenbar bei dem B Chromosomen-System von *Alburnus alburnus* um einen äußerst dynamischen Zustand. Retrotransposable Sequenzen sind des weiteren charakteristisch für die B Chromosomen des Roggen (Langdon et al., 2000), des Insektes *Nasonia vitripennis* (Nur et al., 1988), des Fisches *Astyanax scabripinnis* (Mestriner et al., 2000), und auch für die B Chromosomen von *A. alburnus*. Bei *Nasonia vitripennis* wurde, wie bei *A. alburnus*, ein B Chromosom (PSR) gefunden mit einer Gypsy/Ty3-LTR-Retrotransposon-Sequenz (NATE; Nur et al., 1988). Das B Chromosom stammt hier aus einer Kreuzung mit einer nah-verwandten Spezies, *N. longicornis*, (Mc Allister, 1995). Ferner stammt die Mehrzahl repetitiver Sequenzen von Getreidepflanze von LTR-Retrotransposons, was in diesen Spezies zu einer massiven Amplifikation und Genomexpansion führte. Eine der dort entdeckten repetitiven DNA-Familien kodiert für das gag-Protein eines Ty3/Gypsy-LTR-Retrotransposons (Langdon et al., 2000). Dass allerdings B Chromosomen grundsätzlich für jede Art von Transposons anfälliger sind als die A Chromosomen, konnte für das Rex III-Transposon nicht bestätigt werden. Es handelt sich hierbei um ein bei Knochenfischen weit verbreitetes Retrotransposon (Volff et al., 1999).

Die durchgeführte Untersuchung zeigte allerdings nur, dass Rex III auf den A Chromosomen sowohl von *A. alburnus* als auch *R. rutilus* vorkommt, ob es auch auf den B Chromosomen vorhanden ist, ging aus dem Experiment nicht hervor.

Geht man von einem Ursprung des B Chromosoms in einer nah verwandten Art aus (interspezifisch), so sollte das B Chromosom anfänglich dem A Chromosomensatz ungleich sein, jedoch könnte es im Laufe der Zeit zum Austausch mobiler genetischer Elemente mit dem neuen Genom kommen, so dass sich der repetitive DNA-Gehalt der ursprünglichen A und des beherbergten B Chromosoms angleicht.

Andererseits könnte das Gypsy-Element auch mit dem B Chromosom aus der anderen Spezies kommen. Um nun einen interspezifischen B Chromosomen Ursprung zu untersuchen, wurden Metaphasechromosomen des nah verwandten Weißfisches *R. rutilus*, der ein vergleichbar großes überzähliges Chromosom besitzt mit der *A. alburnus* B Chromosomen-Hybridisierungssonde getestet. Aufgrund fehlender Hybridisierungssignale in FISH-Analysen und der Southern blot-Untersuchung kann aber vermutet werden, dass die B Chromosomen beider Spezies unabhängig voneinander evolviert sind. Alternativ könnte die Amplifikation der *A. alburnus*-Sequenz auch erst erfolgt sein, nachdem sich beide Arten getrennt haben und sich dann bei *R. rutilus* eine andere Sequenz vermehrt hat. Beide B Chromosomen könnten nach dieser Hypothese trotzdem homolog sein.

Durch in situ Hybridisierungen mit der B Chromosomen-spezifischen Probe wurde deutlich, dass die gefundene retrotransposable Sequenz über die gesamten B Chromosomen gleichmäßig verteilt ist und wohl den Hauptbestandteil der DNA-Zusammensetzung der *A. alburnus* B Chromosomen darstellt. Um auszuschließen, dass die B Chromosomen-spezifische Sequenz eventuell in geringer Kopienzahl auch auf den A Chromosomen zu finden ist, wurde eine Southern blot-Untersuchung und ein PCR-Test durchgeführt. Dies bestätigte, dass keine Kopie der isolierten B chromosomalen DNA in den Genomen von Tieren ohne B Chromosom gefunden werden kann. Die Insertion von mobilen genetischen Elementen kann für die Erschaffung der strukturellen Variabilität von B Chromosomen verantwortlich sein. Eine duplizierte autosomale Region auf dem B Chromosom könnte durch Transposonintegration schnell ihre Homologie zur Ursprungsregion verlieren, was zur Unterdrückung der Rekombination zwischen beiden Orten beiträgt. Dies ist ein weiterer Grund für das schwierige Vorhersagen des tatsächlichen B Chromosomenursprungs.

Da Tiere von allen vier Fundorten ähnliche Hybridisierungssignale aufweisen, wäre es interessant zu wissen wie alt die identifizierte Sequenz ist, bzw. wann das B Chromosom entstanden ist.

Vielleicht findet man bei europaweiten Studien auch eine Population ohne B Chromosomenträger, was dann Spekulationen über das ungefähre Alter und die Ausbreitung des B Chromosomen-Polymorphismus zuließe. Die molekularen Untersuchungen geben jedoch Hinweise, dass die identifizierte Sequenz relativ konserviert ist, da Fische aus diesen vier Populationen ein ähnliches Hybridisierungsmuster aufweisen. Offenbar evolvierte die retrotransposable Sequenz bevor die Spezies die vier Fundorte als Lebensraum genutzt hat, was höchstwahrscheinlich vor der letzten großen Eiszeit geschah. (Ziegler et al., in Bearbeitung). Der Edersee wurde in den Jahren 1908-14 künstlich angelegt, der Main entstand etwa vor 5 Mio Jahre, die Donau vor 3 Mio und die Elbe ist 25 Mio Jahre alt. Erwähnenswert ist ferner, dass Donau und Main, wegen des Main-Donaukanals, zu einer Faunenregion gehören, der Edersee jedoch nicht. Beachtet muss auch werden, dass *A. alburnus* als häufig eingesetzter Köderfisch auch zu einer Faunenverfälschung beitragen kann.

Aufgrund von Sequenzinformationen über die B chromosomale DNA von *A. alburnus* konnte ein spezifischer minimal-invasiver Flossentest entwickelt werden, mit dem zukünftig Fische verschiedener Populationen auf B Chromosomenträger untersucht werden könnten. Aufgrund dieser harmlosen „Screening-Methode“ müssen die Tiere zur B Chromosomen Frequenzanalyse nicht mehr getötet werden. Ferner muss nicht mehr in bestehende Populationssysteme eingegriffen werden und Studien zu Vererbung der(s) B Chromosoms sind möglich geworden. Auch könnten durch eine quantitative PCR-Analyse Individuen mit zwei B Chromosomen von denen mit einem unterschieden werden. Da Individuen von *A. alburnus* mit zwei überzähligen Chromosomen in anderen Population vielleicht auch sehr selten sind, ist bei zukünftigen Analysen eine schnelle, zeitsparende und minimal-invasive Methode zum Auffinden von B Chromosomenträgern sehr vorteilhaft.

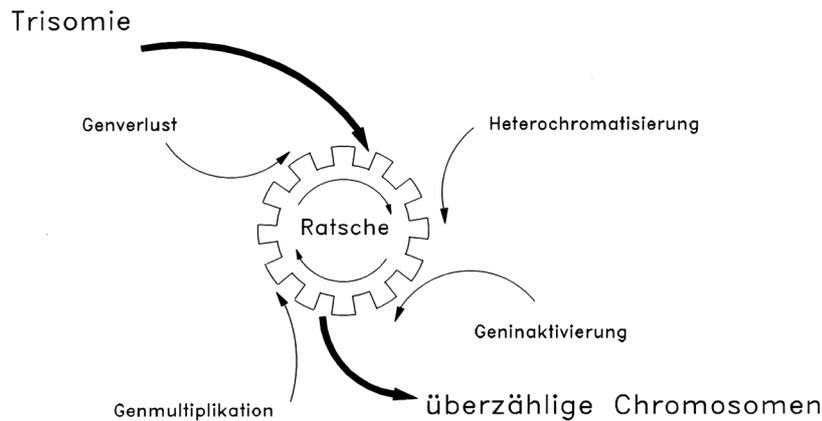
Zusammenfassend lässt sich aus den molekularen Untersuchungen sagen, dass eine Sequenz gefunden wurde, die hochgradig auf den B Chromosomen von *A. alburnus* angereichert ist, jedoch in dessen A Chromosomensatz nicht nachgewiesen werden konnte. Ferner fehlt sie auch dem B Chromosom des nah-verwandten Fisches *R. rutilus*. Dies deutet auf eine spezifische Verbreitung dieses mobilen genetischen Elements in *A. alburnus*, während der Evolution der außerordentlich großen B Chromosomen, hin. Ferner zeigen die molekularen Untersuchungen, aber auch die zytogenetischen Analysen, dass beide B Chromosomen einen gemeinsamen, wenn auch unbekanntem Ursprung haben müssen. Sie weisen wohl eine Endstufe der B Chromosomenevolution/Degeneration auf, gekennzeichnet durch multiple Transposoninsertion und anderer Mutationen (Green, 1990, 1991).

Die beiden verschiedenen Morphologien könnten durch chromosomale Umbauten, wie z.B. Inversionen, Deletionen oder Amplifikation von Abschnitten entstanden sein.

## **4.8. Evolution und möglicher Ursprung der B Chromosomen**

### **4.8.1. Informationen aus anderen Spezies**

Die B Chromosomenevolution zeigt meist eine starke Übereinstimmung mit der Evolution von univalenten Geschlechtschromosomen wie Y und W Chromosomen, die durch multiple Insertions- und Deletionsereignisse sowie der Anhäufung von Mononukleotidrepeats gekennzeichnet ist. Kurz nach ihrer Entstehung müssen überzählige Chromosomen allerdings noch ausreichend Sequenz- und Strukturhomologie zu ihren Vorläuferchromosomen aufgewiesen haben. Sie konnten sich in der Meiose noch aneinander lagern und paaren. Nimmt man einen intraspezifischen Ursprung der B Chromosomen an, so muss es aufgrund gewisser zellulärer Mechanismen zu einer schnellen Heterochromatisierung von Extrachromosomen kommen, welche ihre B Chromosomendifferenzierung einleiten. Die typische heterochromatische Natur der B Chromosomen, die mittels C-Bänderung darstellbar ist, deutet auf die Anwesenheit repetitiver DNA hin. Oftmals kommt es zu einer massiven Amplifikation von DNA-Wiederholmotiven über einen geringen Zeitraum hinweg. Da solche Wiederholsequenzen bei der Geschlechtschromosomen-Evolution niederer Wirbeltiere (Nanda et al., 1990, 1992, 1993) eine entscheidende Rolle spielten, könnten sie eine ähnliche Funktion auch bei der B Chromosomenevolution haben. Gene auf B Chromosomen, unter der Annahme dass sie von transkriptionell-aktiven autosomalen Region stammen, stehen unter kaum einem Selektionsdruck zur Aufrechterhaltung molekularer genetischer Aktivität. Folglich werden auch sie degenerative Veränderungen erfahren, wobei sie aber grundsätzlich auf B Chromosomen noch nachweisbar sein könnten. Die Anreicherung von DNA-Wiederholmotiven und die daraus resultierende meiotische Isolierung durch Konformationsänderungen der DNA-Struktur scheinen ursächlich für die frühe Differenzierung heteromorpher Geschlechtschromosomen zu sein (Nanda et al., 1990, 1993). Dies könnten dieselben Mechanismen sein, durch welche sich neu entstandene B Chromosomen schnell von ihren Vorläuferchromosomen verändern („Muller's Ratchet“; nach Green, 1990). Die Abb. 27 veranschaulicht einen solchen Mechanismus, durch welchen überzählige Chromosomen degenerieren können.



**Abb. 27:** Evolution überzähliger Chromosomen. B Chromosomen, welche über Chromosomentrisomien entstanden sind, werden der Mullerschen Ratsche unterworfen, so dass sich zunehmend Mutationen ansammeln.

Es gibt einige Studien darüber, dass überzählige Chromosomen von X/Y bzw. auch W-Geschlechtschromosomen abstammen können. Hinweise für einen X chromosomalen Ursprung gibt es beispielsweise bei *Orthopteren*. Hier zeigt das B Chromosom auffallende Ähnlichkeit zu dem X Chromosom in Größe, Zentromerposition und heterochromatischem Verhalten (Hewitt, 1973).

Auch Rothfels (1950) argumentiert für eine B Chromosomen Entstehung aus dem X Chromosom bei *Neopodismopsis abdominalis*, und zwar durch eine Deletion des distalen Segments. Für einen Y chromosomalen Ursprung überzähliger Chromosomen gibt es auch Hinweise. Bei der Tse Tse Fliege *Glossina austeni* wurde eine enge Übereinstimmung im C-Bandenmuster zwischen B und Y Chromosomen gefunden (Davies & Southern, 1976). Auch bei Lemmingen, *Dicrostonyx groenlandicus*, konnte ein Y chromosomaler Ursprung der B Chromosomen entdeckt werden (Berend et al., 2001). Beweise für eine Abstammung der zusätzlichen Chromosomen vom W Chromosom geben Sharbel et al. (1998) für den Frosch *Leiopelma hochstetteri*. Geschlechtschromosomen können auch deshalb als Vorläufer von B Chromosomen angesehen werden, da sie im polysomischen Zustand wesentlich leichter tolerierbar sind (Hewitt, 1973).

Der wahrscheinlichste Ursprung zusätzlicher Chromosomen liegt aber wohl in Abkömmlingen der A Chromosomen. So findet man beispielsweise sämtliche repetitive Sequenzen, welche durch Mikrosezierung von den B Chromosomen des Grases *Crepis capillaris* isoliert wurden auch auf den A Chromosomen (Camacho et al., 2000).

Geht man andererseits von einem interspezifischen Entstehungsmechanismus aus, wie bei *Coix aquaticus* (Sapre & Deshpande, 1987) oder *Poecilia formosa* (Schartl et al., 1995), so liegen überzählige Chromosomen schon zu Beginn univalent vor und sind quasi dazu verurteilt ein B Chromosom zu werden. Nun kommen Prozesse zur Geltung, die auf alle ungepaarten Chromosomen gleichermaßen einwirken können, hauptsächlich degenerative Einflüsse, wie Insertionen, Deletionen, Amplifikationen, Proteinassoziation und fehlende Rekombination. Die strukturelle Variabilität von zusätzlichen Chromosomen ist des weiteren durch Transposoninsertionen gekennzeichnet, auch um noch aktive Gene zu inaktivieren. Letztendlich kann es dann zu epigenetischen Veränderungen der B Chromosomen kommen. Haarnadelstrukturen, wie sie beispielsweise von Sharbel et al. (1998) bei überzähligen Chromosomen von *Leiopelma hochstetteri* nachgewiesen wurden, können als Proteinandockstellen dienen. Solche kurze palindromische Sequenzen wirken weiterhin auf Enzyme wie DNase I anziehend. Dies führt dann zu weiterreichenden chromosomalen Umbauten. Auch Methylierungsprozesse spielen bei dem „Silencing“ von B Chromosomen eine Rolle. So sind überzählige Chromosomen meist hypermethylierte und unteracetylierte Einheiten (Houben et al., 1996). Den einzigen bereits bekannten Ursprung von B Chromosomen, welcher für einen Vertreter der Fische gefunden wurde, berichten Neo et al. (2000) für *Astyanax scabripinnis* (Characidae). Aufgrund von Übereinstimmungen in der Heterochromatin-Verteilung des langen Arms von Chromosom 24 und einem der 3 morphologisch unterschiedlichen, komplett heterochromatischen B Chromosomen prognostizierten die Autoren einen möglichen Ursprung für das überzählige Chromosom. Wahrscheinlich stellt das große metazentrische B Chromosom ein Isochromosom dar, welches von Chromosom 24 abstammt.

#### **4.8.2. Spekulationen über die B Chromosomen von *Alburnus alburnus***

Die einzige sichere Schlussfolgerung aus den FISH und Southern blot-Analysen ist, dass das große B Chromosom von *A. alburnus* höchstwahrscheinlich seinen Ursprung nicht in dem fast gleichgroßen, ebenfalls komplett heterochromatischen, überzähligen Chromosom des nahverwandten Weißfisches *Rutilus rutilus* hat. Weitere verwandte Fischarten, die sich mit *A. alburnus* den gleichen Lebensraum teilen, konnten bisher noch nicht auf einen interspezifischen Ursprung getestet werden. Ferner war es auch mit Hilfe der umfangreich durchgeführten AFLP-Untersuchungen nicht möglich, einen intraspezifischen Ursprung des B Chromosoms zu prognostizieren.

Hierfür hätten homologe Sequenzbereiche zu dem(n) A Chromosom(en) gefunden werden müssen. Prinzipiell ist es möglich, dass homologe Sequenzabschnitte zu dem B Chromosom in geringer Kopienzahl auch auf A Chromosomen vorkommen können, was aus der AFLP-Analyse und den Southern blot-Tests nicht sichtbar wurde. Diese Untersuchungen ergaben, dass die 203 bp-Sequenz nur auf den B Chromosomen zu finden ist, hier zudem wohl den Hauptanteil der repetitiven Sequenz ausmacht. Die weitaus spezifischeren PCR-Tests bestätigen die B Chromosomen-Spezifität dieser Sequenz. Von Bedeutung wäre es erst einmal signifikante Banden, welche bei drei weiteren AFLP-Untersuchungen gefunden wurden, molekular zu untersuchen, um einerseits zusätzliche Sequenzinformationen über die B Chromosomen zu bekommen, andererseits vielleicht Spekulationen über den Ursprung/Evolution der *A. alburnus* B Chromosomen anzustellen. Zukünftige AFLP-Analysen, vielleicht auch als Startpunkt für „Chromosomal walking“ sind wichtig, um letztendlich das gesamte B Chromosom mit Markern zu versehen.

Alternativ könnte Laser/Glasnadelmikroresektion zur Isolierung des gesamten B Chromosoms und dessen Sequenz führen, um Fragen über dessen Ursprung zu beantworten. Die genaue ultramolekulare Struktur der repetitiven DNA der überzähligen Chromosomen muss auch noch aufgeklärt werden, vielleicht besitzt sie die Fähigkeit spezielle Formationen auszubilden, wie sie die repetitive DNA der B Chromosomen von *L. hochstetteri* (Sharbel et al., 1998) hat. Dort gefundene stabile „Haarnadelstrukturen“ und die damit verbundene molekulare Dynamik dieser Strukturen könnte eine Erklärung für die schnelle evolutive Veränderung der Nukleotidsequenz und der Struktur von überzähligen Chromosomen, vielleicht auch denen von *A. alburnus*, sein. Eine ähnliche Dynamik wurde ferner auch der terminalen Domäne des Roggen-B Chromosoms zugesprochen (Langdon et al., 2000).

Einige interessante Phänomene der außergewöhnlich großen zusätzlichen Chromosomen in *A. alburnus* bleiben weiterhin unbekannt: welche Funktion, wenn überhaupt, erfüllen die B Chromosomen in *Alburnus alburnus*? Sind sie womöglich von Vorteil für ihre Besitzer, neutral oder besitzen sie eine Art „drive“-Mechanismus? Was ist der ultimative Ursprung und warum beherbergen diese Fische solche großen Mengen, offenbar verzichtbarer DNA? Bei der Pflanze *Allium schoenoprasum* haben beispielsweise B Chromosomenträger einen selektiven Vorteil bei der Keimreife. B Chromosomen erhöhen hier sowohl die Keimungsrate als auch die Fähigkeit unter trockenen Bedingungen aufzukeimen (Holmes & Bougourd, 1989; Plowman & Bougourd, 1994).

Keine phenotypischen oder umweltabhängigen Effekte konnten jedoch bislang mit dem Auftreten der B Chromosomen bei *A. alburnus* in Verbindung gebracht werden. Camacho et al. (1980) unternahmen z.B. bei dem Grashüpfer *Eyprepocnemis plorans* eine vergleichende Analyse vieler morphologischer Kennzeichen und Fitnessparameter, fanden aber keine Unterschiede bei Tieren mit und ohne B Chromosom. *E. plorans* zeichnet sich ferner durch das Vorkommen von 40 verschiedenen B Chromosomenvarianten aus (Cabrero et al., 1997).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1. Zusammenfassung

Im Karpfenfisch *Alburnus alburnus* wurden die bisher größten überzähligen Chromosomen bei Wirbeltieren entdeckt. Dies ermöglichte eine umfangreiche zytogenetische und molekulare Studie dieser außergewöhnlichen Genomelemente. Aus Populationsstudien, die mehrere Fundorte in Deutschland einschlossen, konnten Informationen über die Verteilung der B Chromosomen in Fischen verschiedener Herkunftsorte ermittelt werden. Eine derartige Studie könnte zukünftig auch auf andere Länder ausgedehnt werden.

Eine detaillierte, zytogenetische Analyse mit allen konventionellen Hellfeld- und Fluoreszenzbänderungen sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierungen mit den ribosomalen 5S, 18S/28S rDNA-Proben und der Telomerprobe (TTAGGG)<sub>n</sub>, zeigte, dass die außergewöhnlich großen B Chromosomen von *A. alburnus* heterochromatisch, GC-reich und spät replizierend sind. Es wurden bei *Alburnus alburnus* keinerlei Hinweise auf heteromorphe Geschlechtschromosomen gefunden.

Die molekularen Untersuchungen basierten hauptsächlich auf AFLP-Analysen, mit denen eine B Chromosomen-spezifische Bande entdeckt und isoliert werden konnte. Nach Klonierung und Sequenzierung sowie dem Durchsuchen einer Fischspezifischen Datenbank konnte eine retrotransposable Sequenz (Gypsy/Ty3 LTR-Retrotranspon) gefunden werden. Ferner konnte eine deutliche Homologie zu dem N-terminalen Teil der reversen Transkriptase von Medaka, *Oryzias latipes*, dokumentiert werden. Die Southern blot-Untersuchungen und der PCR-Test zeigten, dass es sich bei der entdeckten 203 bp-Sequenz um eine B Chromosomen- und *Alburnus alburnus*-spezifische Sequenz handelt, welche hochrepetitiv über die beiden Arme der überzähligen Chromosomen verteilt ist.

Der Ursprung und die Funktion der massiven überzähligen Chromosomen blieb offen. Da es aber nach wie vor wenig Information über B Chromosomensequenzen und DNA-Organisation im Allgemeinen und besonders bei Fischen gibt (Mestriner et al., 2000), sind die Ergebnisse dieser Studie für die Aufdeckung des Ursprungs und der Evolution überzähliger Chromosomen von allgemeiner Bedeutung, da sie wohl den Hauptanteil der DNA-Zusammensetzung des größten, bisher unter den Wirbeltieren entdeckten überzähligen Chromosoms darstellen.

Die Analyse meiotischer Chromosomen zeigte, dass das B Chromosom in der Diakinese als selbstpaarendes Ringchromosom vorliegt.

Mittels durchflußzytometrischer DNA-Messungen konnte der Beitrag des außerordentlich großen B Chromosoms zum Gesamt-DNA-Gehalt von *A. alburnus* bestimmt werden und Fische auf das Vorhandensein des überzähligen Chromosoms, allerdings unter Tötung, analysiert werden. Dies kann in Zukunft durch Ausnutzung von Sequenzinformation über das B Chromosom und der damit einhergehenden Konstruktion spezifischer PCR-Primer („minimal-invasiver Flossentest“) vermieden werden. Fische aus unterschiedlichen Populationen, eventuell auch europaweit, können so schnell und zuverlässig auf das Vorhandensein des überzähligen Chromosoms hin untersucht werden, mit dem Zweck, durch künftige Verpaarung der Tiere mit 0, 1 oder 2 B Chromosomen den Vererbungs- bzw. Weitergabemechanismus der überzähligen Chromosomen auf die nächste Generation zu studieren.

## **5.2. Ausblick**

In den letzten Jahren wurden die DNA-Sequenzen von B Chromosomen einiger Organismen umfangreich untersucht. Die ersten Analysen in den 70er und 80er Jahren zeigten, dass B Chromosomen DNA besitzen, welche den A Chromosomen ähnlich ist. Als Beispiel wären Spezies der Gattung *Glossina* (Tsetse) zu nennen (Amos & Dover, 1981). Ein Überblick gibt auch das Standardwerk von Jones & Rees (1982). Jüngere Forschungen der 90er Jahre konzentrierten sich auf die Isolierung, Klonierung und Sequenzierung mehrerer repetitiver DNA-Abschnitte von B Chromosomen einiger Spezies. Einige dieser DNAs stellten sich als B Chromosomen-spezifisch heraus, wie beispielsweise bei der Pflanze *Brachycome dichromosomatica* (John et al., 1991), andere schienen aus Sequenzen zu bestehen, welche auch auf den A Chromosomen zu finden waren. Ein Beispiel wäre das Insekt *Nasonia vitripennis* (Eickbush et al., 1992). Eine weitere Übersicht hiervon gibt Beukeboom (1994).

Molekulare Studien über B Chromosomen offenbarten, dass sie oft nicht auf einen einzigen Ursprungsmodus zurück zu verfolgen waren, stattdessen eine Vielzahl von Entstehungsmechanismen zeigten. Obwohl oftmals die „Ursprungsquelle“ der B Chromosomen mit einiger Sicherheit zurückverfolgt werden konnte (autosomaler Chromosomensatz, Geschlechtschromosomen oder eine nah-verwandte Art), war es doch meist sehr schwierig, die exakten DNA-Regionen auszumachen, aus denen schließlich, meist nach strukturellen Veränderungen, die B Chromosomen evolvierten. B Chromosomen werden aber dennoch als geeignete Systeme für das Studium der Genomevolution angesehen.

Als einzelne Chromosomen, welche von dem auf die A Chromosomen einwirkenden Selektionsdruck befreit sind, könnten sie sich nun als nützlich für das Studium von

Prozessen der molekularen Degeneration, ähnlich denen bei der Entstehung heteromorpher Geschlechtschromosomen, erweisen.

Sie werden deshalb weiterhin für das Verständnis der chromosomalen Evolution, einschließlich der Evolution repetitiver DNAs, „Gensilencing“ und transposablen Elementen von großer Bedeutung sein.

## 6. Summary and perspectives

### 6.1. summary

In the cyprinid fish *Alburnus alburnus* the largest supernumerary chromosomes in vertebrates were found. This enables a detailed cytogenetic and molecular study of these extraordinary genome elements. From Population studies, including different locations in Germany, information about the distribution of the B chromosome polymorphism was gained. Such a study could in the future be extended on other European countries.

A detailed cytogenetic analysis with all conventional bright field and fluorescence bandings as well as in situ hybridisation using the 5S, 18S/28S rDNA-probe and the telomere probe shows that the unusually large B chromosomes of *A. alburnus* are heterochromatic, rich in GC-base pairs and late replicating. No hints to heteromorphic sex chromosomes were found in *A. alburnus*. The molecular studies were predominately based on AFLP-analyses, with which a B chromosome-specific band was found and isolated. After cloning and sequencing as well as screening a fish-specific database a retrotransposable sequence (Gypsy/Ty3 LTR-retrotransposon) was found. Additionally, a strong homology to the N-terminal part of a reverse transcriptase of medaka, *Oryzias latipes*, could be documented. Southern blot analyses and a PCR-test demonstrated that the found 203 bp-sequence is B chromosome- and *Alburnus alburnus*-specific and distributed in a highly repetitive manner on both of the arms of the supernumerary chromosomes.

The origin and function of the massive supernumerary chromosomes remains open. Since there is not much information about B chromosome sequences and DNA organisation in general and especially in fishes (Mestriner et al., 2000), the results of this study are of general interest for the detection of the origin and evolution of supernumerary chromosomes, since the results obviously present the major part of the DNA-composition of the largest supernumerary chromosomes, so far found in vertebrates. Analyses of meiotic chromosomes show that the B chromosome behaves as autopaired ring chromosome in diakinesis. Using DNA-flow measurements, the contribution of the especially large B chromosome to the DNA content of *A. alburnus* could be determined and fishes could be analysed on the presence of the supernumerary chromosome, by sacrificing them. This could in future be circumvented by the use of sequence information about the B chromosome and the possibility of constructing special PCR-primers (minimal-invasive fin-test).

Fishes from different populations, perhaps also from other European countries could be fast and reliable tested for the occurrence of the B chromosome, with the intention to get to know something about the hereditary transmission pathway of the supernumerary chromosome to the next generation. Crossing experiments of animals with 0, 1 and 2 B chromosomes should thus shed light on these questions.

## **6.2. perspectives**

In the last years the DNA-sequences of B chromosomes of a variety of organism have been studied in detail. Early studies in the 70es and 80es show that B chromosomes could possess DNA comparable to that found on the A chromosomes. As an example species of *Glossina* (tsetse) should be mentioned (Amos & Dover, 1981). A further overview is given by Jones & Rees (1982). Recent studies in the 90es concentrated on the isolation, cloning and sequencing of several repetitive DNA parts of B chromosomes of some species. Some of these DNAs were found to be B chromosome-specific, e.g. as those of the plant *Brachycome dichromosomatic* (John et al., 1991), others seemed to be composed of sequences also found on the A chromosomes. As an example the insect *Nasonia vitripennis* (Eickbush et al., 1992) should be mentioned. A further overview about recent studies is also given by Beukeboom (1994).

Molecular studies of B chromosomes have revealed that B chromosomes do not have a single mode of origin, but instead can arise in a variety of ways. Although the source of the B chromosomes can sometimes be traced with a high degree of certainty (e.g. the autosomal chromosome complement, sex chromosomes or a closely related species), it still has been difficult to pinpoint the exact progenitor region(s), out of which, most probably after structural rearrangements, the B chromosomes evolved. B chromosomes are nevertheless being recognized as suitable systems to study genome evolution. As single chromosomes that have freed from that the selection pressures that act on the standard chromosomes, they may prove useful to study processes of molecular degeneration of molecular degeneration analogous to studies of heteromorphic sex chromosomes. They will therefore be important for understanding chromosomal evolution, including evolution of repetitive DNAs, gene silencing and transposable elements.

## 7. Literaturangaben

Amos A., Dover G.: The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): A two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* 81: 673-690 (1981).

Andreato A.A., Almeida-Toledo D.L.F., Oliveira C., Toledo Filho S.D.A.: Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in *Microlepidogaster leucofrenatus*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 63: 215-220 (1993).

Banarescu P.: General distribution and dispersion of freshwater animals. *Zoogeography of Fresh Waters* 1: 48-218 (1990).

Banarescu P., Coad B.W.: Cyprinids of Eurasia: Cyprinid Fishes-Systematics, Biology and Exploitation. *Fish and Fisheries* 3: 127-155 (1991).

Barker J.F.: Variation of chiasmata frequency in and between natural populations of Acrididae. *Heredity* 14: 211-214 (1960).

Beukeboom L.W.: Bewildering Bs: an impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity* 73: 328-336 (1994).

Berend S.A., Hale D.W., Enstrom M.D., Greenbaum I.F.: Cytogenetics of collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). II. Meiotic behaviour of B chromosomes suggests a Y-chromosome origin of supernumerary chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 95: 85-91 (2001).

Born G.G., Bertollo L.A.C.: An XX/XY sex chromosome system in fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. *Chromosome Res.* 82(2): 111-118 (2000).

Buth D.G., Dowling T.E., Gold J.R.: Molecular and cytological investigations. In: Winfield, I.J. and Nelson, J.S., (eds.): *Cyprinid Fishes-Systematic, biology and exploitation*. *Fish and Fisheries* 3: 83-126 (1991).

Brockhouse C., Bass J.A., Faraday R.M., Straus N.A.: Supernumerary chromosome evolution in the *Simulium vernum* group (Diptera: Simuliidae). *Genome* 32: 516-521 (1989).

Cabrero J., Lopez-Leon M.D., Gomez R., Castro A.J., Martin-Alganza A., Camacho J.P.M.: Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Res.* 5: 194-198 (1997).

Cabrero J., Lopez-Leon M.D., Bakkali M., Camacho J.P.M.: Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* 83: 435-439 (1999).

Camacho J.P.M., Carballo A.R., Cabrero J.: The B chromosome system of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* subsp. *Plorans* (Carpentier). *Chromosoma* 80: 163-166 (1980).

Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W.: B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 355: 163-178 (2000).

Camacho J.P.M., Shaw M.W., Lopez-Leon M.D., Pardo M.C., Cabrero J.: Population dynamics of a selfish B chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* 149: 1030-1050 (1997).

Caspersson T., Zech L., Johansson C.: Differential banding of alkylating fluorochroms in human chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 60: 315-319 (1970).

Castro A.J., Perfectti F., Pardo M.C., Cabrero J., Lopez-Leon M.D., Camacho J.P.M.: No harmful effects of a selfish B chromosome on several morphological and physiological traits in *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae). *Heredity* 80: 753-759 (1998).

Cataudella S., Sola L., Muratori R.A., Capanna E.: The chromosomes of 11 species of Cyprinidae and one Cobitidae from Italy, with some remarks on the problem of polyploidy in the Cypriniformes. *Genetica* 47(3): 161-171 (1977).

Covert S.F.: Supernumerary chromosomes in filamentous fungi. *Curr. Genet.* (33): 311-319 (1998).

- Davies E.D.G., Southern D.I.: Giemsa c-banding within the genus *Glossina* (Diptera, Glossinidae). *Genetica* 46: 413-418 (1976).
- Eickbush D.G., Eichbush, T.H., Werren, J.H.: Molecular characterization of repetitive DNA sequences from a B chromosome. *Chromosoma* 101: 575-583 (1992).
- Feinberg A.P., Vogelstein B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13 (1983).
- Fenocchio A.S., Bertollo L.A.: Supernumerary chromosome in a *Rhamdia hilarii* population (Pisces, Pimelodidae). *Genetica* 81: 193-198 (1990).
- Ferro D.A.M., Neo D.M., Moreira-Filho O., Bertollo L.A.C.: Nucleolar organizing regions, 18S and 5S rDNA in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Population distribution and functional diversity. *Genetica* 110: 55-62 (2001).
- Fiedler K.: Lehrbuch der speziellen Zoologie; Band II: Wirbeltiere; Teil 2: Fische. Gustav Fischer Verlag Jena (1991).
- Fontana F., Lanfredi M., Chicca M.A.V., Rossi R.: Localization of the repetitive sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> in four sturgeon species. *Chromosome Res.* 6: 303-306 (1998).
- Foresti F., Almeida-Toledo L.F., Toledo F.S.: Supernumerary chromosome system, C-banding pattern characterization and multiple nucleolus organizer regions in *Moenkausia sanctafilomenae* (Pisces, Characidae). *Genetica* 79: 107-114 (1989).
- Galetti P.M., Foresti F.: Evolution of the ZZ/ZW-system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). The role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell. Genet.* 43: 43-46 (1986).
- Green D.M.: Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: Extraordinary supernumerary chromosome variation and unique sex-chromosome system. *Chromosoma* 97: 55-70 (1988).
- Green D.M.: Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* 33: 818-824 (1990).

Green D.M.: Supernumerary chromosomes in Amphibians. *Amphibian Cytogenetics And Evolution*. Academic Press, Inc. Chapter 14: 333-355 (1991).

Gutknecht J., Sperlich D., Bachmann L.: A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma* 103: 539-544 (1995).

Haaf T., Schmid M.: An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops var. melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* 89: 37-41 (1984).

Haaf T., Schmid M., Steinlein C., Galetti P.M.Jr., Willard H.F.: Organization and molecular cytogenetics of a satellite DNA family from *Hoplias malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). *Chromosome Res.* 1: 77-86 (1993).

Hafez R., Labat R., Quiller R.: Aneuploidie observee chez les populations de gardons (*Rutilus rutilus* L.) et d'ablettes (*Alburnus alburnus* L.) de la region Midi-Pyrenees. *Bull. Soc. Nat. Toulouse* 114: 85-92 (1978).

Hafez R., Labat R., Quiller R.: Reserches sur les chromosomes supernumeraires de l'ablette (*Alburnus alburnus* L.). *Cybium* 5(1): 81-87 (1981).

Hellmer A., Voiculescu I., Schempp W.: Replication banding studies in two cyprinid fishes. *Chromosoma* 100: 524-531 (1991).

Henriques-Gil N., Arana P., Santos J.L.: Spontaneous translocations between B chromosomes and the normal complement in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* 88: 145-148 (1983).

Hewitt G.M.: The integration of supernumerary chromosomes in the *Orthopteran* genome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38: 183-194 (1973).

Hewitt G.M., East T.M.: Effects of B chromosomes on development in grasshopper embryos. *Heredity* 41: 347-356 (1978).

Holmes D.S., Bougourd S.M.: B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum* II. Natural populations. *Heredity* 63: 83-87 (1989).

Hong Y., Zhou T.: Studies on the karyotype and C-banding patterns in *Acheilognathus gracilis* with a discussion on the evolution of acheilognathid fishes. *Acta Genetica Sinica* 12: 143-148 (1985).

Houben A., Kynast R.G., Heim U., Hermann H., Jones R.N., Forster J.W.: Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* 105: 97-103 (1996).

Jamilena M., Garrido-Ramos M., Ruiz R.M., Ruiz R.C., Parker J.S.: Characterisation of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma* 104: 113-120 (1995).

Jankun M., Rab P., Vuorinen J.A.: A karyotype study of vendace, *Coregonus albula* (Pisces, Coregoninae). *Hereditas* 115: 291-294 (1991).

John U.P., Leach C.R., Timmis J.N.: A sequence specific to B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* 34: 739-744 (1991).

Jones R.N.: Are B chromosomes selfish? In: *The Evolution of Genome size* (ed. T. Cavalier-Smith). London: Wiley. ed, pp. 397-425 (1985).

Jones R.N.: B-Chromosome Drive. *The American Naturalist* 137: 430-442 (1991).

Jones R.N., Rees H.: B chromosomes. Academic Press INC (London) LTD (1982).

Kirpichnikov V.S.: Genetic Bases of Fish Selection. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1981).

Klinkhardt M., Tesche M., Greven H.: Database of Fish Chromosomes. Westarp Wissenschaften, Magdeburg (1995).

Koehler M., Neuhaus D., Engel W., Scharl M., Schmid M.: Evidence for an unusual ZW/ZW'/ZZ sex-chromosome system in *Scardinius erythrophthalmus* (Pisces, Cyprinidae), as detected by cytogenetic and H-Y antigen analyses. *Cytogenet. Cell. Genet.* 71: 356-362 (1995).

Lamatsch D.K., Steinlein C., Schmid M., Scharl M.: Non-invasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry* 39: 91-95 (2000).

Langdon T., Seago C., Jones R.N., Ougham H., Thomas H., Forster J.W., Jenkins G.: De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics* 154: 869-884 (2000).

Liu L.Y.: Studies on the chromosome G-banding patterns in the rice field eels (*Monopterus albus*). *Acta Genetica Sinica* 10: 230-234 (1983).

Maistro E.L., Oliveira C., Foresti F.: Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica* 108: 119-125 (2000).

Martinez J.L., Moran P., Garcia-Vazques E., Pendas A.M.: Chromosome localisation of the major and 5S rDNA genes in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Cytogenet. Cell. Genet.* 73: 149-153 (1996).

Martins C., Galetti P.M.Jr.: Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Res.* 7: 363-367 (1999).

Mauro M.L., Micheli G.: DNA reassociation kinetics in diploid and phylogenetically tetraploid cyprinidae. *J. Exp. Zool.* 208: 407-416 (1979).

Mayr B., Rab P., Kalat M.: NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in Cyprinidae of different ploidy level. *Genetica* 69: 111-118 (1986).

McAllister B.F.: Isolation and characterization of a retroelement from B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Molecular Biology* 4(4): 253-262 (1995).

McAllister B.F., Werren J.H.: Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* 106: 243-253 (1997).

Medrano L., Bernardi G., Couturier J., Dutrillaux B., Bernardi G.: Chromosome banding and genome compartmentalization in fish. *Chromosoma* 96: 178-183 (1988).

Melander Y.: Accessory chromosomes in animals, especially in *Polycelis tenius*. Hereditas 36: 19-38 (1950).

Mestriner C.A., Galetti P.M.Jr., Valentini S.R., Ruiz I.R., Abel L.D., Moreira-Filho O., Camacho J.P.M.: Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. Heredity 85 ( Pt 1): 1-9 (2000).

Meyne J., Baker R.J., Hobert H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E., Wurster-Hill D.H., Yates T.L., Moyzis R.K.: Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. Chromosoma 99: 3-10 (1990).

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

Miao V.P., Covert S.F., VanEtten H.D.: A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. Science 254: 1773-1776 (1991).

Morais-Cecilio L., Delgado M., Jones R.N., Viegas W.: Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. Chromosome Res. 8: 341-351 (2000).

Moran P., Martinez E., Varcia-Vazques E., Pendas A.M.: Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Cytogenet. Cell. Genet. 75: 145-150 (1996).

Moyzis R.K.: Das menschliche Telomer. Spektrum der Wissenschaft: 52-61 (1991).

Mützing A., Akdik S.: The effect on cell size of accessory chromosomes in rye. Heredity 34: 248-250 (1948).

Nanda I., Feichtinger W., Schmid M., Schröder J.H., Zischler H., Epplen J.T.: Simple repetitive sequences are associated with differentiation of the sex chromosomes in the guppy fish. J. Mol. Evol. 30: 456-462 (1990).

Nanda I., Scharl M., Epplen J.T., Feichtinger W., Schmid M.: Primitive sex chromosomes in Poeciliid fishes harbour simple repetitive DNA sequences. *J. Exp. Zool.* 265: 301-310 (**1993**).

Nanda I., Scharl M., Epplen J.T., Feichtinger W., Schlupp I., Parzefall J., Schmid M.: Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *Journal of Fish Biology* 47: 619-623 (**1995**).

Nanda I., Scharl M., Feichtinger W., Epplen J.T., Schmid M.: Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* 101: 301-310 (**1992**).

Neo D.M., Filho O.M., Camacho J.P.M.: Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astyanax scabripinnis*. *Heredity* 85 ( Pt 2): 136-141 (**2000**).

Nur U.: A mitotical unstable supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in a grasshopper. *Chromosoma* 14: 407-422 (**1963**).

Nur U.: The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. *Genetics* 54: 1239-1249 (**1966**).

Nur U.: Harmful B chromosomes in a mealy bug: additional evidence. *Chromosoma* 28: 280-297 (**1969**).

Nur U., Werren J.H., Eickbush D.G., Burke W.D., Eickbush T.H.: A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science* 240: 512-514 (**1988**).

Nygren A., Andeasson J., Johnsson L., Jahnke G.: Cytological studies in Cyprinidae (Pisces). *Hereditas* 81: 165-172 (**1975**).

Ohno S.: Sex chromosomes and sex-linked genes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. (**1967**).

Ohno S.: Evolution by gene duplication. Springer Verlag, New York, 160 pp (**1970**).

Ohno S.: Animal cytogenetics, Chordata 1, Protochordata, Cyclostomata and Pisces. Gebrüder Bornträger (eds) Berlin-Stuttgart: 1-63 (**1974**).

Ohno S., Tenius C., Fiasst E., Zenzes M.T.: Post-zygotic chromosomal rearrangements in rainbow trout (*Salmo irideus*, Gibbons). Cytogenetics 4: 117-129 (**1965**).

Oliveira C., Foresti F.: Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curmatidae). Cytobios. 76: 183-186 (**1993**).

Pauls E., Bertollo L.A.: Evidence for a system of supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindacher, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). Carylogia 36: 307-314 (**1983**).

Pendas A.M., Moran P., Freije J.P., Garcia-Vazques E.: Chromosomal mapping and nucleotid sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. Cytogenet. Cell. Genet. 67: 31-36 (**1994**).

Perry P., Wolf S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251: 156-158 (**1974**).

Plowman A.B., Bougourd S.M.: Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. Heredity 72: 587-593 (**1994**).

Portela-Castro A.L.B., Julio H.F.Jr., Nishiyama P.B.: New occurrence of microchromosomes B in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Parana River of Brazil: analysis of the synaptonemal complex. Genetica 110: 277-283 (**2001**).

Post A.: Vergleichende Untersuchungen der Chromosomenzahlen bei Süßwasser-Teleostern. Z. Zool. Syst. Evol. 3: 47-93 (**1965**).

Rab P., Roth P.: Chromosome studies in European leuciscine fishes (Pisces, Cyprinidae). Aneuploidy due to a B-chromosome in *Rutilus rutilus*. Folia. Zool. 38: 333-337 (**1989**).

Rab P., Roth P., Arefjev V.A.: Chromosome studies in European leuciscine fishes (Pisces, Cyprinidae). Karyotype of *Aspius aspius*. Carylogia 43: 249-256 (1991).

Rothfels K.H.: Chromosome complement, Polyploidy and supernumeraries in *Neopodismopsis abdominalis* (Acrididae). J. Morph. 87: 287-315 (1950).

Rudek Z.: Karyological investigations of two formes of *Vimba vimba* (Linnaeus, 1758) occurring in Poland. Folia. Biol. (Krakow ) 22: 211-215 (1974).

Salvador L.B., Moreira-Filho O.: B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). Heredity 69: 50-56 (1992).

Sapre A.B., Deshpande D.S.: Origin of B chromosomes in *Ciox* L. through spontaneous interspecific hybridization. J. Hered. 78: 191-196 (1987).

Schartl M., Nanda I., Schlupp I., Parzefall J.: Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. Nature 373: 68-71 (1995).

Scheel J.J.: Rivuline karyotypes and their evolution (Rivulinae, Cyprinodontidae, Pisces). Z. Zool. Syst. Evol. 10: 180-209 (1972).

Schermelleh L., Thalhammer S., Heckl W., Posl H., Cremer T., Schütze K., Cremer M.: Laser microdissection and laser pressure catapulting for the generation of chromosome-specific paint probes. Biotechniques 27: 362-367 (1999).

Schmid M.: Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma 66: 361-388 (1978a).

Schmid M., Guttenbach M.: Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. Chromosoma 97: 101-114 (1988).

Schmid M., Haaf T., Geile B., Sims S.: Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). Chromosoma 88: 69-82 (1983).

Schmid M., Steinlein C., Feichtinger W., Almeida D.C.G., Duellman W.E.: Chromosome banding in Amphibia XIII. Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 97: 33-42 (1988).

Schmid M., Steinlein C.: Chromosome banding in Amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. *Chromosoma* 101: 123-132 (1991).

Schmid M., Ziegler C.G., Steinlein C., Nanda I., Haaf T.: Chromosome banding in Amphibia XXIV. The B chromosomes of *Gastrotheca espeletia* (Anura, Hylidae). *Cytogenetics and Genome research*: in press (2002).

Schweizer D., Ambros P., Anderle M.: Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. *Exp. Cell. Res.* 111: 327-332 (1978).

Sessions S.K.: Cytogenetics and evolution in salamanders. Ph.D. dissertation. University of California. Berkeley (1984).

Sharbel T.F., Green D.M., Houben A.: B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* 41: 14-22 (1998).

Shcherbakov E.S.: Accessory (B) chromosomes of the black flies (Simuliidae, Diptera) and their adaptive value (on the problem of "genome microevolution"). *Genetika* 4: p.30. (1966).

Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517 (1975).

Sumner A.T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell. Res.* 75: 304-306 (1972).

Toledo Almeida L.F., Viegas-Pequignot E., Foresti F., Toledo Filho S.A., Dutrillaux B.: BrdU replication patterns demonstrating chromosome homologies in two fish species, genus *Eigenmannia*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 48: 117-120 (1988).

Traut W.: Chromosomen; Klassische und molekulare Cytogenetik. Springer-Lehrbuch (1991).

Uyeno T., Smith G.R.: Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science* 175: 644-646 (1972).

Valcarcel A., Brunner P., Maggese M.C.: B chromosome polymorphism in the South American catfish, *Rhamdia sapo*. *Aquaculture* 110: 111-118 (1993).

Vicente V.E., Moreira-Filho O., Camacho J.P.M.: Sex-ratio distortion associated with the presence of a B chromosome in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae). *Cytogenet. Cell. Genet.* 74: 70-75 (1996).

Viktorovsky R.M.: Possible polyploidy in fish evolution. Genetics, selection and hybridization of fishes, Nauka, Moscow: 98-104 (1969).

Vinogradov A.E.: Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the trigular relationship. *Cytometry* 31: 100-109 (1998).

Volff J.-N., Körting C., Sweeney K., Scharl M.: The Non-LTR Retrotransposon Rex3 from the Fish *Xiphophorus* is Widespread Among Teleosts. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1427-1438 (1999).

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23: 4407-4414 (1995).

Vujosevic M., Zizkovic S., Rimsa D., Juresic S., Cacic P.: The chromosomes of 9 fish species from Dunav basin in Yugoslavia. *Acta. Biol. Jug. -Ichthyologia* 15: 29-40 (1983).

White M.J.D.: 3. Auflage London: Cambridge University Press. ed. (1973).

Wiberg U.H.: Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*, L.). *Cytogenet. Cell. Genet.* 36: 589-598 (1983).

Wilson E.B.: The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science, N.Y.* 26: 870-871 (1907).

Wilson W.D., Tansions F.A., Barton H.J., Jones R.L., Fox K., Wydra R.L., Streckowski L.: DNA sequence dependent binding modes of DAPI. *Biochemistry* 29: 8452-8461 (1990).

Yu X., Yu. X.: A Schizothoracine fish species, *Diptychus dipogon* with a very high number of chromosomes. Chromosome Inf. Service. 48: 17-18 (**1990**).

Zakian V.A.: Telomeres: Beginning to understand the end. Science 270: 1601-1606 (**1995**).

Zeyl C.W., Bell G.: Symbiotic DNA in eukaryotic genomes. Trends in Ecol. Evol. 11: 10-14 (**1996**).

## 8. Eingereichte und geplante Veröffentlichungen

1.

### **Cytogenetic characterisation of the B chromosomes of *Gastrotheca espeletia***

<sup>1</sup>M. Schmid, <sup>1</sup>C.G. Ziegler, <sup>1</sup>C. Steinlein, <sup>1</sup>I. Nanda, <sup>2</sup>T. Haaf

<sup>1</sup>*Department of Human Genetics, Biocenter, University of Wuerzburg, Wuerzburg and*

<sup>2</sup>*Department of Human Genetics, University of Mainz, Mainz (Germany).*

2.

### **The giant B chromosome of *Alburnus alburnus* harbours a specific retrotransposon-derived repetitive sequence**

<sup>1</sup>C.G. Ziegler, <sup>2</sup>D.K. Lamatsch, <sup>1</sup>C. Steinlein, <sup>3</sup>W. Engel, <sup>2</sup>M. Schartl, <sup>1</sup>M. Schmid

<sup>1</sup>*Department of Human Genetics, Biocenter, University of Wuerzburg, Wuerzburg,*

<sup>2</sup>*Department of Physiological Chemistry I, Biocenter, University of Wuerzburg, Wuerzburg and* <sup>3</sup>*Department of Human Genetics, University of Göttingen, Göttingen (Germany).*

3.

### **Cytogenetic characterisation of the Chromosome-complement of the fish *Alburnus alburnus* (Cyprinidea) with special emphasis on the B chromosome**

M. Schmid, C.G. Ziegler, C. Steinlein

*Department of Human Genetics, Biocenter, University of Wuerzburg, Wuerzburg (Germany).*

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgesellschaft unterstützt.

## 9. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Michael Schmid für die Möglichkeit unter seiner Leitung über ein interessantes zytogenetisches Projekt eine Dissertation anzufertigen sowie für die Hilfe und Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse;

Herrn Prof. Dr. Manfred Scharl für die Übernahme des Zweitgutachtens, der zur Verfügung Stellung eines Arbeitsplatzes und mehrerer Aquarien sowie der Hilfe bei diversen Fragestellungen;

Herrn Claus Steinlein für seine ständige Hilfsbereitschaft und Freundschaft die weit über die alltägliche Arbeit hinausreichte;

Frau Dr. Dunja K. Lamatsch für die Betreuung der molekularen Experimente, ihrer ebenfalls ständigen Hilfsbereitschaft und der Herstellung einiger wichtiger Kontakte;

Frau PD. Dr. Martina Guttenbach für ihr Engagement, welches maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat, ihrer freundlichen und hilfsbereiten Art und den kulinarischen Köstlichkeiten;

Herrn Dr. Indrajit Nanda für wichtige Tipps, der Vermittlung einer perfekten Arbeitsweise und der amüsanten Fußballabende;

Herrn Dr. Wolfgang Feichtinger für viele praktische Hilfestellungen und der Mitorganisation der Fische;

Frau Gitta Hesse für die schnelle und sorgfältige Bewältigung des umfangreichen Bildmaterials sowie für ihre freundliche, aufmunternde Art;

Frau Dr. Sabine Herterich für wichtige experimentelle Hilfestellungen bei molekularen Versuchen;

Frau Noemi Knötgen, Denise Grillmayer, Andrea Bowe, Sigrig Koehler, Stafanie Maisch und v.a. für das freundliche, lockere und sehr angenehme Laborklima;

Herrn Georg Schneider und Herrn Hugo Schwind für ihr „know how“, das zum Überleben der Fische unentbehrlich war;

Herrn Dr. Jean-Nicolas Volff, Frau Ute Hornung, Frau Cornelia Körting und einigen weiteren „Scharl’s“ danke ich für wichtige Hilfestellungen und Informationen;

Meiner Mutter, meinem Bruder und vielen Freunden, besonders Herrn Reino Petricevic für die Unterstützung und das Vertrauen in das Gelingen der Arbeit;

In Gedenken an Anna Leber, die mich zum Biologiestudium ermunterte und immer sehr interessiert war.

## 10. Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name	Christian Georg Ziegler
Geburtsdatum	17. August 1972
Geburtsort	Weil am Rhein
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Schulbildung**

1979-1983	Grundschule Hassfurt
1983-1992	Regiomontanus-Gymnasium Hassfurt
Mai 1992	Abitur

### **Hochschulausbildung**

1992 bis 1998	Studium der Biologie an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Juli 1998	Diplom Diplomarbeit am Institut für Humangenetik unter der Leitung von Prof. Dr. M. Schmid. <u>Thema:</u> „Zytogenetische Untersuchungen der B Chromosomen von <i>Gastrotheca espeletia</i> (Anura, Hylidae)“.
seit Januar 1999	Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Schmid. <u>Titel:</u> „Die B Chromosomen der Ukelei ( <i>Alburnus alburnus</i> ). Zytogenetische und molekulare Analysen“.

## 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 04.09.2002

Christian Ziegler