

Biologische Objekte im Transmissions-Elektronenmikroskop (Teil 4): Spreitungstechniken

Biological specimens in transmission electron microscopy (part 4): Spreading techniques

Abstract: Visualizing nucleic acids (DNA, RNA), nucleoprotein complexes and chromatin requires the use of special electron microscopic spreading techniques. In part 4 (27 refs.), methods are outlined for spreading DNA and RNA molecules for electron microscopic observation, these methods using modifications of the basic protein film method developed by A. Kleinschmidt and R. K. Zahn (1959). Hybridization techniques that allow the observation of heteroduplexes formed between two DNA molecules or between DNA and RNA molecules are reviewed, with special emphasis being placed on the DNA-RNA hybrids as a tool for elucidating RNA splicing. Techniques for studying DNA-protein interactions without the use of a protein monolayer film are mentioned. Finally, the "Miller spreading technique" for visualizing the nucleosomal organization of eukaryotic chromatin as well as the transcription of genes is described and illustrated.

Einleitung

Die elektronenmikroskopische Darstellung isolierter Nucleinsäuren (DNA, RNA) und Nucleoprotein-Komplexe einschließlich Chromatin erfordert den Einsatz von Spreitungstechniken, die es erlauben, diese Moleküle aus einer Lösung in eine zweidimensionale Anordnung zu überführen (zu „spreiten“), damit sie strukturellen Analysen zugänglich sind. Solche Spreitungstechniken werden heute in der Zell- und Molekularbiologie in stetig zunehmendem Umfang eingesetzt, da sie grundlegende Informationen über die strukturelle und funktionelle Organisation des genetischen Materials liefern können. So wurde beispielsweise mit ihrer Hilfe das Prinzip des „RNA splicing“ entdeckt (S. M. Berget u. Mitarb., 1977; L. T. Chow u. Mitarb., 1977), was zu einem völlig neuen Konzept der Genorganisation der Eukaryonten führte. Der universelle Aufbau des Eukaryonten-Chromatins in Form von linear angeordneten Elementarbausteinen, den Nucleosomen oder *v*-bodies, wurde erstmalig an elektronenmikroskopischen Spreitungen beschrieben (A. L. Olins und D. E. Olins, 1974), und der Vorgang der Transkription von Genen konnte eindrucksvoll dokumentiert werden (O. L. Miller und B. R. Beatty, 1969).

Im folgenden Beitrag werden zunächst die wichtigsten Techniken zur elektronenmikroskopischen Darstellung von isolierten DNA- und RNA-Molekülen beschrieben. Mit Hilfe solcher relativ einfacher Methoden lassen sich – unter Verwendung von lediglich Nanogramm-Mengen – Aussagen über die Form der Nucleinsäuremoleküle (linear, zirkulär entspannt oder verdrillt [„supercoiled“]), die Konturlänge und damit über das Molekulargewicht, Einzel- oder Doppelsträngigkeit, Sekundärstrukturen von Einzelstrang-Molekülen usw. machen. Daran schließt sich eine kurze Übersicht über Hybridisierungsmetho-

den an, welche es erlauben, Sequenzhomologien zwischen zwei DNA-Molekülen oder zwischen DNA- und RNA-Molekülen (Heteroduplex-Analyse) zu bestimmen, um so die Position und Anordnung definierter Gensequenzen zu analysieren. Ebenfalls nur kurz erwähnt werden verschiedene Methoden, um die Interaktion zwischen DNA-Molekülen und Proteinen, beispielsweise RNA-Polymerasen, sichtbar zu machen. Anschließend werden Spreitungstechniken zur Darstellung von Zellkern-Chromatin sowie von transkriptionell aktiven Genen ausführlich erläutert. Solche Methoden erlauben nicht nur, die Transkription von Genen sichtbar zu machen, ihre relative Anordnung zueinander zu bestimmen und die Länge ihrer Transkriptionseinheiten zu messen, sondern ermöglichen auch einen strukturellen Vergleich zwischen genetisch aktivem und inaktivem Chromatin.

Doppelsträngige DNA

Die inzwischen klassische Spreitungsmethode für doppelsträngige DNA wurde von A. Kleinschmidt und R. K. Zahn entwickelt (1959). Das Prinzip dieser „Proteinfilmtechnik“ besteht darin, DNA-Moleküle in einen monomolekularen Proteinfilm einzubetten, um so ihre Aggregation zu verhindern und sie in einer zweidimensionalen Anordnung zu stabilisieren. In der ursprünglichen Vorschrift wird eine Mischung aus DNA, Cytochrom c und Puffer über eine Glasrampe auf die Oberfläche einer „Hypophase“-Lösung aufgetragen. Während des Ausspreitens an der Luft-Wasser-Interphase bildet das Cytochrom c einen monomolekularen Film aus denaturierten Polypeptiden, an den DNA-Moleküle binden. Anschließend wird mit einem befilmten EM-Netz die Oberfläche der Hypophase leicht berührt, um einen Teil der Proteinschicht zusammen mit den immobilisierten DNA-Molekülen an die

Trägerfolie zu adsorbieren. Daran schließen sich Entwässerung und Kontrastierung an.

Besonders einfach ist die von D. Lang und M. Mitani (1970) eingeführte *Tröpfchen-Diffusionsmethode*, die zudem den Vorteil hat, nur geringe Mengen an DNA (10^{-10} – 10^{-11} g) zu benötigen. Vorausgesetzt, daß einige wenige Stammlösungen vorbereitet sind, kann man innerhalb von 30 Minuten eine DNA-Probe für das Elektronenmikroskop vorbereiten (Abb. 1). Ein Tröpfchen (10–100 μ l) einer Pufferlösung mit Cytochrom c und DNA wird auf eine hydrophobe Oberfläche (silikonisierter Objektträger, Teflon® oder Parafilm) plaziert. Nach etwa 15 Minuten wird die Tropfenoberfläche mit einem befilmten EM-Netz berührt, das Präparat wird kontrastiert, entwässert und mit Metall schrägbedampft. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß von einem Tropfen mehrere Präparate erhalten werden können. Auf der Tropfenoberfläche bildet sich ein Film aus denaturiertem Cytochrom c, an den DNA-Moleküle binden, sobald sie an die Oberfläche diffundieren. Nach Entnahme eines Teils des Protein-DNA-Films schließt sich der Proteinfilm wieder durch Nachdiffusion von Cytochrom c-Molekülen, die im Überschuß in dem Tropfen vorliegen.

Arbeitsvorschrift: Doppelsträngige DNA

Stammlösungen:

1. 5 M Ammoniumacetat (wäßrig). Im Kühlschrank über Monate haltbar.
2. 1 % wäßriges Cytochrom c (portionsweise einfrieren).
3. 50 mM Uranylacetat in 50 mM HCl; im Dunkeln aufbewahren, am besten im Kühlschrank.
4. TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,2).

Alle Lösungen nach dem Ansetzen durch Millipore®-Filter (0,22 μ m) filtrieren. Die Filter müssen vor Gebrauch mit etwa 10 ml Aqua dest. (60 °C) gut gewaschen werden, um Detergenz-Reste zu entfernen.

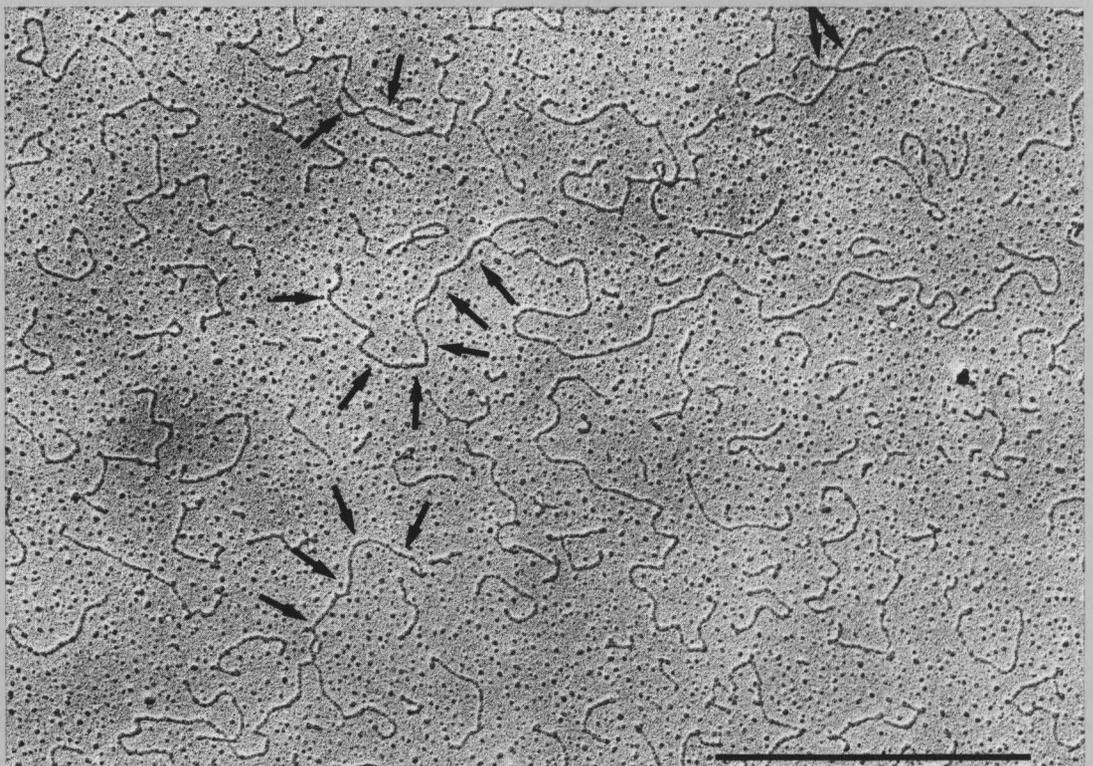
Zu 200 μ l 0,2 M Ammoniumacetat (der pH sollte zwischen 6,8 und 7,2 liegen) 2 μ l 0,1 % Cytochrom c und 5–10 μ l DNA-Lösung in TE (ca. 10 μ g/ml) zugeben (in Eppendorf-Reaktionsge-



Abbildung 1: Ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle. Präparation wie im Abschnitt "Doppelsträngige DNA" beschrieben. Jeder Molekülring stellt einen rekombinanten Plasmiden dar, bestehend aus dem Vektor pMB9 und einer eukaryontischen Gensequenz (ribosomale DNA von Hefe). Einige Ringe sind verdreht ("supercoiled"; s. Pfeile). Maßstab 1 μm .

Abbildung 2: RNA aus isolierten Kernen von Molch-Oozyten (*Triturus cristatus*).

Präparation wie im Abschnitt "Einzelsträngige DNA und RNA" beschrieben. Die Spreitungslösung enthielt 90 % Formamid/4 M Harnstoff und wurde nicht erhitzt. Unter diesen Bedingungen bleiben einige größere (und damit relativ stabile) Doppelstrangbereiche erhalten (Pfeile). In diesen Abschnitten enthalten die RNA-Moleküle komplementäre Sequenzen, die intramolekulare Basenpaare ausbilden. Maßstab 1 μm .



fäß). Tropfen (ca. 50–100 µl) auf Parafilm plazieren und nach etwa 10 min mit Parlodion®-beschichtetem EM-Netz (s. weiter unten) abtupfen. Netz sofort in frisch angesetzte Kontrastierungs-lösung eintauchen (10 ml 90 % Ethanol plus 10 µl Uranylacetat-Stammlösung 3; am besten kleine Plastik-Petrischalen benutzen), nach 10 sec in 90 % Ethanol tauchen, an der Luft trocknen. Anschließend Kegelbedampfung mit Metall (z. B. mit Platin-Palladium-Legierung 80:20) unter einem Winkel von ca. 7°. Abschließend dünnen Kohlefilm zur mechanischen Stabilisierung der Trägerfolie aufdampfen.

Als Faustformel gilt, daß eine DNA-Konturlänge von einem Mikrometer einem Molekulargewicht von etwa 2 Millionen bzw. 3000 Nukleotidpaaren entspricht. Genauere Angaben finden sich in einer Arbeit von *D. Stüber* und *H. Bujard* (1977). Falls exakte Molekulargewichtsbestimmungen der DNA erforderlich sind, empfiehlt sich die Zugabe eines internen DNA-Längenstandards zur Spreitungslösung.

Einzelsträngige DNA und RNA

Unter den oben beschriebenen Bedingungen kollabieren einzelsträngige Nukleinsäuren, so daß sie kaum oder überhaupt nicht in dem Cytochrom c-Hintergrund erkennbar sind. Wird dagegen Formamid der Spreitungslösung zugegeben, entfalten sich Nukleinsäure-Moleküle in Abhängigkeit von der Formamid-Konzentration, da dadurch die Stabilität von intra- und intermolekularen Basenpaarungen, die sich spontan in wässriger Lösung ausbilden, zunehmend vermindert wird. Je nach Formamid-Konzentration und vorausgegangener Erwärmung der Nukleinsäure-Lösung können so die Moleküle völlig denaturiert, d. h. weitgehend gestreckt werden, oder behalten noch einige besonders stabile Sekundärstrukturen (Abb. 2; die Stabilität von Sekundärstrukturen ist um so höher, je höher die Anzahl der daran beteiligten Basenpaare und der G+C-Gehalt ist). Solche relativ stabilen und oft auffälligen Sekundärstrukturen (z. B. „Haarnadelstrukturen“) können als Referenzpunkte benutzt werden, um RNA-Moleküle zu identifizieren und zu orientieren. Eine Analyse der Sekundärstruktur wurde vor allem an ribosomalen RNA-Molekülen und ihren Präkursoren durchgeführt und erlaubte die genaue Lokalisierung der 18S und 28S ribosomalen

RNAs innerhalb ihrer gemeinsamen Präkursor-Moleküle. Diese Untersuchungen führten zu einer präzisen Beschreibung der topologischen Abfolge der „Processing“-Schritte von dem primären Transkriptionsprodukt der ribosomalen RNA-Gene bis hin zu den reifen ribosomalen RNA-Molekülen (z. B. *P. K. Wellauer* und *I. B. Dawid*, 1973).

Arbeitsvorschrift: Einzelsträngige DNA (modifiziert nach *D. Robberson* u. Mitarb., 1971)

Stammlösungen:

5. 4 M Harnstoff in Formamid; im Kühlschrank aufbewahren. Das Formamid sollte von höchster Reinheit sein oder mehrmals rekristallisiert sein (Abkühlen bis unter den Kristallisationspunkt, Restflüssigkeit abgießen etc.), oder mit Hilfe eines Ionenaustauschers deionisiert sein (z. B. 2 g Amberlite® MB-1 auf 60 ml Formamid, 2 h rühren, dann filtrieren).
6. 4 M Tris-HCl (pH 8,5), 0,1 M Na₂-EDTA. Zum Lösen erhitzen. Portionsweise bei -20 °C einfrieren. Vor Gebrauch eventuell erwärmen, da Lösung leicht auskristallisiert.
7. 5 mg Cytochrom c in 1 ml Aqua dest.

Alle Lösungen nach dem Ansetzen durch Millipore®-Filter filtrieren (s. Arbeitsvorschrift doppelsträngige DNA).

Etwa 5 µg Nukleinsäuren in 100 µl TE-Puffer (Stammlösung Nr. 4) lösen und 5 µl dieser Lösung mit 100 µl Formamid/Harnstoff (Stammlösung Nr. 5) mischen. Bei Bedarf 1 Minute auf 60 °C erhitzen, dann abkühlen. Dann Zugabe von 2 µl einer frisch hergestellten Lösung, bestehend aus gleichen Teilen 4 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA (Stammlösung Nr. 6) und Cytochrom c (Stammlösung Nr. 7). Teflontrog mit Aqua dest. gründlich auswaschen, wieder auffüllen, Oberfläche mit einem Teflonstab abwischen, säuregereinigten Objektträger als Rampe einsetzen (Abb. 3). Dann 50 µl der Spreitungslösung mit einer Eppendorf-Pipette auf die ganze Breite der Rampe etwa 3–5 mm oberhalb des Wasserspiegels auftragen. (Um den sich bildenden Oberflächenfilm sichtbar zu machen, kann man vor dem Auftragen etwas Graphitpulver auf die Wasseroberfläche stäuben. Das Graphit wird durch den Proteinfilm verdrängt.) Sofort in der Nähe der Rampe mit einem Parlodion-beschichteten Netz (s. weiter unten) den Proteinfilm abtupfen (der Tropfen muß das Netz gleichmäßig bedecken!), weitere Behandlung siehe Arbeitsvorschrift doppelsträngige DNA.

Um Sekundärstrukturen darzustellen, darf die Spreitungslösung nicht erhitzt werden; außerdem sollte auch die Formamid-Konzentration herabgesetzt werden (etwa 70 % Formamid/4 M-Harnstoff im Fall von RNA). Wird einzelsträngige DNA gespreitet, genügt meistens eine Formamid-Konzentration von 50 %. Weitere Einzelheiten zu DNA- und RNA-Spreitungsmethoden finden sich in folgenden Übersichtsartikeln: *A. K. Kleinschmidt*, 1968; *J. Ferguson* und *R. W. Davis*, 1978; *D. P. Evenson*, 1977; *C. L. Moore*, 1981.

Arbeitsvorschrift: Herstellen des Parlodion®-Trägerfilms

Den dafür benötigten Aufbau zeigt Abb. 4. In einem mit Wasser gefüllten Trog werden 300 mesh-Kupfernetze auf ein Gitter (aus Plastik oder nicht-rostendem Draht) gelegt. Bei einer Kanten-

länge des Trogs von 8 cm werden etwa 3 Tropfen einer 1%-Parlodion®-(=Collodion-)Lösung in Amylacetat (z. B. Ladd Research Ind., Burlington, Vermont, USA; zu beziehen über G. Karl OHG, Geisenheim) auf die Oberfläche pipettiert. Wenn der Film ausgehärtet ist, wird er mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen: die Wasseroberfläche ist jetzt sauber. Die Prozedur wird dann wiederholt mit dem Unterschied, daß nun das Wasser abgelassen wird, so daß sich der Film über die Netze legt. Nach Lufttrocknung sind die Netze gebrauchsfertig; sie sollten innerhalb von 36 h benutzt werden.

DNA/DNA- und DNA/RNA-Hybride

Auf Details kann hier nicht eingegangen werden, da die spezifischen Hybridisierungsbedingungen von den zu untersuchenden Nukleinsäuren abhängen (ausführliche Anleitungen finden sich bei *R. W. Davis* u. Mitarb., 1971; *C. Brack*, 1981; *L. T. Chow* und *T. R. Broker*, 1981).

Mit der *DNA-Heteroduplex-Methode* lassen sich zwei Klassen verwandter, aber etwas unterschiedlicher DNA-Moleküle daraufhin untersuchen, wie die homologen bzw. nicht-homologen Sequenzen verteilt sind. Die DNA-Proben werden völlig denaturiert (in Einzelstränge zerlegt), gemischt und wieder langsam renaturiert. Dabei bilden sich Heteroduplex-Moleküle (neben Homoduplex-Molekülen und nicht renaturierten Einzelsträngen), die, wenn die eine DNA-Klasse z. B. Deletionen oder Insertionen besitzt, Einzelstrang-Schleifen aufweisen. Voraussetzung für die Darstellung solcher einzelsträngiger Schleifen ist die Anwesenheit von Formamid in der Spreitungslösung.

Mit der Methode der *DNA/RNA-Hybridisierung* läßt sich feststellen, ob eine messenger-(m)-RNA kolinear mit dem komplementären DNA-Strang ist oder von räumlich getrennten DNA-Segmenten abgeleitet ist, die durch dazwischengeschaltete „intervening sequences“ getrennt sind. Mit anderen Worten, diese Spreitungsmethode erlaubt nicht nur den eindeutigen Nachweis des RNA-„spleining“, sondern auch die Bestimmung der Größe und Anordnung der „intervening sequences“ (Abb. 5). Man geht so vor, daß zunächst die DNA (häufig eine bestimmte klonierte Gensequenz) denaturiert wird und die Renaturierung in Anwesenheit der

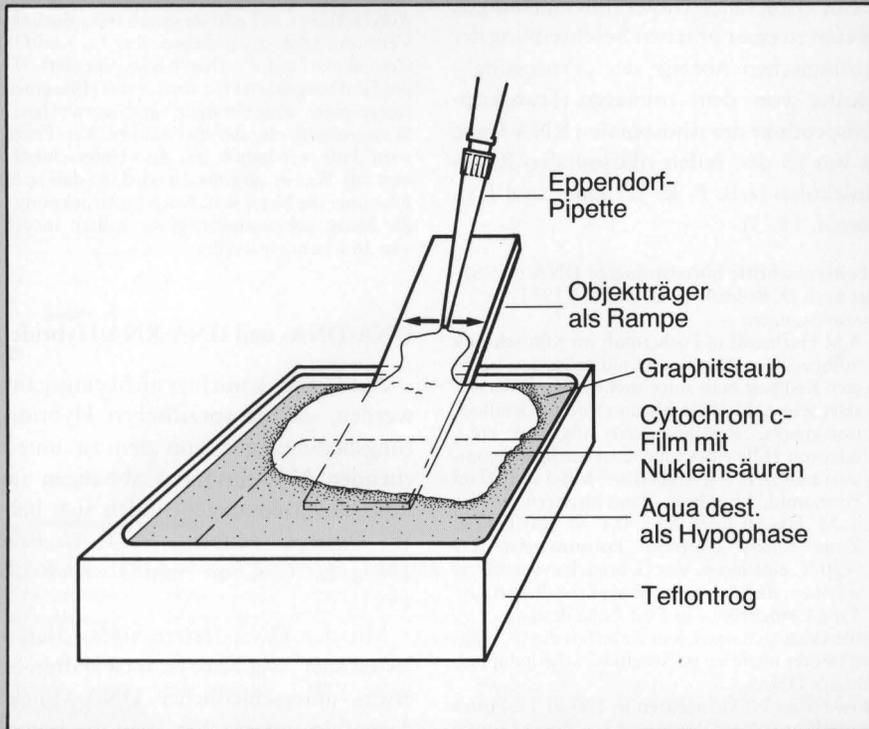


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs für die Spreitung von einzelsträngigen Nucleinsäuren (DNA und RNA). Die Spreitung erfolgt auf der Wasseroberfläche in einem Teflontrog (Kantenlänge etwa 8 cm). Die Spreitungslösung wird mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette etwa 3-5 mm oberhalb des Wasserspiegels über die ganze Breite eines Objektträgers, der als Rampe dient, aufgetragen. Die Ausbreitung des Cytochrom c-Films läßt sich besonders gut durch die Verdrängung einer vorher aufgebracht dnnen Graphitschicht beobachten.

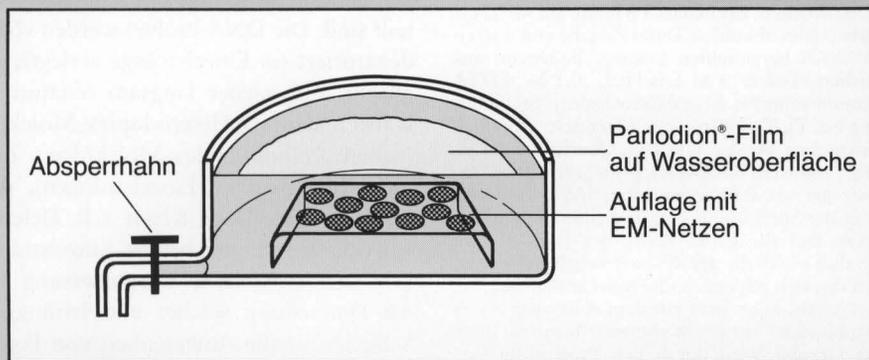


Abbildung 4: Aufbringen eines Parlodion®-Films auf Trägernetze.

In einem wassergefüllten Trog (Durchmesser etwa 8 cm) mit Auslaufhahn befindet sich eine Auflage (Perlonnetz oder Gitter aus nichtrostendem Draht), auf die die Netze gelegt werden. Auf die Wasseroberfläche werden etwa 3 bis 5 Tropfen einer 1% Parlodion®-Lösung (Cellulosenitrat) in Amylacetat aufgebracht. Der sich nach wenigen Minuten durch Verdunsten des Lösungsmittels ausbildende Film wird durch Ablassen des Wassers auf die Netze abgesenkt.

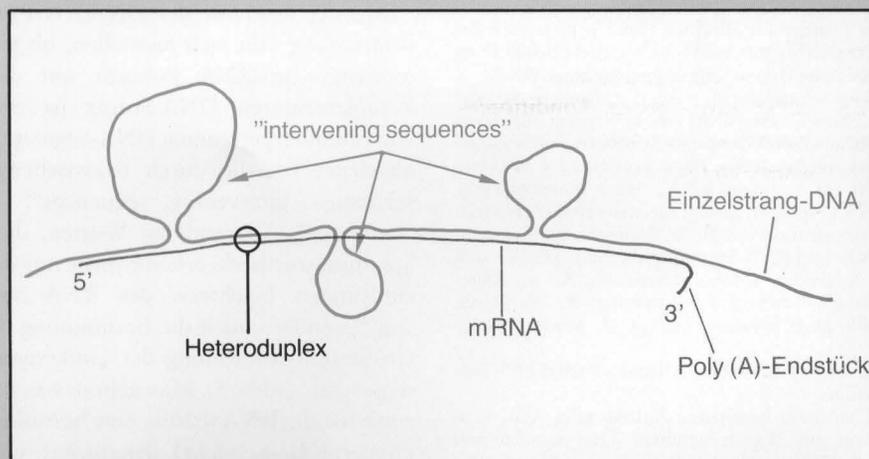


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines DNA/RNA-Hybrids, der das "splicing" der mRNA dokumentiert.

Die DNA hybridisiert nicht vollständig mit der mRNA. Drei einzelsträngige DNA-Schleifen enthalten keine komplementären mRNA-Sequenzen. Unter dem Begriff "splicing" versteht man den Vorgang, daß ein Gen zunächst ein primäres RNA-Transkript produziert, das alle Gensequenzen enthält. Anschließend werden die nicht-kodierenden Sequenzen ("intervening sequences" oder "introns") herausgeschnitten und die kodierenden Abschnitte kovalent verknüpft. Die DNA-Einzelstrangschleifen stellen also nicht-kodierende "intervening sequences" dar. Die mRNA hat am 3'-Ende ein poly(A)-Segment, das posttranskriptionell angefügt wird und daher nicht mit der DNA hybridisiert.

mRNA-Probe unter Bedingungen durchgeführt wird, die zwar die Ausbildung von DNA/RNA-Hybriden erlauben, aber nicht die von DNA/DNA-Duplex-Strukturen. Diese Bedingungen sind gegeben, wenn die Renaturierungslösung 70–80 % Formamid enthält und die Renaturierungstemperatur etwa dem Schmelzpunkt der DNA entspricht (dabei ist zu beachten, daß der T_m von DNA etwa um $0,72\text{ }^\circ\text{C pro } 1\%$ Formamid erniedrigt wird). Die Spreitung erfolgt über eine Rampe wie oben für einzelsträngige Nukleinsäuren beschrieben.

DNA-Protein-Komplexe

Bei allen Spreitungen in Anwesenheit von Cytochrom c werden die Nukleinsäuremoleküle völlig von einer Proteinschicht umhüllt, was zu ihrer beträchtlichen Dickenzunahme führt (auf etwa 15–20 nm). Das verhindert die Beobachtung der Interaktion von einzelnen Proteinmolekülen mit DNA. Für solche Untersuchungen wurden Methoden entwickelt, welche diese Strukturvergrößerung weitgehend vermeiden. Das quaternäre Ammoniumsalz Benzylmethyl-alkylammoniumchlorid (BAC, M ca. 350 g/mol) kann, wie *H. J. Vollenweider* u. Mitarb. (1975) gezeigt haben, ebenfalls wie Cytochrom c einen monomolekularen Film bilden, an den Nukleinsäuren binden. Doppelsträngige DNA hat dann nach Metallbedampfung einen scheinbaren Durchmesser von nur 6 nm.

Andere Methoden verzichten ganz auf einen monomolekularen Film und absorbieren die Nukleinsäuren direkt an den Trägerfilm der EM-Netze. Das läßt sich beispielsweise erreichen, wenn man eine Kohle-Trägerfolie durch kurzfristiges Einbringen in eine Glimmentladung hydrophilisiert und anschließend in eine Poly-Lysin-Lösung taucht und trocknet (*R. C. Williams*, 1977). Wird ein Tropfen einer Nukleinsäure-Lösung auf ein solcherart vorbehandeltes Netz gegeben, dann werden einige Moleküle an der Kohleoberfläche immobilisiert und können nach Kontrastierung und/oder Metallbedampfung als „nackte“ Nukleinsäuren dargestellt werden. Solche proteinfreien Spreitungs-

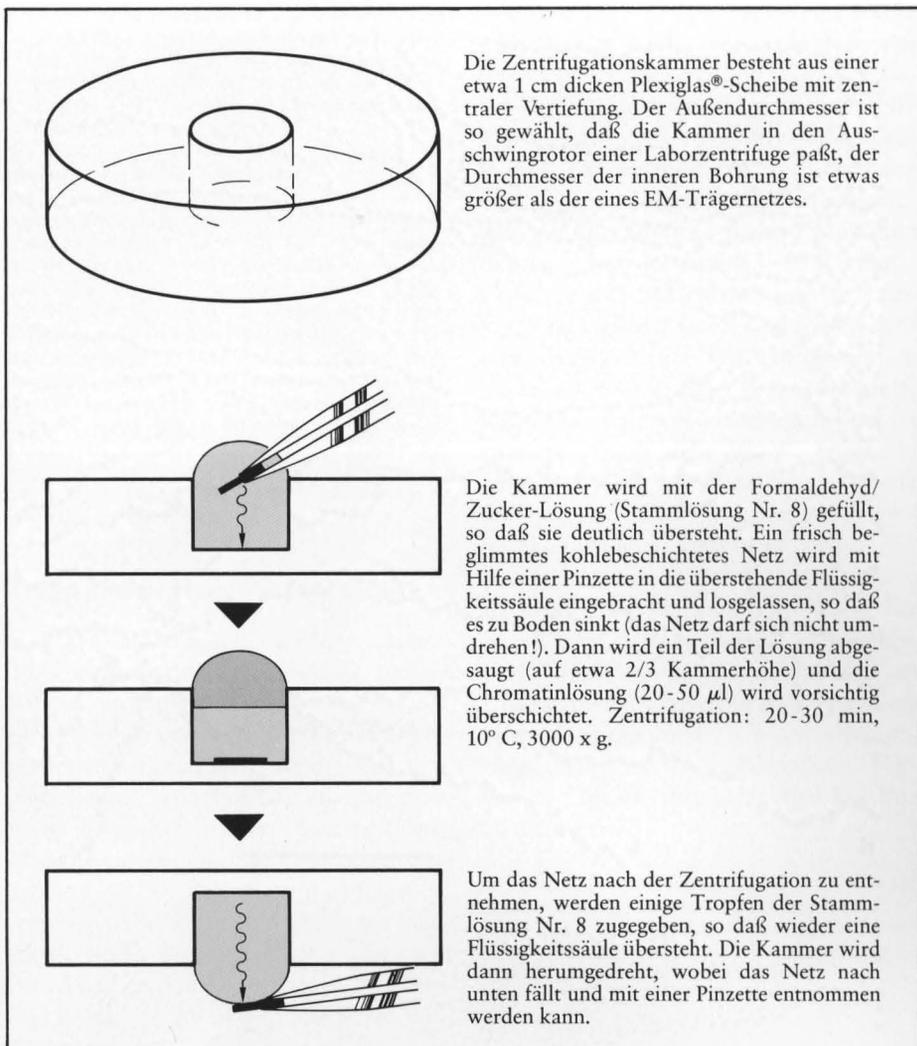


Abbildung 6: Arbeitsablauf für Chromatinspreitungen.

techniken wurden z.B. benutzt, um die Promoter-Sequenzen für RNA-Polymerasen in zahlreichen Phagen-DNAs zu lokalisieren und die Interaktion von Repressoren und Restriktionsenzymen mit DNA zu studieren (weitere Beispiele s. *H. W. Fisher* und *R. C. Williams*, 1979).

Chromatin aus Zellkernen

Mit der von *O. L. Miller* u. Mitarb. (1969) eingeführten Chromatin-Spreitungstechnik steht eine Methode zur Verfügung, sowohl die Feinstruktur von Chromatinfibrillen zu analysieren als auch die Transkription von Genen sichtbar zu machen. Das Prinzip dieser „Miller-Spreitung“ ist einfach: Chromatin, das unter physiologischen Ionenbedingungen weit-

gehend unlöslich ist und sehr dicht gepackt vorliegt, schwillt in einer hypotonen Lösung stark an – vergleichbar etwa dem Auseinanderzupfen eines Wollknäuels. Das dispergierte Chromatin wird dann auf die hydrophilisierte Oberfläche eines kohlebeschichteten EM-Netzes zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen bleiben die naszierenden Genprodukte, Ribonukleoprotein-(RNP-)Moleküle, mit dem Chromatin verbunden, so daß transkriptionell aktive Chromatinabschnitte eindeutig identifiziert werden können.

Arbeitsvorschrift: Chromatin aus Zellkernen (modifiziert nach *O. L. Miller* und *B. A. Hamkalo*, 1972)

Stammlösungen:

8. 1 % Formaldehyd, 0,1 M Saccharose, 0,5 mM Boratpuffer, pH ca. 8,5. Zum Ansetzen

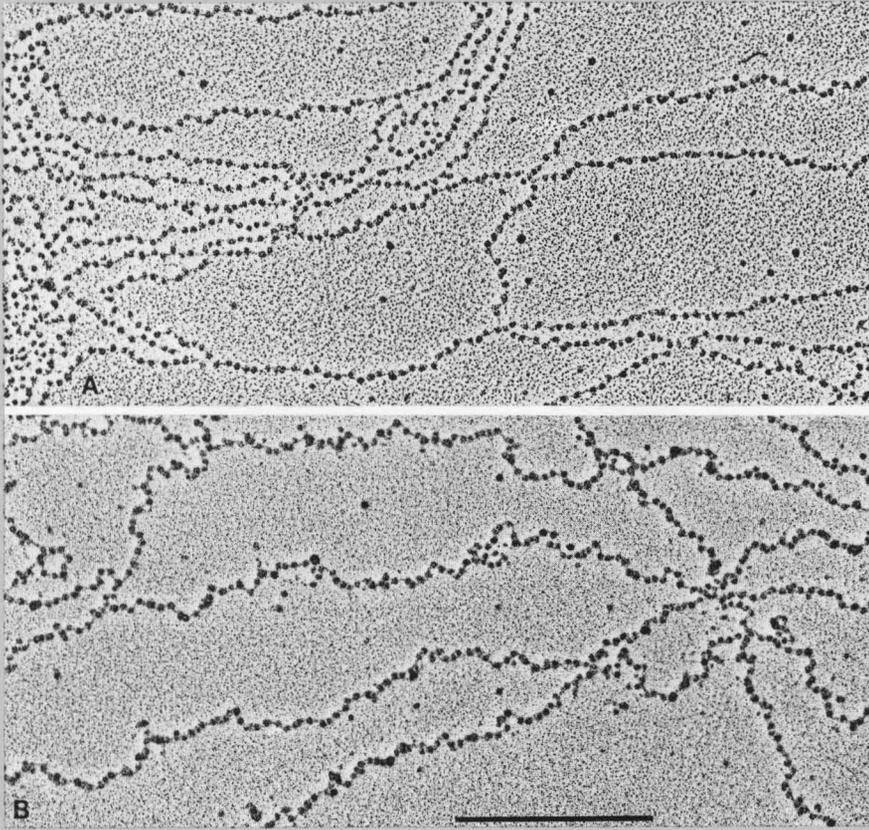


Abbildung 7: Chromatin eines Schleimpilzes (*Physoctonus polycephalus*, A) und eines Molchs (*Pleurodeles waltlii*, B) nach Spreitung in 0,1 mM Boratpuffer pH 9,0, Positiv-Kontrastierung und zusätzlicher Metall-Kegelbedampfung.

In beiden Fällen bestehen die Chromatinfibrillen aus perlenkettartig angeordneten Grundbausteinen, den Nucleosomen. Diese Chromatinstruktur ist universell für nahezu alle Eukaryonten-Zellen. Maßstab 0,5 µm.

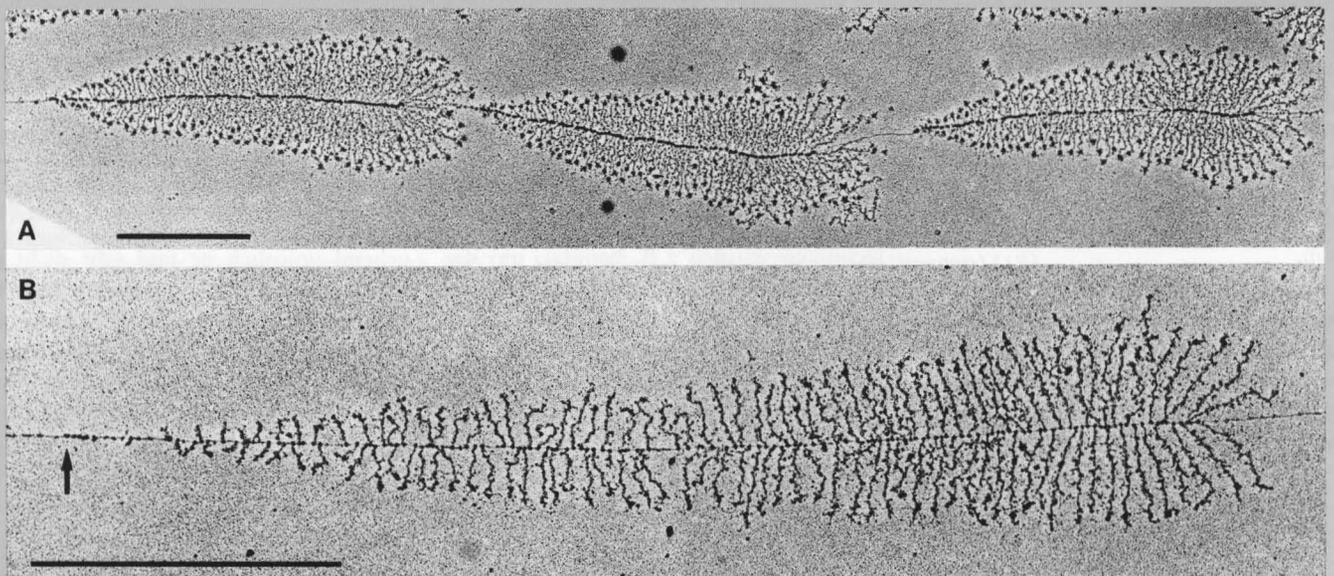


Abbildung 8: Transkriptionell aktive ribosomale RNA aus der Oozyte eines Molchs (*Pleurodeles waltlii*). Abb. A zeigt die charakteristische tandemartige Anordnung der rRNA Gene, die in den Zellkernen der meisten Organismen zu finden ist. In Abb. B ist ein rRNA-Gen stärker vergrößert abgebildet: Die von

links nach rechts verlaufende zentrale Achse stellt das nukleoläre Chromatin dar. Die seitlichen Fibrillen, die in einem Längengradienten angeordnet sind, repräsentieren die naszierenden Transkriptionsprodukte, die jeweils aus einem wachsenden rRNA-Präkursor bestehen und damit assoziierten Proteinen. Das

Gen wird simultan von etwa 100 RNA-Polymerasen (den basalen Verdickungen an jeder seitlichen Fibrille) transkribiert. Den Genanfang ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, das Genende ist durch die längste seitliche Fibrille definiert. Maßstab 1 µm.

des Formaldehyds sollte Paraformaldehyd benutzt werden. Lösen durch Erhitzen in dem alkalischen Boratpuffer, abkühlen, Saccharose zugeben, pH überprüfen, durch Millipore®-Filter (0,22 µm) filtrieren. Im Kühlschrank über mehrere Wochen haltbar.

9. Kodak Photo-Flo-200-Lösung (Netzzmittel zur Trocknung von Filmen)
10. 4 % wäßrige Wolframatophosphorsäure (pH nicht einstellen!). Durch Millipore®-Filter filtrieren, aufbewahren im Kühlschrank.
11. Borat-Pufferlösung pH 9,22, 0,01 M.

Als Ausgangsmaterial können isolierte Zellkerne oder ganze Zellen eingesetzt werden. In den allermeisten Fällen ist es ratsam, ganze Zellen direkt in dem hypotonen Medium aufzubrechen, da während der Isolation von Zellkernen endogene Nukleasen die naszierenden RNP-Fibrillen degradieren und vom Chromatin ablösen können. Der größte Teil des Nicht-Chromatin-Materials, das bei der Lyse ganzer Zellen anfällt (vor allem Membranen), gelangt unter den folgenden Bedingungen nicht auf die Netze:

Zellen in ein großes Volumen 0,1 bis 0,5 mM Boratpuffer (pH 8,5 bis 9,0) überführen (4 °C). Das Verhältnis Zellmasse zu Puffervolumen muß im Einzelfall ausgetestet werden. In den meisten Fällen werden die Zellen spontan lysieren, und die Lösung wird dann soweit verdünnt, daß sie nicht mehr viskös erscheint, und 10–30 min in Eis gehalten. In der Zwischenzeit werden die kohlebefilmten Trägernetze (s. weiter unten) durch Einbringen in eine Glimmentladung („glow discharge“) hydrophilisiert. (Die meisten Bedampfanlagen haben eine Vorrichtung zur Erzeugung einer Glimmentladung. Ein Wassertropfen, der versuchsweise auf die beglimmte Oberfläche aufgetragen wird, muß sich gleichmäßig über das Netzchen verteilen.) Ein Netz wird dann, so wie in Abb. 6 illustriert, auf den Boden einer Zentrifugationskammer gebracht, und 20–50 µl der Chromatinlösung werden vorsichtig über das Formaldehyd-Kissen (s. Stammlösung Nr. 8) geschichtet. Nach der Zentrifugation wird das Netz etwa 10 sec in 0,4 % Photoflo (verdünnt mit 0,1 mM Borat-Puffer, pH ca. 8,5) getaucht und mit Hilfe eines Föns getrocknet. Für die Positiv-Kontrastierung wird eine alkoholische Wolframatophosphorsäure-Lösung benutzt: 1 ml der Stammlösung Nr. 10 wird mit 3 ml abs. Ethanol gemischt. Das Netz wird etwa 1 min lang in diese Lösung getaucht, dann in abs. Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur Kontrasterhöhung kann das Präparat zusätzlich mit Metall kegelbedampft werden.

Modifikation der Arbeitsvorschrift

- a) Nach der Zentrifugation wird das Netz kurz in 0,1 mM Borat-Puffer (pH 8,5–9,0) gewaschen und mit 1 % wäßrigem Uranylacetat negativ kontrastiert.
- b) Um die Dispersion des Chromatins zu erleichtern, können dem hypotonen Borat-Puffer geringe Mengen eines anionischen Detergenz zugesetzt werden (z. B. 0,1 % Sarkosyl NL-30; Ciba-Geigy). Dabei ist allerdings zu beachten, daß höhere Detergenz-Konzentrationen die Struktur des Chromatins zerstören (U. Scheer, 1978). Zugabe von transfer-RNA (ca. 100 µg/ml) kann ebenfalls eine Verbesserung der

Spreitung bewirken, da die zugegebenen RNA-Moleküle Histon H1, das für eine Verdichtung der Chromatinverpackung verantwortlich ist, binden. Außerdem werden durch die RNA-Zugabe möglicherweise vorkommende RNA-abbauende Enzyme gebunden.

Herstellen des Kohle-Trägerfilms

Ein Glimmerplättchen wird auf etwa 2 × 5 cm zugeschnitten und gespalten. Auf die frisch gespaltenen Oberflächen wird ein Kohlefilm aufgedampft, der so dick sein sollte, daß er mechanisch ausreichend stabil ist (ein neben den Glimmer gelegtes weißes Papierstückchen muß deutlich geschwärzt sein). Den Kohlefilm läßt man abschwimmen, indem man das Glimmerplättchen unter einem flachen Winkel langsam in einen wassergefüllten Trog eintaucht. Dann wird der Kohlefilm, so wie in Abb. 4 illustriert, auf 300-mesh-Trägernetze abgesenkt. Die nach der Trocknung an der Luft gebrauchsfertigen Netze lassen sich fast beliebig lange aufbewahren. Die Beglimmung erfolgt direkt vor Gebrauch.

Transkriptionell inaktives Chromatin

A. L. Olins und D. E. Olins beschrieben 1974 erstmalig eine regelmäßige Perlenkettenanordnung von Chromatin, das unter den oben angegebenen Bedingungen gespreitet worden war. Sie nannten den globulären Chromatin-Grundbaustein *v-body* (heute hat sich der Ausdruck *Nukleosom* eingebürgert; P. Oudet und Mitarbeiter, 1975). Zahlreiche nachfolgende Arbeiten haben gezeigt, daß dieser strukturelle Aufbau von Chromatin universell für nahezu alle Eukaryonten ist. Die Abbildungen 7a und b demonstrieren, daß Chromatin beispielsweise eines Schleimpilzes und eines Molchs völlig identisch erscheint. Kombinierte biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben den molekularen Aufbau eines Nukleosoms geklärt: um einen globulären Histon-Oktamer-Komplex, der aus je einem Molekülpaar Histon H3, H2a, H2b und H4 besteht, ist ein kurzes DNA-Stück mit einer Länge von etwa 200 Nukleotidpaaren in zwei Windungen angeordnet; dies stellt die unterste Stufe der Verpackung von DNA in Chromatin dar (eine ausführliche Übersicht findet sich bei T. Igo-Kemenes u. Mitarb., 1982).

Transkriptionell aktives Chromatin

Die von O. Miller eingeführte Spreitungstechnik wurde ursprünglich zur Sichtbarmachung der Transkription von

ribosomalen RNA-Genen entwickelt. Abb. 8 zeigt solche Gene, die dicht mit RNA-Polymerasen bedeckt sind (die basalen Verdickungen an jeder seitlichen RNP-Fibrille stellen RNA-Polymerase-Moleküle dar). Die naszierenden RNP-Produkte sind in einem Längengradienten angeordnet, der ihr kontinuierliches Wachstum dokumentiert. Initiations- und Terminationsorte der RNA-Polymerasen (d. h. Anfang und Ende der Gene) sind so klar definiert. Jede seitliche RNP-Fibrille enthält ein naszierendes RNA-Präkursor-Molekül, das bereits mit Proteinen besetzt ist (weitere Details siehe W. W. Franke u. Mitarb., 1979). Mit Hilfe dieser Technik läßt sich auch die Transkription von Protein-kodierenden Genen darstellen (U. Scheer u. Mitarb., 1979; S. L. McKnight u. Mitarb., 1979; O. L. Miller, 1981). Es ist zu erwarten, daß in naher Zukunft die Hybridisierung klonierter Gensequenzen an Chromatin in elektronenmikroskopischen Spreitungspräparaten (*in situ-Hybridisierung*) erlauben wird, transkriptionell aktive Gene für die verschiedensten Proteine zu identifizieren.

Ich danke Dr. Hanswalter Zentgraf (Institut für Virusforschung, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) für seine hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung des Manuskripts und für zahlreiche methodische Hinweise.

Literaturverzeichnis:

- 1) BERGET, S. M., MOORE, C., SHARP, P. A.: „Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3171–3175 (1977)
- 2) BRACK, E.: „DNA electron microscopy“, CRC Crit. Rev. Biochem. 10, 113–169 (1981)
- 3) CHOW, L. T., BROKER, T. R.: „Mapping RNA:DNA heteroduplexes by electron microscopy“ in: „Electron Microscopy in Biology“, J. D. GRIFFITH (ed.): Vol. 1, John Wiley and Sons, New York, 1981, pp. 139–188
- 4) CHOW, L. T., GELINAS, R. E., BROKER, T. R., ROBERTS, R. J.: „An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA“, Cell 12, 1–8 (1977)
- 5) DAVIS, R. W., SIMON, M., DAVIDSON, N.: „Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids“ in: „Methods in Enzymology“, L. GROSSMAN and K. MOLDAVE (eds.): Vol. 21, Academic Press, New York, 1971, pp. 413–428
- 6) EVENSON, D. P.: „Electron microscopy of viral nucleic acids“ in: „Methods in Virology“, K. MARAMOROSCH and H. KO-

- PROWSKI (eds.): Vol. 6, Academic Press, New York, 1977, pp. 219–264
- 7) FERGUSON, J., DAVIS, R. W.: „Quantitative electron microscopy of nucleic acids“ in: „Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy II“, J. K. KOEHLER (ed.), Springer-Verlag, Berlin 1978, pp. 123–171
 - 8) FISHER, H. W., WILLIAMS, R. C.: „Electron microscopic visualization of nucleic acids and of their complexes with proteins“, *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 649–679 (1979)
 - 9) FRANKE, W. W., SCHEER, U., SPRING, H., TRENDELENBURG, M. F., ZENTGRAF, H.: „Organization of nucleolar chromatin“ in: „The Cell Nucleus“, H. BUSCH (ed.): Vol. 7, Academic Press, New York, 1979, pp. 49–95
 - 10) IGO-KEMENES, I., HÖRZ, W., ZACHAU, H.-G.: „Chromatin“, *Ann. Rev. Biochem.* **51**, in press (1982)
 - 11) KLEINSCHMIDT, A. K.: „Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules“ in: „Methods in Enzymology“, L. GROSSMAN and K. MOLDAVE (eds.): Vol. 12, Academic Press, New York, 1968, pp. 361–377
 - 12) KLEINSCHMIDT, A., ZAHN, R. K.: „Über Desoxyribonucleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen“, *Z. Naturforsch.* **14b**, 770–779 (1959)
 - 13) LANG, D., MITANI, M.: „Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers“, *Biopolymers* **9**, 373–379 (1970)
 - 14) McKNIGHT, S. L., MARTIN, K. A., BEYER, A. L., MILLER, O. L.: „Visualization of functionally active chromatin“ in: „The Cell Nucleus“, H. BUSCH (ed.): Vol. 7, Academic Press, New York, 1979, pp. 97–122
 - 15) MILLER, O. L.: „The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity“, *J. Cell Biol.* **91**, 15s–27s (1981)
 - 16) MILLER, O. L., BEATTY, B. R.: „Visualization of nucleolar genes“ *Science* **164**, 955–957 (1969)
 - 17) MILLER, O. L., HAMKALO, B. A.: „Visualization of RNA synthesis on chromosomes“, *Int. Rev. Cytol.* **33**, 1–25 (1972)
 - 18) MOORE, C. L.: „The electron microscopy of ribonucleic acids“ in: „Electron Microscopy in Biology“, J. D. GRIFFITH (ed.): Vol. 1, John Wiley & Sons, New York, 1981, pp. 67–88
 - 19) OLINS, A. L., OLINS, D. E.: „Spheroid chromatin units (v bodies)“, *Science* **183**, 330–332 (1974)
 - 20) OUDET, P., GROSS-BELLARD, M., CHAMBON, P.: „Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit“, *Cell* **4**, 281–300 (1975)
 - 21) ROBBERSON, D., ALONI, Y., ATTARDI, G., DAVIDSON, N.: „Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells“, *J. Mol. Biol.* **60**, 473–484 (1971)
 - 22) SCHEER, U.: „Changes of nucleosome frequency in nucleolar and non-nucleolar chromatin as a function of transcription: an electron microscopic study“, *Cell* **13**, 535–549 (1978)
 - 23) SCHEER, U., SPRING, H., TRENDELENBURG, M. F.: „Organization of transcriptionally active chromatin in lampbrush chromosome loops“ in: „The Cell Nucleus“, H. BUSCH (ed.): Vol. 7, Academic Press, New York, 1979, pp. 3–47
 - 24) STÜBER, D., BUJARD, H.: „Electron microscopy of DNA: Determination of absolute molecular weights and linear density“, *Mol. Gen. Genet.* **154**, 299–303 (1977)
 - 25) VOLLENWEIDER, H. J., SOGO, J. M., KOLLER, T.: „A routine method for protein-free spreading of double- and single-stranded nucleic acid molecules“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 83–87 (1975)
 - 26) WELLAUER, P. K., DAWID, I. B.: „Secondary structure maps of RNA: Processing of HeLa ribosomal RNA“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2827–2831 (1973)
 - 27) WILLIAMS, R. C.: „Use of polylysine for adsorption of nucleic acids and enzymes to electron microscope specimen films“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2311–2315 (1977)

Anschrift des Autors:

Dr. Ulrich Scheer
Abt. für Membranbiologie und Biochemie
Institut für Zell- und Tumorbio-
logie
Deutsches Krebsforschungszentrum
In Neuenheimer Feld 280
6900 Heidelberg 1

Für das fortschrittliche Labor

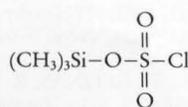
Präparate zur Synthese

818184 Trimethylsilylchlorsulfonat zur Synthese

$C_3H_9ClO_3SSi$ $M = 188,70$ g/mol

CARN [4353-77-9]

CA: Chlorosulfuric acid trimethylsilyl ester



Trimethylsilylchlorsulfonat spaltet die C-Si-Bindung von silylierten Verbindungen unter Bildung von C-Sulfonsäuren¹⁾:

1. Aromatische Sulfonsäuren aus silylierten Aromaten²⁻⁵⁾.
2. Sulfonierung silylierter Allene und Alkine⁶⁾.
3. Sulfonierung von Ketonen⁷⁾.

Literaturverzeichnis:

- 1) GRIGNON-DUBOIS, M., PILLOT, J. P. et al.: *J. Organomet. Chem.* **124**, 135 (1977)
- 2) RYBAKOVA, L. F., PANOV, E. M. et al.: *Zh. Obshch. Khim.* **46**, 117 (1976); *CA* **84**, 135746c (1976)
- 3) FELIX, G., DUNOGUES, J. et al.: *Angew. Chem.* **89**, 502 (1977)
- 4) CORRIU, R. J. P., HENNER, B. J. L. et al.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1977**, 1249
- 5) FELIX, G., DUNOGUES, J. et al.: *Angew. Chem.* **91**, 439 (1979)
- 6) BOURGEOIS, P., MERAULT, G. et al.: *J. Organomet. Chem.* **59**, 145 (1973)
- 7) HOFMANN, K., SIMCHEN, G.: *Synthesis* **1979**, 699

818157 Ethoxycarbonylmethyltriphenylphosphoniumbromid zur Synthese

$C_{22}H_{22}BrO_2P$ $M = 429,29$ g/mol

CARN [1530-45-6]

CA: Phosphonium, (2-ethoxy-2-oxoethyl)-triphenyl-, bromide



Das Phosphoniumsalz dient zur Darstellung α , β -ungesättigter Ester aus Aldehyden¹⁻⁶⁾ und zur Darstellung substituierter Propiolsäureester aus Säurechloriden durch Wittig-Reaktionen⁷⁾.

Literaturverzeichnis:

- 1) SONNET, P. E., OLIVER, J. E.: *J. Heterocycl. Chem.* **11**, 263 (1974)
- 2) YOSHINA, S., TANAKA, A. et al.: *Yakugaku Zasshi*, **1418** (1975); *Chem. Abstr.* **84**, 90074p (1976)
- 3) HONDA, K., YONETANI, T.: *Jpn. Kokai* **78**, 127, 470, Kanebo, Ltd., 1977; *Chem. Abstr.* **90**, 103958f (1979)
- 4) HONDA, K., YONETANI, T.: *Jpn. Kokai* **78**, 127, 473, Kanebo, Ltd. 1977; *Chem. Abstr.* **90**, 103959g (1979)
- 5) AKINTOBI, T., JAENICKE, L. et al.: *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 986
- 6) PIPER, J. R., MONTGOMERY, J. A.: *J. Med. Chem.* **23**, 375 (1980)
- 7) COSSY, J., PETE, J.-P.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1979**, II-559