

Diss. Nr. 5449

DARSTELLUNG ISOLIERTER SPEICHELDRUESEN-
CHROMOSOMEN VON CHIRONOMUS THUMMI UND CHIRONOMUS TENTANS
IM SCANNING-ELEKTRONENMIKROSKOP

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ULTRA-
STRUKTUR VON IONENINDUZIERTEN DEKONDENSATIONEN ISOLIERTER
SPEICHELDRUESENCHROMOSOMEN VON CHIRONOMUS THUMMI

A B H A N D L U N G

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

E I D G E N O E S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z U E R I C H

vorgelegt von

C H R I S T O P H U L R I C H H O L D E R E G G E R

dipl. Natw. ETH

geboren am 31. Juli 1945

von Gais (AR)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Ursprung, Referent
Dr. M. Lezzi, Korreferent

1975

Der erste Teil dieser Arbeit wurde in abgeänderter Form
publiziert in "Principles and Techniques of Scanning
Electron Microscopy", Vol. 3 (M. A. Hayat, Editor),
Van Nostrand Reinhold Company, New York (im Druck)

VORWORT

Diese Arbeit besteht aus zwei Teilen. Dies hat folgenden Grund: Am Anfang lag mein Interesse vor allem bei der dreidimensionalen Darstellung von Riesenchromosomen. Das Scanning-EM schien dafür ein geeignetes Instrument zu sein, obwohl mir bewusst war, dass ich mich an den Grenzen seines Auflösungsvermögens bewegen würde. Erstes Ziel war die Darstellung "nativer" isolierter Chromosomen; als zweites Ziel wurde die Darstellung von experimentell nach ROBERT (1971) induzierten "Riesepuffs" ins Auge gefasst. Im Laufe der Arbeit zeigte sich jedoch dieses zweite Ziel als zu hoch gesteckt. Mit dem Scanning-EM können zwar schöne dreidimensionale Bilder hergestellt werden, deren Informationsgehalt der geringen Auflösung wegen jedoch beschränkt ist. Deshalb entschloss ich mich, die Arbeit mit dem Scanning-EM nach Erreichen des ersten Ziels abubrechen und die Struktur der "Riesepuffs" - leider nur zweidimensional, dafür mit grösserem Informationsgewinn - am Dünnschnitt zu studieren. Dreidimensionalität und hoher Informationsgehalt wären wahrscheinlich nur mit dem Hochspannungs-Elektronenmikroskop zu erreichen; ein solches Instrument steht indessen in der Schweiz nicht zur Verfügung.

1. T E I L

Darstellung isolierter Speicheldrüsenchromosomen
von Chironomus thummi und Chironomus tentans
im Scanning-Elektronen-Mikroskop

INHALT

	Seite
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	7
2.1. Material	7
2.2. Methoden	8
2.2.1. Isolation von Chromosomen	8
2.2.2. Trocknung	9
2.2.2.1. Gefriertrocknung	9
a. Einfrieren mit Freon 22 ^R und flüssigem Stickstoff	9
b. Einfrieren mit flüssigem Helium II	10
c. Lyophilisation	10
d. Bedampfung	11
2.2.2.2. Kritischer - Punkt - Trocknung (CPD)	12
a. mit CO ₂	12
b. mit N ₂ O (Lachgas)	13
2.2.3. Auswertung	13
2.2.4. Kontrollen	13
3. Resultate	14
3.1. Einfrieren mit Freon 22 ^R	14
3.2. Einfrieren mit flüssigem Helium II	15
3.3. Kritischer - Punkt - Trocknung	16
4. Diskussion	16
5. Zusammenfassung	20
6. Literatur	21

1. EINLEITUNG

Riesenchromosomen sind vorzügliche Objekte für Untersuchungen der Genaktivität und -aktivierung. Solche Untersuchungen wurden bislang meist im Lichtmikroskop (LM) (LEZZI 1967a, b, LEZZI und GILBERT 1970) oder im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) (BEERMANN 1954, BERENDES 1970, PEROV und CHENTSOV 1971, SORSA 1969, STEVENS 1964, STEVENS und SWIFT 1966) durchgeführt. Bis zu einem gewissen Grad ist das Auflösungsvermögen des LM genügend, vor allem dann, wenn massive Veränderungen der Struktur beobachtet werden können, wie z.B. das Auftauchen oder Verschwinden eines grossen puffs oder eines Balbiani-Ringes. Im Phasen- oder Interferenzkontrast lassen sich solche Veränderungen an unfixiertem Material sehr gut beobachten. Falls jedoch weniger augenfällige Effekte untersucht werden sollen, wird das Chromosom im TEM betrachtet werden, was bisher bedingt, dass es auf irgendeine Weise fixiert, entwässert, in Plastik eingebettet, dünn geschnitten und schliesslich kontrastiert werden muss. Wie aus der Aufzählung der Schritte ersichtlich ist, ist der Weg zwischen Effekt und Auswertung ziemlich lang; das Auflösungsvermögen des TEM ist dafür um einige Grössenordnungen besser als dasjenige des LM.

Was jedoch das LM nur beschränkt und das TEM an Dünnschnitten überhaupt nicht bieten können, ist eine räumliche Darstellung des Objektes. Hier hingegen liegt die Stärke des Scanning-Elektronenmikroskops (SEM). Das Präparat wird nicht zerschnitten, sondern es wird seine Oberfläche betrachtet, wobei ein Bild von sehr grosser Tiefenschärfe entsteht. Dies ist von Vorteil bei Präparaten, die nicht mit dem herkömmlichen Verfahren der Gefrierätzung im TEM

dargestellt werden können, z.B. weil sie keine Membranen haben. Das Auflösungsvermögen des SEM ist heute an geeigneten Präparaten ca. 100 \AA , und in einigen Jahren wird es vielleicht nicht mehr viel schlechter sein als dasjenige des TEM.

Die Trocknung von biologischen Objekten für strukturelle Untersuchungen sollte mechanisch möglichst schonend sein. Lufttrocknung kommt nicht in Frage, da das ganze Präparat von der Flüssigkeitsoberfläche durchwandert wird, wobei die Oberflächenspannung beträchtliche Kräfte ausüben kann. Alternativen dazu sind Gefriertrocknung und Kritischer-Punkt-Trocknung (engl. Critical Point Drying, CPD) (ANDERSON 1951), die beide keine Oberflächenspannungen hervorrufen. - Zum Schluss muss die Präparat-Oberfläche noch elektrisch leitend gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Riesenchromosomen von C. tentans und C. thummi im SEM darzustellen. Die Fragen, welche ich beantworten wollte, waren die folgenden:

1. Riesenchromosomen sind mechanisch sehr delikate Objekte. Wie weit sind die heute gebräuchlichen Routine-Präparationsmethoden für ihre Präparation für das SEM geeignet?
2. Kann ein Unterschied in der dreidimensionalen Struktur von Banden, Interbanden, puffs, Balbiani-Ringen festgestellt werden?
3. Dünnschnitte lassen an Balbiani-Ringen (BR) periphere loops vermuten. Lassen sich diese loops dreidimensional bestätigen?
4. STEVENS (1964) zeigt in BR Granulen von ca. 250 \AA Durchmesser. Lassen sie sich im SEM darstellen? Wie ist ihre räumliche Anordnung relativ zu den Fibrillen?

2. MATERIAL UND METHODEN (HOLDEREGGER 1974)

2.1. Material

Tiere: Es wurden Chromosomen der Speicheldrüsen von Larven im 4. Stadium von C. tentans und C. thummi verwendet. Die Tiere entstammten unserer Laborzucht und wurden jeweils mindestens zwei Stunden vor dem Versuch bei 4°C in den Kühlschrank gestellt.

Medien: Als Isolationsmedium diente Glancy's (D'ANGELO 1946) Medium: 60 mM NaCl, 90 mM KCl. 5 mM Phosphatpuffer pH 7.3.

Zur Fixation wurde Glancy-Medium mit einem Zusatz von 2.5% Glutaraldehyd verwendet.

Instrumente: Die Isolation der Chromosomen erfolgte unter einem Stereomikroskop (Leitz) mit Durchlichtbeleuchtung, mit elektrolytisch gespitzen (FREY 1974) Wolframnadeln.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung diente ein Zeiss Universal-Fotomikroskop mit Interferenzkontrast-System und einer Wild MKa II Fotoausrüstung.

Die Präparate wurden in einem Edwards 306-Gefrierätzer lyophilisiert oder in einer CPD-Anlage nach KOLLER und BERNHARD (1964) getrocknet. Für Experimente mit flüssigem Helium II standen mir ein Kryostat nach FERNANDEZ - MORAN (1960) von Prof. H. Moor und Helium vom Institut für Festkörperphysik (ETH) zur Verfügung.

Einige Präparate wurden auf einer Edwards-Gewebetrocknungsanlage mit Peltier-Element getrocknet und auf einer Balzers Mikro-BA-3 mit Gold bedampft.

Die Auswertung erfolgte auf einem Cambridge Stereoscan S4 SEM. Aufnahmen wurden auf Ilford FP4 Rollfilm gemacht.

Kontrollen wurden mit Epon/Araldit eingebettet, auf einem LKB Ultratome II dünn geschnitten und in einem Zeiss EM 9 betrachtet.

Zur Präparation wurden ferner diverse Dewargefässe sowie folgendes Verbrauchsmaterial benötigt: Parafilm^R, silikonisierte Objektträger, Deckgläser, Cementit^R, CO₂ und N₂O von Carba AG Zürich, N₂ liq., Freon 22^R.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolation von Chromosomen

Die Chromosomen wurden mit einer von LEZZI (LEZZI und GILBERT 1970) abgeleiteten Methode isoliert.

Ein sauberes, kleines, asymmetrisches Stück eines Deckglases wurde mit einem Parafilm^R-Streifen auf einem silikonisierten Objektträger festgebacken und mit einem ca. 12 - 15 mm grossen Tropfen Glancy-Medium bedeckt. Bei einer 10-fachen Vergrösserung wurden die Speicheldrüsen einer Larve von C. tentans oder C. thummi isoliert und in 2 Tropfen Glancy-Medium gewaschen. Eine davon wurde ca. 1 mm neben dem Deckglasstück im grossen Tropfen ausgebreitet und mit einer Wolframnadel, deren dickes Ende in einem Plastilinklumpchen ausserhalb des Tropfens steckte, niedergehalten, wobei die Drüse unter keinen Umständen verletzt werden durfte.

Bei stärkerer Vergrösserung (100 x) sind die Kerne nun gut sichtbar, und einzelne Chromosomen können unterschieden werden. Mit einer sehr feinen, spitzen Wolframnadel wurde nun bis zum Kern ein Schlitz in eine Zelle gerissen. Nachdem

die Nadel durch Abstreifen am Parafilm^R gereinigt worden war, wurde sie durch den Schlitz in den Kern eingeführt und mit den daranhängenden Chromosomen sorgfältig herausgezogen. Die Chromosomen wurden auf dem Deckglas deponiert und der ganze Vorgang wiederholt, bis der Zellkern leer war. Auf diese Weise konnten aus mehreren Kernen einer Drüse die Chromosomen gewonnen werden. - Die Chromosomen klebten am Deckglas und konnten in beschränktem Ausmass mit der Nadel ausgebreitet werden. Sie waren nun auch zu unterscheiden: das kleine IV. Chromosom sah man sofort, ebenso Chromosomen mit Nukleolen (C. tentans).

Das Präparat wurde nun durch dreimaligen Mediumwechsel gewaschen; dann wurde das Medium gegen Fixierlösung ausgetauscht, die Drüsenreste entfernt und das Präparat im Interferenzkontrastmikroskop betrachtet. Das am besten erhaltene IV. Chromosom wurde fotografiert; alle andern wurden mit der Wolframnadel entfernt. Nach 30-minütiger Fixierzeit wurde das Präparat mit destilliertem Wasser gewaschen und auf eine der folgenden Arten getrocknet.

2.2.2. Trocknung

2.2.2.1. Gefriertrocknung

a) Einfrieren mit Freon 22^R und flüssigem Stickstoff
Das Deckglas wurde sorgfältig vom Objektträger gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass das Präparat nicht austrocknete. Mit Filterpapier wurde soviel Wasser wie möglich abgesaugt und die Rückseite des Deckglases getrocknet, um

später einen guten thermischen Kontakt mit dem Präparat-
halter des Gefriertrockners zu ermöglichen. Dann wurde
das Deckglas, Chromosomen voran, in schmelzendes Freon 22^R
gestossen und anschliessend unter flüssigem Stickstoff
auf den eigens konstruierten Präparathalter montiert.
Wenn der Halter mit 8 Präparaten beladen war, wurde er auf
den vorgekühlten Tisch des Lyophilisators geklemmt.

In einigen Fällen wurde 32%iger Aethanol als Gefrierschutz
verwendet (Gefrierpunkt -22°C , (Handbook)). (Methode a.1)

b) Einfrieren mit flüssigem Helium II

Mehrere Präparate wurden in flüssigem He II bei 2°K einge-
frozen. Dazu wurde ein Kryostat nach FERNANDEZ-MORAN (1960)
verwendet, der mit einem Korb zum Auffangen der Präparate
versehen wurde. Die Präparate wurden einzeln rasch in das
Vakuum über dem Helium eingeschleust und fallengelassen,
bevor das Wasser über den Chromosomen gefrieren konnte.
Normalerweise kochte das Helium während maximal 0.5 Sekun-
den um das Präparat. - Wenn alle Präparate eines Versuchs
eingefroren waren, wurde der Kryostat belüftet und der Korb
mit den Präparaten rasch in flüssigen Stickstoff transfe-
riert. Die Montage war dieselbe wie oben.

c) Lyophilisation

Um die Präparate bei kontrollierbaren tiefen Temperaturen
trocknen und anschliessend bedampfen zu können, ohne sie
zwischen durch an Atmosphärendruck und -feuchtigkeit zu
bringen, wurde ein modifizierter Edwards 306-Gefrierätzer
benutzt. Die Modifikation war notwendig, um die erforder-
lichen langen Trocknungszeiten zu ermöglichen.
Da Glas ein schlechter thermischer Leiter ist, musste in
Vorversuchen die Tischtemperatur ermittelt werden, die

nötig ist, um die Präparate auf einer bestimmten Temperatur zu halten. Dazu wurde statt der Chromosomen ein Mikro-Thermoelement auf einem Deckglas festgefroren und wie ein normales Präparat montiert. Es wurde folgender Zusammenhang zwischen Tischtemperatur und Präparattemperatur gefunden (Vakuum besser als 10^{-6} Torr):

Tisch °C	Präparat °C
-180	-148
-150	-129
-114	- 99
-100	- 87 *
- 90	- 78

* nach 2 Std. -97°C

Es besteht die Tendenz des Präparates, nach längerer Zeit (Stunden) auf Tischtemperatur zu equilibrieren. Ein Einfluss der Temperatur des Thermoelementes auf die Präparattemperatur konnte nicht festgestellt werden.

Bei einem Experiment wurde der stickstoffgekühlte Präparathalter mit den Chromosomen auf den auf -150°C vorgekühlten Präparattisch geklemmt und die Glocke evakuiert. Sobald das Vakuum 10^{-4} Torr erreicht hatte, wurde die Tischtemperatur auf -100°C eingestellt und die Apparatur während drei Tagen unverändert laufengelassen.

d) Bedampfung

Normalerweise wurden die Präparate mit Pt/C bedampft. Während der Bedampfung wurde der Tisch hin- und hergedreht, um die Chromosomen allseitig dem Strahl auszusetzen.

Die Bedampfungsschicht war ca. 100 Å dick; die Dickenbestimmung geschah durch optischen Vergleich mit Schichten, deren Dicke mittels Schwingquarz in einer Balzers-Gefrierätzanlage gemessen wurde.

Nach der Bedampfung wurde der Tisch auf +30°C aufgeheizt und die Vakuumkammer mit Stickstoff belüftet. Die Präparate wurden herausgenommen, mit Cementit^R auf SEM-Präparathalter aufgeklebt und die bedampfte Oberfläche mit einem Tropfen Leitsilber mit dem Halter elektrisch leitend verbunden. Bis zur Auswertung im SEM wurden sie dann in einem Exsikator aufbewahrt.

Einige Präparate wurden nach der Trocknung in einem Exsikator zu einer Balzers Mikro-BA-3-Bedampfungsanlage transportiert und dort auf einem Tisch mit Planetenbewegung mit 250 Å Gold bedampft.

2.2.2.2. Kritischer-Punkt-Trocknung

a) mit CO₂

Die Präparate wurden unter Wasser auf den Präparathalter der Trocknungs- und Bedampfungsanlage montiert (s. oben), in Aethanol kontinuierlich entwässert und über Gemische von 30% und 70% Amylacetat in Alkohol schliesslich in 100% Amylacetat gebracht. Der nasse Halter wurde in die mir von Prof. W. Bernhard freundlicherweise zur Verfügung gestellte Druckkammer gebracht und mit einem Deckel gegen den CO₂-Strahl geschützt. Das weitere Vorgehen ist bei ANDERSON (1951) beschrieben. Kriterium für den vollständigen Ersatz des Amylacetats durch CO₂ war Geruchlosigkeit des Gases am Auslassventil. Der trockene Präparathalter wurde herausgenommen und zur Bedampfung in die Edwards-Anlage

gebracht. Die nächsten Schritte waren dieselben wie oben.

b) mit N_2O (Lachgas)

Lachgas hätte gegenüber CO_2 den Vorteil, mit Wasser mischbar zu sein. Dies würde eine Entwässerung in Aethanol - Amylacetat erübrigen. Das Vorgehen war dasselbe wie bei KOLLER und BERNHARD (1964) beschrieben; die Präparate waren immer auf dem Spezialhalter für die Bedampfungsanlage montiert.

Leider war in Zürich kein in der Flüssigkeitsphase ölfreies Lachgas erhältlich; alle Präparate waren nach der "Trocknung" mit einem Oelfilm bedeckt. Deshalb wurde diese Methode fallengelassen.

2.2.3. Auswertung

Die Präparate wurden in einem Cambridge Stereoscan S4 SEM bei einer Beschleunigungsspannung von 18 kV betrachtet. Meist wurde der Tisch um 30° gegen die Vertikale geneigt.

2.2.4. Kontrollen

Als Kontrollen wurden Dünnschnitte angefertigt. Die Präparate wurden in Epon/Araldit auf der Glasoberfläche eingebettet. Die polymerisierten Blöcke wurden mit flüssigem Stickstoff abgesprengt und wie üblich zu Dünnschnitt-Präparaten verarbeitet, die mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert wurden. Die Auswertung erfolgte im Zeiss EM 9. Es wurden nach folgenden Schritten Kontrollpräparate abgezweigt: Isolation, Lyophilisation aus Wasser, Lyophilisa-

tion aus 32 % EtOH, Kritischer-Punkt-Trocknung mit CO₂, Auswertung im SEM.

3. RESULTATE

Die Morphologie gefriergetrockneter Chromosomen ist stark abhängig von der Methode des Einfrierens, die mit zunehmender Geschwindigkeit verbesserte Gefriereraten erwarten liess, und der Temperatur während der Lyophilisation. In Anlehnung an die Gefrierätztechnik (BULLIVANT 1973) wurden möglichst rasches Einfrieren und tiefe Temperaturen angestrebt.

3.1. Einfrieren mit Freon 22^R

Lyophilisation bei -60°C, Bedampfung mit ca. 250 Å Gold:
(Fig. 2)

Auffallend ist die relativ glatte Oberfläche des Nucleolus, sowie die grobmaschige Struktur des Chromosoms. Banden und Interbanden sind gut unterscheidbar. In BR sind die Strukturelemente eher zentrifugal und locker angeordnet. In Banden scheinen sie sehr dicht zu liegen; die Oberfläche zeigt wenige Details, da sie wahrscheinlich ganz mit Gold aufgefüllt ist. Interbanden wiederum scheinen eher locker zu sein, mit vorwiegend längs orientierten Fibrillenbündeln.

Fig. 3 stellt ein IV. Chromosom von C. tentans dar, das im Gegensatz zu Fig. 2 unter Zusatz von 1 mM MgCl₂ fixiert, dann aber nach der gleichen Methode eingefroren und getrocknet wurde. Auffallend ist die granuläre Struktur von BR 2, sowie die dichtere Beschaffenheit des Chromosoms. Die Fibrillenbündel sind dünner, dafür zahlreicher.

Die Dünnschnitt-Kontrolle (Fig. 5 b+c) zeigt massive Veränderungen der Ultrastruktur von Chromosomen, die auf diese Weise eingefroren, lyophilisiert, bedampft und im SEM betrachtet wurden, gegenüber Chromosomen, die, wie üblich für Dünnschnitte, direkt nach der Fixation entwässert und eingebettet wurden (Fig. 5a). Die Vergrößerung der fibrillären Struktur ist offensichtlich. Fig. 5c ist das identische Chromosom wie in Fig. 3, das nach der Auswertung im SEM ebenfalls via Aceton in Plastic eingebettet wurde. Die in Erscheinung tretenden groben Maschen sind Löcher, die beim Einfrieren entstandene Eiskristalle hinterlassen haben; sie sind mit denjenigen in Fig. 5b vergleichbar.

a.1. Einfrieren mit Gefrierschutz, Weiterbehandlung gleich wie oben. Um möglicherweise eine grössere Gefrierate zu erreichen, wurden Versuche mit Gefrierschutzmitteln angestellt. Glycerin fiel ausser Betracht, da es nicht sublimierbar ist (unterkühlte Flüssigkeit). Als einfachstes Mittel wurden verschiedene Konzentrationen von Alkohol angewandt. 32 % Aethanol in dest. Wasser ergab gute Resultate (Fig. 3), die sich durch Erhöhung des Alkoholgehalts nicht mehr verbessern liessen. Im Dünnschnitt zeigte ein Schwesterchromosom eine sehr dichte Struktur, die jedoch Banden und Interbanden noch erkennen liess (Fig. 4d). Die BR sind sehr schön erhalten. Bei der Verdichtung der Struktur dürfte es sich um ein Dehydrierungsartefakt handeln.

3.2. Einfrieren mit flüssigem Helium II

Eine weitere Steigerung der Gefrierate versuchte ich zu erreichen, indem ich Chromosomen mit He II einfrore. Wegen seiner hohen thermischen Leitfähigkeit bildet He II weniger rasch einen isolierenden Gasmantel um das einzufrierende

Objekt als flüssiger Stickstoff. Dazu ist das Temperaturgefälle grösser (Zimmertemperatur \rightarrow 2°K) als bei Freon 22^R (Zimmertemperatur \rightarrow 127°K). Offenbar sind jedoch Riesenchromosomen zu grosse Objekte, als dass sich die Gefrier-rate auf diese Weise entscheidend steigern liesse; auf jeden Fall wurde weder im SEM noch im Dünnschnitt ein Unterschied in der Struktur gegenüber mit Gefrierschutz (32 % Aethanol) in Freon 22^R eingefrorenen Chromosomen gefunden.

3.3. Kritischer-Punkt-Trocknung (CPD)

Mit der CPD-Methode wurde versucht, Gefrierartefakte zu umgehen. Es liess sich jedoch kein Unterschied in der Oberflächenstruktur zwischen auf diese Weise getrockneten und mit 32 % Aethanol und Freon 22^R eingefrorenen und lyophilisierten Chromosomen finden. Die Oberfläche ist, wie bei diesen, glatt mit Buckeln über Banden und Dellen bei Interbanden. BR haben eine rauhe Struktur mit eher zentrifugal orientierten Elementen, die jedoch keine Granulation zeigen. Loops lassen sich nicht erkennen, ebenso sind Agglomerate von BR-Granulen (STEVENS 1964) nicht auszumachen. Ueber die Packung und Orientierung von Fibrillen in Banden oder Interbanden lässt sich keine Aussage machen, da sie wahrscheinlich von der Metallschicht, in diesem Fall 100 Å Pt/C, zugedeckt sind.

4. DISKUSSION

Mit dem SEM lassen sich die eingangs gestellten Fragen nur teilweise beantworten. Einmal ist das Auflösungsvermögen des Instrumentes heute offenbar doch noch nicht so hoch,

dass dünne Fibrillen in der Grössenordnung von 100 \AA , wie sie in Chromosomen auftreten (BORNKAMM und SONNENBICHLER 1973), einwandfrei dargestellt werden könnten. Dazu kommt aber noch die Vorbehandlung, die sehr dazu geeignet ist, mannigfache Artefakte einzuführen. Einerseits müssen die Objekte trocken, d.h. wasserfrei sein, weil das SEM bei Vakuum arbeitet. Gefrier- und Trochnungsartefakte sind nicht auszuschliessen. Andererseits muss die Oberfläche elektrisch leitend gemacht werden, was bis jetzt am leichtesten durch Aufdampfen einer sehr dünnen Metallschicht geschah. Diese Metallschicht ist in meinen Versuchen ca. 100 \AA (Pt/C) oder ca. 250 \AA (Au) dick und wird allseitig aufgebracht. Das bedeutet, dass Struktureinheiten, die näher als die doppelte Dicke einer Bedampfungsschicht beieinanderliegen, im SEM nicht mehr unterschieden werden können. Daraus resultiert eine weitere Verschlechterung des Auflösungsvermögens des Verfahrens.

Die gezeigten Bilder lassen sich auf folgende Weise interpretieren: Als Mass für die Gefriertrate kann die Grösse der beim Einfrieren entstehenden Eiskristalle genommen werden. Die mit dem SEM erzielten Bilder veranschaulichen dies deutlich. Fig. 2 stellt ein Chromosom dar, das relativ langsam eingefroren wurde. Die Kristalllöcher sind entsprechend gross. Das gefrierende Wasser hat die feine Fibrillenstruktur des Chromosoms zerstört und viele kleine Einzelfibrillen und kleinere Bündel zu groben Strängen zusammengeschoben. Der Einfluss von Mg^{++} im Fixiermedium (Fig. 3) scheint die dünne Fibrillenbündel etwas zu stabilisieren, so dass ein feineres Maschenwerk entsteht als in Fig. 2. Der BR jedoch, der aus vielen lockeren Einzelfibrillen besteht (Fig. 1), scheint immer noch zu wenig stabilisiert zu sein, denn er ist deutlich kleiner als im lichtmikroskopischen Bild. Das

Chromosom selbst hat eine relativ feinmaschige, schwammige Struktur, deren Löcher wiederum wahrscheinlich ein Kristallisationsartefakt sind, wie dies der Dünnschnitt (Fig. 5c) sehr deutlich zeigt. - Die Granulen, mit welchen der BR besetzt zu sein scheint, sind ca. eine Zehnerpotenz grösser als BR-Granulen (STEVENS 1964); es dürfte sich dabei um eingeschrumpftes Material von der Peripherie handeln, das sich zu sphärischen Partikeln aufspiralisiert hat (TOCZKO und JAZWINSKI 1971).

Wie Fig. 5d zeigt, liess sich die Gefriertrate durch Gefrierschutz steigern: die Kristalllöcher sind verschwunden; dafür resultiert eine so dicht gewobene Oberfläche, dass das oben erwähnte Kriterium vom Abstand einzelner Strukturelemente Anwendung findet: die Oberfläche wird, mit Ausnahme des BR, zusammenhängend glatt, bloss grössere Unebenheiten wie Banden treten als Buckel hervor, kleinere Komponenten werden von der Bedampfungsschicht zugedeckt. Es ist also unmöglich, nähere Aussagen über den Fibrillenverlauf im Chromosom zu machen. Im BR ist die Struktur lockerer, daher auch profiliert; aber auch hier hat die Schrumpfung der peripheren Teile wieder zu einer wesentlichen Vergrößerung der Oberflächenstruktur geführt.

Dass die Präparation mit He II und CPD gleiche Resultate lieferte, ist nun nicht anders zu erwarten: Kristalllöcher werden noch kleiner oder fallen weg, das Chromosom scheint mehr oder weniger homogen; einzig die BR zeigen eine etwas detailliertere Struktur, die jedoch ebenfalls noch ungenügend stabilisiert ist, wie fehlende loops und BR-Granulen vermuten lassen.

SCHEID et al. (1972) haben meines Wissens erstmals isolierte Riesenchromosomen von D. melanogaster im SEM dargestellt.

Die Qualität ihrer Bilder lässt jedoch auf ungeeignete und viel zu komplizierte Präparation schliessen; (der Reihe nach: Isolation in Glancy-Medium, Essigsäurefixation, Quetschung, Gefrieren, Alkohol, Vakuumtrocknung, Färbung mit Orcein, Alkohol, Wasser, Trypsin, 0.1 N Essigsäure, Wasser/Methanol 1:1, Wasser, Alkohol, Vakuumtrocknung, Bedampfung Kohle-Gold-Kohle). Sämtliche feineren Details sind verschwunden, sichtbar sind nur ganz starke Banden und Interbanden. Der fibrilläre Aufbau ist nirgends auch nur angedeutet.

Anders bei TROESCH et al. (1974): Die dort gezeigten Bilder von Chromosomen in situ haben grosse Aehnlichkeit mit meinen letzten Präparaten (Fig. 3), wenn auch zu sagen ist, dass die oft sehr starke Granulation der Chromosomenoberfläche und vor allem das Nukleolus bei TROESCH wahrscheinlich auf präzipitierte Kernsaftproteine zurückzuführen ist. Trotzdem ist der fibrilläre Aufbau der Chromosomen unter den gegebenen Umständen noch relativ gut erkennbar, und auch die BR haben die gleiche Struktur wie bei isolierten Chromosomen. Aus dem Vergleich dieser zwei Arbeiten lässt sich schliessen, dass die Morphologie der Chromosomen durch die Isolation nicht gestört wird, ja sogar, dass uns dadurch möglicherweise ein besserer Einblick in die Chromosomenstruktur ermöglicht wird. Anders verhält es sich natürlich mit den Beziehungen der Chromosomen zur Kernmembran, auf die in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen wurde.

Es scheint mir im Augenblick wenig sinnvoll zu sein, SEM-Untersuchungen an Riesenchromosomen fortzusetzen; präparative und apparative Möglichkeiten müssen vorher entscheidend verbessert werden. Die Fixation der Chromosomen bereitet noch Schwierigkeiten, bei der Bedampfung mit Metall gehen Struktureinheiten verloren, und das Auflösungsvermögen des SEM kann bestimmt noch verbessert werden. Zumindest vorläufig werden wir uns mit nur zweidimensionalen, dafür besser auflösenden Darstellungen im TEM begnügen müssen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von der Tatsache, dass dreidimensionale Strukturen im Lichtmikroskop und im Transmissions-Elektronenmikroskop nur in beschränkter Weise dargestellt werden können, wird in dieser Arbeit versucht, die Möglichkeiten des Scanning-EM für die Darstellung von isolierten Polytänchromosomen von C. tentans und C. thummi einzusetzen.

Die Chromosomen werden in Glancy-Medium auf ein Deckglasstück isoliert. Die Fixation geschieht mit 2.5 % Glutaraldehyd im Medium. Anschliessend werden die Präparate auf eine der folgenden Arten getrocknet:

- Gefriertrocknung, wobei das Einfrieren mit Freon 22^R mit oder ohne Zugabe von Alkohol als Gefrierschutz geschieht;
- Gefriertrocknung; die Präparate werden mit flüssigem He II eingefroren. Die eigentliche Lyophilisation geschieht in allen Fällen in einer modifizierten Gefrierätzanlage bei -100°C und in einem Vakuum von ca. 10⁻⁶ Torr.;
- Kritischer-Punkt-Trocknung mit CO₂, mit vorhergehender Entwässerung in Alkohol und Amylacetat;
- Kritischer-Punkt-Trocknung mit N₂O, ohne vorhergehende Entwässerung.

Die getrockneten Präparate werden mit ca. 100 Å Pt oder 250 Å Au bedampft, auf Probenhalter montiert und in einem Cambridge Stereoscan S4 Scanning-EM ausgewertet. Als Kontrollen werden Dünnschnitte nach verschiedenen Präparations-schritten hergestellt und im Transmissions-EM betrachtet.

Die Gefriertrate bestimmt weitgehend die Struktur der lyophilisierten Chromosomen. Einfrieren ohne Gefrierschutz resultiert in einem groben Maschenwerk, vor allem in den Interbanden. Der Nucleolus hat eine relativ glatte Oberfläche; in

Balbiani-Ringen sind die Strukturelemente eher zentrifugal angeordnet. Bei Zugabe von Mg^{2+} erscheinen sie grob gekörnt. Die Dünnschnitt-Kontrolle lässt die Bildung von groben Eiskristallen vermuten. Bei Verwendung von Gefrierschutz oder He II als Gefriermittel, sowie bei Kritischer-Punkt-Trocknung mit CO_2 bleibt die feine fibrilläre Struktur der Balbiani-Ringe besser erhalten (Dünnschnitt). Im SEM wirken sie fein strukturiert, zeigen jedoch weder loops noch Granulen, wie sie vom Dünnschnitt her vermutet werden. Die Chromosomen-Oberfläche ist bucklig-glatt; die fibrilläre Struktur tritt kaum zutage. Dieser Befund wird dadurch erklärt, dass das Fibrillennetz der Chromosomen so feinmaschig ist, dass es von der Bedampfungsschicht zugedeckt wird.

Die Befunde werden mit den beiden meines Wissens einzigen publizierten Arbeiten über SEM an Polytänchromosomen (SCHEID et al. 1972, TROESCH und LINDEMANN 1974) verglichen und eine gewisse Parallelität zu derjenigen von TROESCH und LINDEMANN (1974) festgestellt.

6. LITERATUR

- ANDERSON, T.F. (1951) Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope
Trans. N.Y. Acad. Sci. 13, 130-132
- BEERMANN W. (1954) The submicroscopic structure of the Balbiani ring
Exp. Cell Res. 6, 195-201
- BERENDES, H.D. (1970) Polytene chromosome structure at the submicroscopic level
Chromosoma (Berl.) 29, 118-130
- BORNKAMM, G.W. and J. SONNENBICHLER (1973) The EM structure of nucleoprotein fibrils from metaphase chromosomes treated with salt
Chromosoma (Berl.) 43, 261-268
- BULLIVANT, S. (1973) Freeze-Etching and Freeze-Fracturing in "Advanced Techniques in biological Electron Microscopy" (Ed. J.K. Koehler), Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, 1973
- D'ANGELO, E.G. (1946) Micrurgical studies on Chironomus salivary gland chromosomes
Biol. Bull. 90, 71-87
- FERNANDEZ-MORAN, H. (1964) Low temperature preparation techniques for Electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid Helium II
Ann. N.Y. Acad. Sci. 85, 689-713
- FREY, M. (1974) Methoden zur Isolation von DNS aus Banden von Polytänchromosomen
Diplomarbeit ETH-Z, 1974

Handbook of Chemistry and Physics (Ed. R. WEAST) 49th Edition
The Chemical Rubber Co., 1968

HOLDEREGGER, Ch. (1974) Isolated Giant Chromosomes
in "Principles and Techniques of Scanning Electron
Microscopy", Vol. 3 (Ed. M.A. HAYAT), Van Nostrand
Reinhold Co., New York

KOLLER, Th. et W. BERNHARD (1964) Séchage de tissus au
protoxide d'azote (N_2O) et coupe ultrafine sans matière
d'inclusion
J. de Microscopie 3, (6) 589-606

LEZZI, M. (1967a) RNS- und Proteinsynthese in puffs isolier-
ter Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus
Chromosoma (Berl.) 21, 72-88

- (1967b) Cytochemische Untersuchungen an puffs isolier-
ter Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus
Chromosoma (Berl.) 21, 89-108

- and L.I. GILBERT (1970) Differential effects of Na^+
and K^+ on specific bands of isolated polytene chromo-
somes of C. tentans
J. Cell. Sci. 6, 615-627

PEROV, N.A. and Y.S. CHENTSOV (1971) EM study of polytene
chromosomes in the salivary glands of larvae of C. plu-
mosus
Dokl. Akad. Nauk. USSR 196 (6) 1452-1455

SCHEID, W., H. TRAUT and M. PFAUTSCH (1972) Visualization
by SEM of giant chromosomes of Drosophila melanogaster
D.I.S. March 1972, 48-49

SORSA, M. (1968) The ultrastructure of puffs in the proximal
part of chromosome 3R in Drosophila melanogaster
Ann. Acad. Sci. Fenn., Ser. A 150

- STEVENS, B.J. (1964) The effect of Actinomycin D on
nucleolar and nuclear fine structure in the salivary
gland cells of C. thummi
J. Ultrastruct. Res. 11, 329-353
- and H. SWIFT (1966) RNA transport from nucleus to
cytoplasm in Chironomus salivary glands
J. Cell Biol. 31, 55-77
- TOCZKO, K. and S.M. JAZWINSKI (1971) Modification of
chromatin by trypsin
A. Biochem. Polon. 18, (1) 31-38
- TROESCH, W. and B. LINDEMANN (1974) Giant chromosomes in
the SEM
Micron 4, 370-375

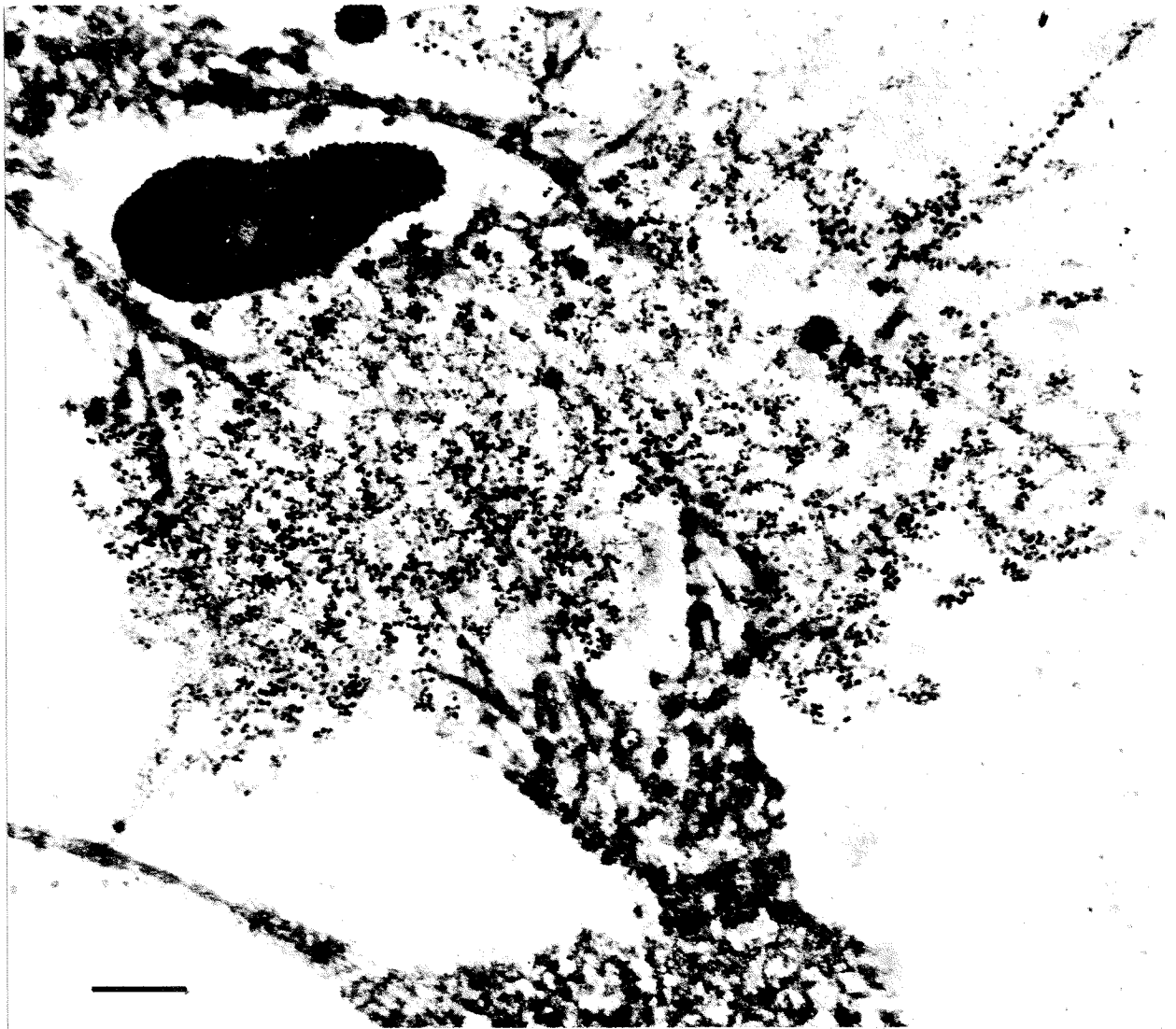


Fig. 1: BR b im IV. Chromosom von C. tentans. Dünnschnitt
Soll-Zustand: Beachte loops, Granulen, Balken = 1 μ

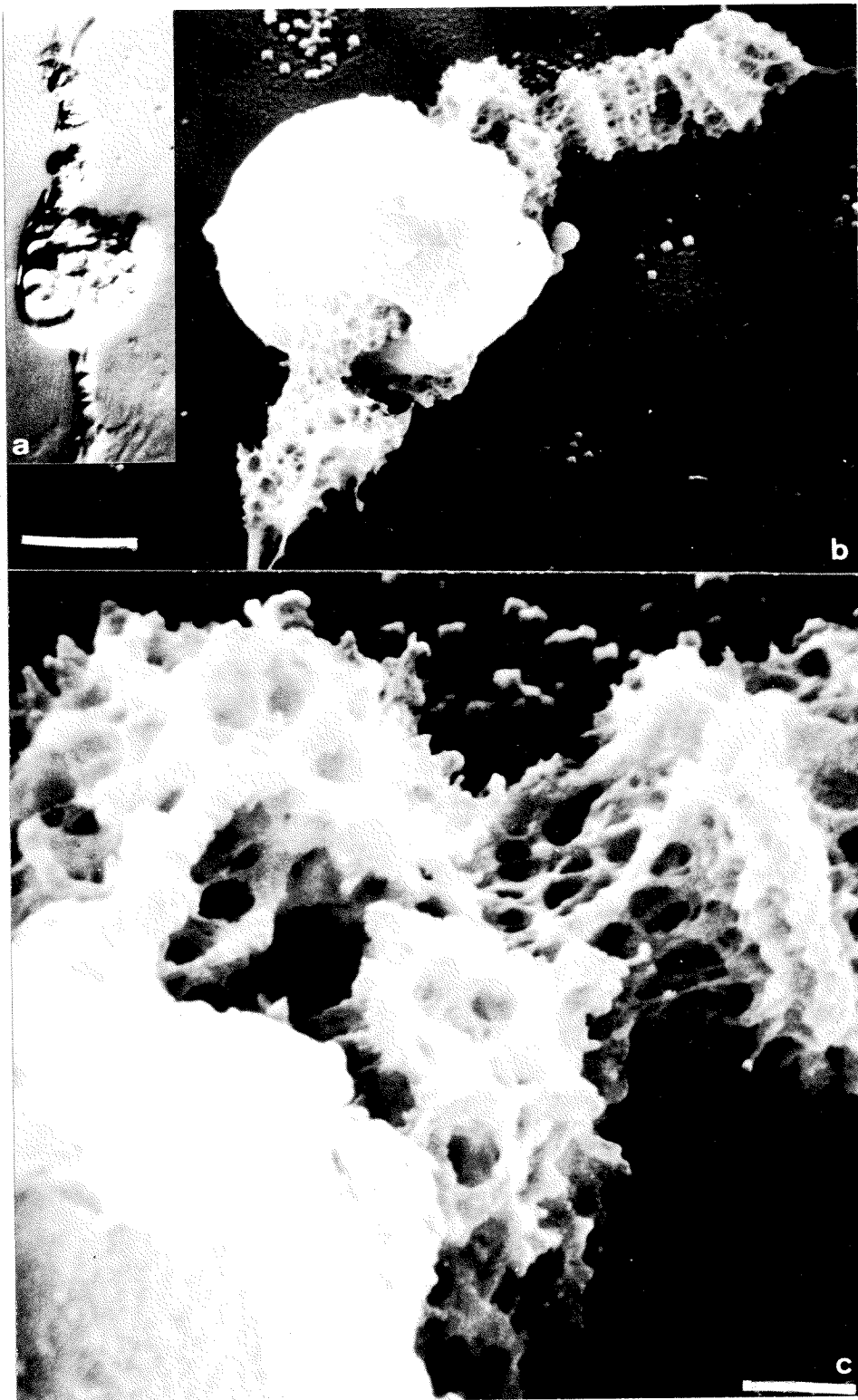


Fig. 2: IV. Chromosom von C. thummi. a. Interferenzkontrast, 1200x. b, c: Methode a). b. SEM Uebersicht, Balken = 5 μ c. Detail BR 2, Balken = 1 μ . Beachte: Oberfläche von Nucleolus, BR, Banden, Interbanden

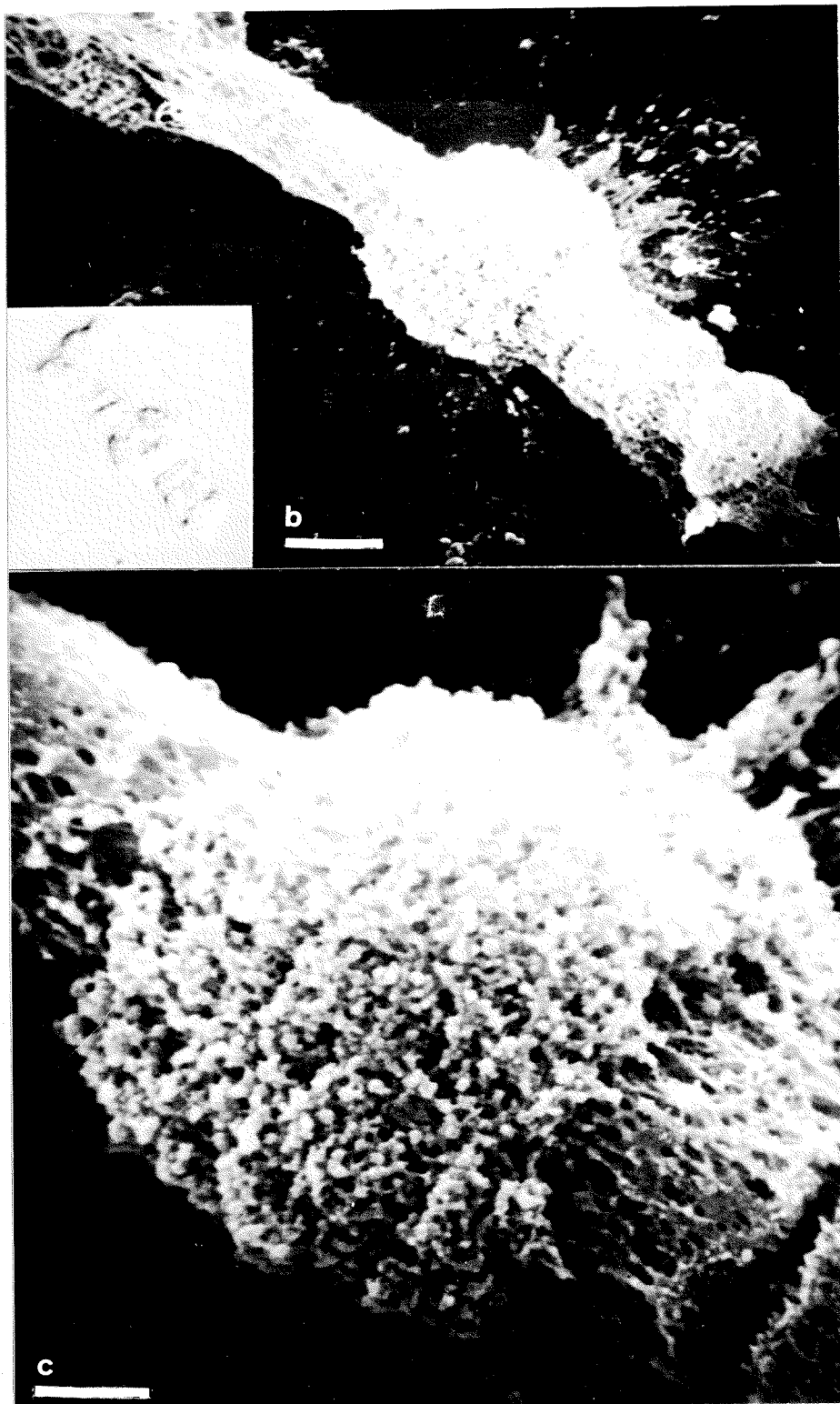


Fig. 3: IV. Chromosom von *C. tentans*, fixiert in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$, a. Interferenzkontrast 1200x. b,c: Methode a). b. SEM Uebersicht, Balken = 5 μ . c. Detail BR b, Balken = 2 μ . Beachte: Granulation des BR, Schwammstruktur des Chromosoms.

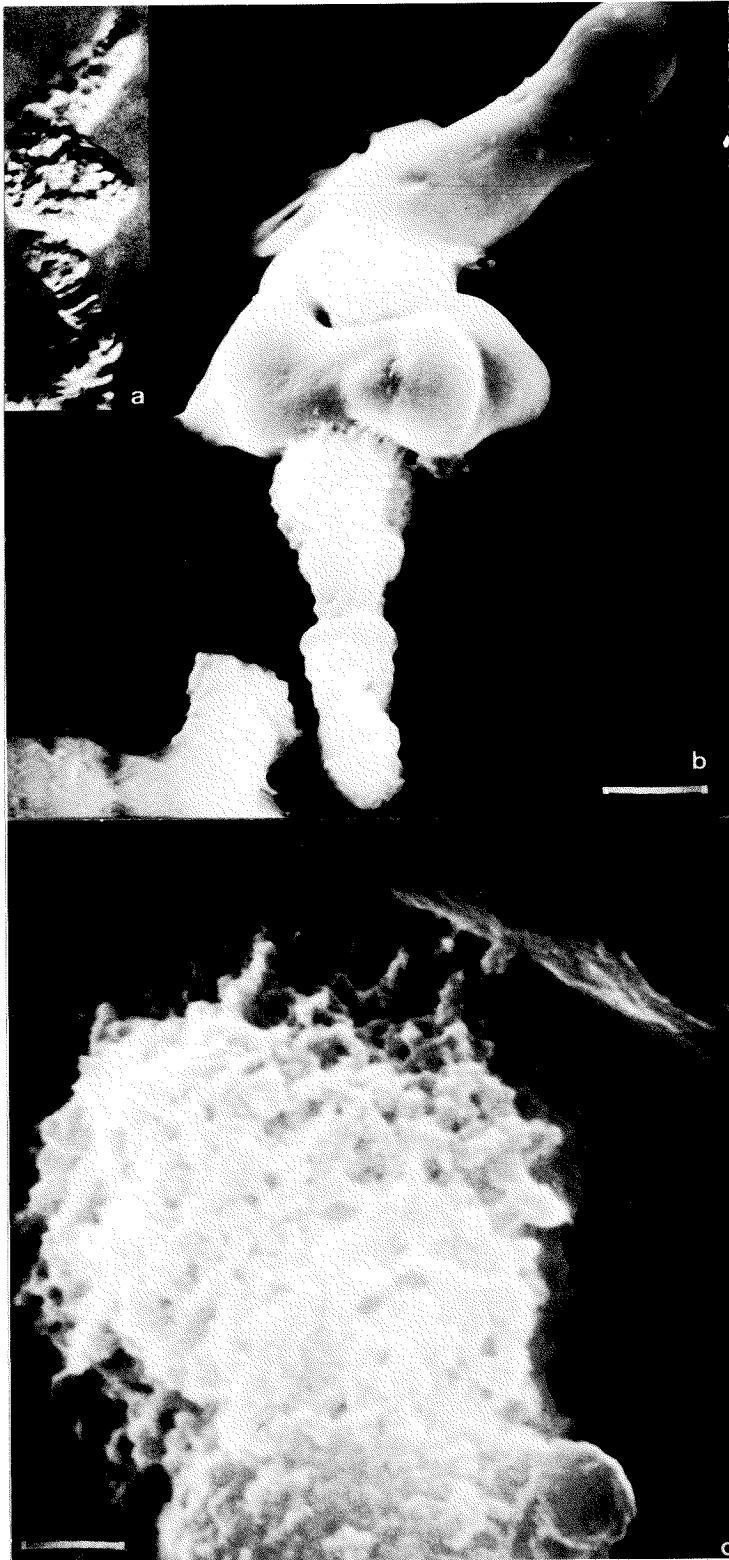


Fig. 4: IV. Chromosom von C. thummi. a. Interferenzkontrast 950x. b,c: Methode a.1). b. SEM Uebersicht, Balken = 5 μ . c. Detail BR 2, Balken = 1 μ . Beachte: Oberfläche von Nucleolus, BR, Chromosom.

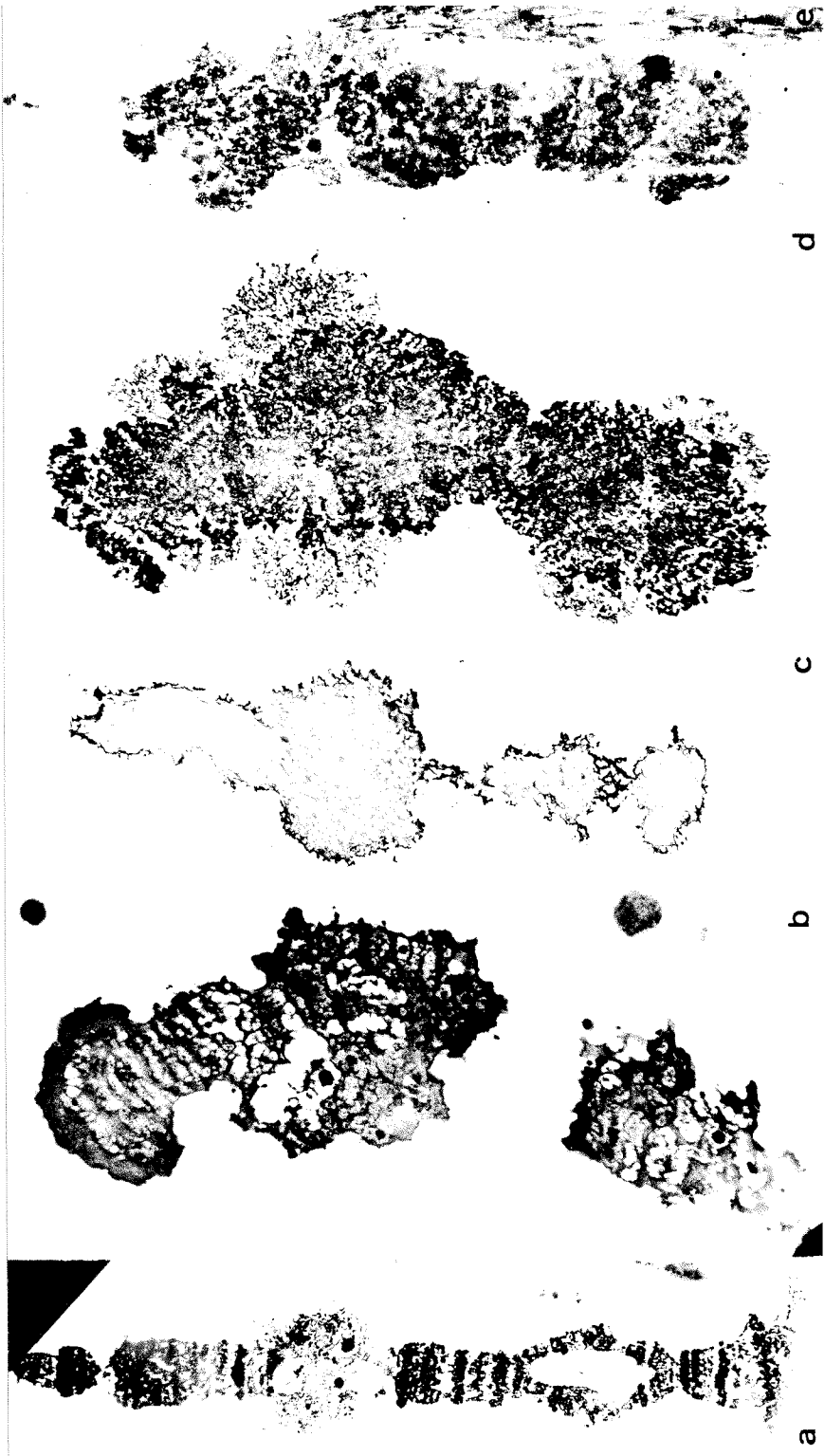


Fig. 5: Kontrollen Dünnschnitt, alle ca. 2000x
a. nach Isolation, b. nach Lyophilisation (Methode a),
c. nach Auswertung im SEM, Methode a), d. nach
Lyophilisation (Methode a.1) e. nach CPD mit CO₂.

2. T E I L

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur von ioneninduzierten Dekondensationen isolierter Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus thummi

INHALT

	Seite
1. Einleitung	31
2. Material und Methoden	33
2.1. Material	33
2.1.1. Medien	33
2.1.2. Apparate	33
2.2. Methoden	34
3. Resultate	35
3.1. Chromosomen bei pH 7.3	35
3.1.1. ganze Chromosomen im LM	35
3.1.2. Dünnschnitte im EM	36
3.1.2.1. Die Region III dl - III dl.1	37
3.1.2.2. Enzymatische Versuche	38
3.2. Versuche bei pH 4.3	39
3.2.1. lichtmikroskopisch	39
3.2.2. EM	41
4. Diskussion	43
4.1. Chromosomen bei pH 7.3	43
4.2. Chromosomen bei pH 4.3	44
4.2.1. Erniedrigung des pH von 7.3 auf 4.3	44
4.2.2. Erhöhung der Ionenstärke bei pH 4.3	45
4.2.3. Vergleich mit physiologischen puffs	46
4.3. Bilanz und Ausblick	48
5. Zusammenfassung	50
6. Literatur	52

1. EINLEITUNG

Ueber Struktur, chemische Zusammensetzung und Funktion von Chromatin ist seit einiger Zeit viel Information zusammengetragen worden. Man weiss, dass die Extraktion von Histon aus Rattenleberchromatin von erhöhter Matrizenaktivität der nunmehr histonfreien DNS begleitet ist (HUANG und BONNER 1962, OHLENBUSCH et al. 1967, ZUEGER 1974). BRASCH et al. (1972) zeigen, dass schrittweise Extraktion von Histon aus Hühnererythrocyten- und -Leberkernen charakteristische Veränderungen der Ultrastruktur hervorruft. Die beobachteten Veränderungen erlauben aber keine Lokalisation der Reaktion, da Chromatin nicht in grössere, wiedererkennbare strukturelle Einheiten gegliedert ist.

Strukturell gegliedertes Chromatin liegt in den Riesenchromosomen von Dipteren, z.B. Chironomus, vor. Deshalb eignen sich diese Chromosomen besonders gut für Modellversuche, in welchen die Lokalisation der Genaktivierungsreaktion von Interesse ist.

Aufgrund von Versuchen an Riesenchromosomen stellt KROEGER (1963) die Ionenhypothese auf: Ionen induzieren spezifisch Genaktivität, die sich bei Riesenchromosomen als puffing manifestiert. LEZZI und GILBERT (1970) zeigen, dass spezifische Stellen auf isolierten Riesenchromosomen von Chironomus selektiv auf Erhöhung der Konzentration von Na^+ oder K^+ mit "fading" reagieren. ROBERT (1971) hat diesen Effekt noch deutlicher gezeigt: Bei pH 4.3 reagieren die Chromosomenloci auf Angebot von Salzlösungen verschiedener Ionenstärken und Zusammensetzungen mit Dekondensationen von noch viel grösserem Ausmass als bei neutralem pH. ZUEGER (1974) bestätigt an Rattenleberchromatin, dass bei Behandlung mit entsprechenden Salzlösungen Histone freigesetzt werden und die Matrizen-

aktivität steigt. In dieser Arbeit sollte versucht werden, den Dekondensationsvorgang an nach ROBERT (1971) behandelten Chromosomen im Elektronenmikroskop zu verfolgen, um eventuell mit der Histonefreisetzung parallellaufende Veränderungen der Ultrastruktur selektiv auf verschiedene Ionen reagierender Chromosomenloci festzustellen. Ausserdem sollten künstlich induzierte Dekondensationen und an der gleichen Stelle auftretende puffs der Normalentwicklung verglichen werden. Im weiteren wurde versucht, folgende Fragen zu beantworten:

- Korrelieren die Veränderungen der Ultrastruktur von ionen-induzierten Dekondensationen mit denjenigen, wie sie z.B. BRASCH et al. (1972) an Chromatin festgestellt haben?
- Woher stammt das Material, das für Dekondensationen von solchen Ausmassen benötigt wird?
- Manifestiert sich der Unterschied zwischen der Spezifität auf Na^+ und derjenigen auf K^+ in der Ultrastruktur?
- Welches ist die Zusammensetzung der beobachteten Stellen hinsichtlich DNS, RNS und Protein vor und nach der Salzbehandlung, und bestehen Unterschiede zu den Stellen, die nicht dekondensieren?

Als Teststellen wurden die Regionen III dl und III dl.1 von C. thummi gewählt, die im Lauf der Normalentwicklung puffs bilden, und die mit K^+ resp. mit Na^+ zum Dekondensieren gebracht werden können (ROBERT 1971).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

Es wurden Speicheldrüsenchromosomen der Larven im 4. Stadium von C. thummi verwendet.

2.1.1. Medien

Als Isolationsmedium diente Glancy's (D'ANGELO 1946) Medium: 60 mM NaCl, 90 mM KCl, 5 mM Phosphatpuffer pH 7.3

Folgende Testmedien wurden verwendet:

a. pH 7.3

"Glancy Mod. I": Glancy's Medium mit Zusatz von 1 mM $MgCl_2$

b. pH 4.3

300 Na/2: 300 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 12.5 mM Veronalpuffer pH 4.3
350 Na/2, 400 Na/2, 450 Na/2 analog.

Gleiche Konzentrationsreihe für KCl anstelle von NaCl.

c. Fixiermedien

Als Fixiermedium wurde das jeweilige Testmedium mit Zusatz von 0.1 % resp. 2.5 % Glutaraldehyd (GA) benützt.

2.1.2. Apparate

Die Chromosomen wurden unter einem Leitz-Stereomikroskop isoliert. Die lichtoptische Auswertung erfolgte auf einem Zeiss Universal-Mikroskop; Aufnahmen wurden mit einer Wild MKa II Fotoautomatik auf Polaroid Typ 107 oder Typ 105 Film gemacht.

Dünnschnitte wurden auf einem LKB Ultratome II hergestellt. Zur elektronenoptischen Auswertung wurde ein Siemens Elmiskop 101 benützt.

2.2. Methoden

Die Präparation für das Transmissions-EM unterscheidet sich von derjenigen für das SEM (s. 1. Teil) in der Weise, dass anstelle des Deckglases ein silikonisierter Objektträger verwendet wurde, auf den mit einem Diamanten ein Feld gezeichnet wurde, in welches die Chromosomen deponiert wurden. Anschliessend wurde der gesamte Objektträger weiterverarbeitet.

Unter dem Mikroskop wurde ein geeignetes Chromosom ausgesucht und fotografiert (40x Wasserimmersions-Objektiv). Sodann wurde mit einer Pipette von der einen Seite her das Isolationsmedium weggesaugt und gleichzeitig von der anderen Seite her das Testmedium unter ständiger Beobachtung im Mikroskop zugefügt. Dieser Vorgang wurde solange ausgeführt, bis sich der Zustand des Chromosoms nicht mehr veränderte. Sodann wurden ca. 3 ml Fixiermedium (0.1 % GA) zugefügt und bis auf einen Tropfen von ca. 0.5 ml abgesaugt. Das Präparat wurde dann fotografiert, numeriert und im Kühlschrank bei 4°C unter dem Deckel einer Deckglasschachtel liegengelassen. Die Präparate, bei denen niedrige Ionenstärken angewandt wurden, wurden so 24 Std. lang fixiert, solche, bei denen hohe Ionenstärken verwendet wurden, jedoch 48 Std.; dann wurde das erste Fixiermedium gegen solches mit 2.5 % GA ausgetauscht und das Präparat für weitere 24 Std. in den Kühlschrank gelegt. - Auf die Differenz der Fixierzeiten komme ich weiter unten (Resultate) noch zurück. - Nach der Fixation wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Aethanol kontinuierlich entwässert: zu den in destilliertes Wasser eingestellten Präparaten wurde unter ständigem Rühren 100 %iger Alkohol eingepumpt und das Gemisch mit der gleichen Pumprate entfernt. Nachdem ca. das vierfache Volumen Aethanol aufgebraucht war, wurden die Präparate in absoluten Alkohol gestellt, dann einzeln mit Alkohol über CuSO_4 gewaschen und

auf dem Objektträger in Epon/Araldit eingebettet. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C über Nacht; anderntags wurden die Blöcke mit flüssigem Stickstoff abgesprengt, um das vorher fotografierte Chromosom die Pyramide getrimmt und auf dem Ultramikrotom mit Glasmessern 600 Å dicke Schnitte hergestellt. Die Bändchen wurden auf 75 mesh Netzchen mit Formvarfilm und Kohleschicht aufgenommen. Kontrastiert wurde mit Uranylacetat (5 %, 10 Min.) und Wismuth-Subnitrat (RIVA 1974). Im Hinblick auf zytochemische Kontrollversuche wurden die Chromosomen auch nach BERNHARD in Butyl/Methyl-Methacrylat eingebettet.

Es wurden folgende Kontroll-Experimente durchgeführt:

Trypsinbehandlung nach BERNHARD.

RNase nach LEDUC et al. (1963) (2 Std.)

EDTA-Methode nach BERNHARD (1969).

Von einigen Präparaten wurden anschliessend an die Dünnschnitte noch 1 µ dicke Schnitte hergestellt, auf Glasobjektträgern mit Orcein/Essigsäure angefärbt und im Lichtmikroskop mit Oelimmersion fotografiert.

Im EM können die Chromosomen anhand der Polaroid-Aufnahmen bei kleiner Vergrößerung leicht wiedererkannt werden.

Als Standardvergrößerung wurde 20'520x gewählt (errechnet aufgrund eines Eichgitters mit 2160 Stegen/mm).

3. RESULTATE

3.1. Chromosomen bei pH 7.3

3.1.1. Ganze Chromosomen im LM

Phasenkontrastaufnahmen mit Wasserimmersion von isolierten Chromosomen zeigten einen überaus starken "Phasenhof", vor allem wenn das Chromosom stark kondensiert war (s. unten).

Deshalb wurde dazu übergegangen, die lichtoptische Kontrolle im Interferenzkontrast (NOMARSKI) durchzuführen. Die reliefartige Erscheinung der Chromosomen darf jedoch nicht als Oberflächenbild interpretiert werden, sondern deutet auf Dichte-Unterschiede hin. Dichte Zonen erscheinen erhaben, weniger dichte evtl. als Einbuchtungen. Banden erscheinen daher als "Berge", Interbanden als "Täler". Mit einiger Übung lässt sich das Bandenmuster der Riesenchromosomen wiedererkennen. (Fig. 1)

1 μ dicke Orcein-gefärbte Plasticschnitte zeigen im Phasenkontrast die Bänderung der Chromosomen sehr schön und reich detailliert.

3.1.2. Dünnschnitte im EM

Das charakteristische Bandenmuster tritt in der Uebersicht schön zutage. Es fällt jedoch auf, dass nicht alle Banden gleich dicht sind (Fig. 2). Es gibt sehr dichte Banden, aber daneben auch relativ lockere und solche, die fast nicht mehr als richtige Banden bezeichnet werden können. Feinste Banden ("Minibands", SORSA 1969) sind kaum zu erkennen. In Interbanden gleicht die Struktur einem relativ lockeren Netzwerk von 150 - 300 Å dicken Fibrillen, das sich in lockeren Banden verdichtet. In dichten Banden ist kein fibrillärer Aufbau mehr zu erkennen, sie scheinen mehr oder weniger homogen fein gekörnt zu sein. - In einigen lockeren Banden ist die fibrilläre Struktur gut erhalten, und meist sind in diesen Banden globuläre Partikel von ca. 500 Å Durchmesser, oft in Agglomeraten, vorhanden. Es wird vermutet, dass es sich dabei um RNP-Partikel handelt.

Durch Isolation oder Inkubation in Mg^{++} -haltigem Medium (Glancy Mod. I) werden die meisten Banden dicht. Auf lange Strecken verfolgbare Stücke von Fibrillen sind selten.

3.1.2.1. Die Region III dl - dl.2

Fig. 3 zeigt eine Uebersicht über die Region. Sämtliche vorhandenen Banden gehören zur Art der lockeren, mit Mg^{++} verdichtbaren Banden. Die Interbanden zeigen ein lockeres, längs orientiertes Maschenwerk aus 250 - 300 Å dicken Fibrillen, die jedoch meist deutlich sichtbar aus 2-3 dünneren Strängen von ca. 150 Å bestehen. Dieses Maschenwerk verdichtet sich, von III c4 her kommend, zu einer ca. 0.05 µ breiten lockeren Bande, die im Falle der Anwesenheit des puffs III dl zahlreiche globuläre Partikel von einem Durchmesser von ca. 500 Å enthält. Nach einer ungefähr ebenso breiten Interbande folgt eine doppelt so breite, markant aus dichtem Maschenwerk bestehende Bande, die mit der lichtmikroskopisch sichtbaren Bande in III dl_g (HAEGELE 1970) identisch ist. Die Fibrillenqualität ist die gleiche wie in den Interbanden, jedoch liegen mehr Längs- und vor allem mehr Querstränge vor. Ganz selten kann man globuläre Partikel finden.

Vom Zentromer aus distal folgt wieder eine schmale Interbande und darauf die z.T. dicht mit Granulen besetzte puff-bildende Region dl.1, die auf eine ganz schmale Bande zurückgehen dürfte. Die Trennbände zur puff-bildenden Region dl.2 ist wiederum schmal (ca. 0.1 µ); der Ursprung des puffs dl.2 selbst ist schwer genau zu bestimmen. Die ganze Stelle besteht aus einem interbandenähnlichen Netzwerk von ca. 500 Å dicken Fibrillenbündeln, die gelegentlich von Granulen besetzt sind. Die erste Bande in d2 endlich ist wieder von der dichten Netzstruktur der dl-Bande.

Bei Zusatz von Mg^{++} (Fig. 4) zum Medium kondensieren alle Banden stark; es ist keine fibrilläre Struktur mehr erkennbar. Einzelne Banden lösen sich im Schnitt in Schollen auf; die Interbanden haben eine gröbere Struktur als ohne Mg^{++} ; sie bestehen jetzt aus weniger, dafür dickeren Strängen, an deren

Verknüpfungspunkten oft kleinere Schollen nicht-fibrillären Materials zu finden sind. Puffs sind von Interbanden auf Grund ihres Gehalts an RNP-Partikel gut zu unterscheiden.

3.1.2.2. Enzymatische Versuche

Die EDTA-Methode nach BERNHARD (1969) ist allein nicht aussagekräftig genug; in Verbindung mit Enzymversuchen kann sie jedoch Hinweise geben. Die Resultate der Verdauungsversuche mit RNase und Trypsin sind nicht eindeutig, doch scheinen sie mit der Erwartung teilweise übereinzustimmen. LEDUC et al. (1963) beschreiben die Versuche an Methacrylat-Schnitten von Geweben. Versuche, isolierte Chromosomen in Methacrylat einzubetten, sind jedoch vor allem bei ionenbehandelten Chromosomen fehlgeschlagen (s. unten). Deshalb wurden sämtliche Kontrollexperimente an Epon-eingebetteten Chromosomen durchgeführt, was wegen der geringen Wasserlöslichkeit des Plastics zu weniger eindeutigen Resultaten führte.

Tabelle 1 gibt Auskunft über die festgestellten Reaktionen:

	Behandlung			
	keine	EDTA	RNase	Trypsin
RNP-Partikel	+	+	-	+-
Banden	+	-	+	+-
Interbanden	+	-	+	+-

Tab. 1. + = Kontrast, - = kein Kontrast.

Die Reaktionen traten gleichermaßen in Gegenwart wie bei Abwesenheit von $MgCl_2$ ein. Vgl. STEVENS und SWIFT (1966)

3.2. Versuche bei pH 4.3

3.2.1. lichtmikroskopisch

Die Reaktion der Chromosomen auf die Medien von pH 4.3 erfolgte in zwei Stufen: zuerst trat der "pH-Effekt" ein, eine starke Kondensation des ganzen Chromosoms. Der Durchmesser verringerte sich auf ca. die Hälfte, und auch in der Länge trat eine Kontraktion ein, die allerdings nur bei solchen Chromosomen sichtbar war, die bloss an wenigen Stellen am Glas klebten. In einer zweiten Phase erfolgte ein differentielles, konzentrationsabhängiges "swelling" (ROBERT 1971), ebenfalls in allen drei Dimensionen. Ich beobachtete speziell die Reaktion der Stellen III dl, dl.1 und dl.2.

Tabelle 2 zeigt die lichtmikroskopisch sichtbaren Effekte in der Region III dl - III dl.2 für KCl (Vgl. Fig. 5):

Konz. mM	III dl — III dl.1	III dl.2
300	erste Anzeichen einer beginnenden Dekondensation	-
350	Beginn der Dekondensation	-
400	deutliche Dekondensation	erste Anzeichen einer beginnenden Dekondensation
450	starke Dekondensation	deutliche Dekond.
500	sehr starke Dekondensation	starke Dekondens.
	Differentialität nicht mehr ausgeprägt	

Tab. 2

Bei der NaCl-Reihe traten dieselben Effekte auf, wobei ein Unterschied zwischen der Wirkung von NaCl und derjenigen von KCl auf III dl.1 bzw. III dl nur in wenigen Fällen vermutet

werden konnte. Die Dekondensation ereignete sich in so starkem Ausmass, dass immer beide Stellen davon erfasst wurden. Die Reaktionen traten gleichermaßen auf, ob die Konzentrationen schrittweise gesteigert wurden, oder ob sogleich das endgültige Testmedium angeboten wurde. Bis ca. 400 mM NaCl oder KCl waren sie reversibel: wenn nach Angebot eines Testmediums Glancy-Medium zugegeben wurde, verschwand das differentielle swelling wieder, wobei jedoch das Chromosom am Ende eher "verklebt" aussah.

Na⁺- oder K⁺-Konzentrationen unter 300 mM erzeugten eine so starke Kondensation der Chromosomen, dass eine sinnvolle Auswertung unmöglich wurde. Ueber 450 mM setzte eine allgemeine Dekondensation ein, die oberhalb 550 mM nur noch einzelne starke Banden unberührt liess. Deshalb beschränkt sich diese Untersuchung auf den Bereich zwischen 300 und 450 mM, in dem die Reaktionen effektiv differentiell waren.

Die Fixation besonders derjenigen Chromosomen, die Ionenstärken von über 350 mM ausgesetzt worden waren, bereitete einige Schwierigkeiten. Wurde 2.5 % GA im Testmedium während 30 Minuten angewandt, so quollen die Chromosomen bei anschliessendem Waschen mit Wasser bis zur Unsichtbarkeit auf. Wurde die Fixationszeit auf 12 Stunden im Kühlschrank ausgedehnt, so ergab sich eine Schrumpfung von mindestens 20 % bereits im Fixationsmedium. Ebenfalls eine sehr deutliche Schrumpfung trat bei Angebot von Uranylacetat oder Osmiumtetroxid ein. Dies führte dazu, dass eine möglichst schonende und dennoch gründliche Fixation entwickelt werden musste. 0.1 % GA bei 4°C während 2 Tagen, gefolgt von 2.5 % GA während 1 Tag erwies sich als geeignet; doch konnte eine leichte Schrumpfung trotz allem nicht vermieden werden.

3.2.2. EM

Die Ultrastruktur von Chromosomen, die bei tiefem pH mit Ionen behandelt worden waren, unterschied sich grundsätzlich von derjenigen bei pH 7.3. Die Bänderung, die im Lichtmikroskop noch durchaus vergleichbar war mit derjenigen bei neutralem pH, war im Dünnschnitt nicht mehr zu finden. Bei 300 mM Na⁺ oder K⁺ (Fig. 6) bestand das ganze Chromosom aus einer kompakten Masse, die durch Löcher und dichtere Stellen die frühere Struktur von Interbanden und dicken Banden erahnen liess. Ein fibrillärer Aufbau war höchstens noch in dünn angeschnittenen Interbanden zu vermuten. Die Banden manifestierten sich durch Reihen von dunkleren Punkten von unregelmässigem Durchmesser; sie waren oft auch viel schmäler als im nativen Zustand: die Bande in III dlg z.B. war auf ca. 0.03 μ vermindert. Die Stellen, an welchen bei höheren Ionenstärken Dekondensationen auftraten, hatten aber schon einen deutlich grösseren Durchmesser als Banden oder Interbanden; ein Anzeichen von Auflösung in einzelne Strukturelemente war höchstens die gelegentlich auftretende leichte Körnung. Wurde die Konzentration von Na⁺ oder K⁺ auf 350 mM erhöht, (Fig. 7) so wurden an prospektiven Dekondensationsstellen die ersten deutlichen Zeichen einer Auflösung in kleinere Struktureinheiten ersichtlich. Die Erscheinung war nicht mehr amorph, sondern deutlich fein gekörnt. Bei Steigerung der Elektrolytkonzentration auf 400 mM konnten bereits an einigen Stellen feine Fibrillen vom Durchmesser von ca. 250 - 300 Å erkannt werden (Fig. 8). Das ganze Chromosom mit Ausnahme der Banden-"Reste" bestand nun aus einem sehr dichten Netz von offenbar zufällig orientierten Fibrillen. Regionen prospektiver ionenspezifischer Schwellungen hatten einen grösseren Durchmesser und waren länger als ursprünglich gleichgrosse Banden oder Interbanden. 450 mM Na⁺ oder K⁺ bewirkten

eine noch weitergehende Dekondensation (Fig. 9/10). Es lagen nun zufällig orientierte Fibrillen vor, die gelegentlich eine Längsorientierung bevorzugten. Die ehemals dichten Banden bestanden noch aus einer Zone mit elektronendichten Konglomeraten von ca. 1000 Å im Durchmesser, die sich jedoch stellenweise in Fibrillen aufzulösen scheinen.

Es fehlte irgendeine Struktur, die eine bestimmte Bande als Ursprung der ionenspezifischen Dekondensation hätte erscheinen lassen. Die ganze Region III dl - III dl.1 reagierte auf die Ionenbehandlung. Dieser Umstand verunmöglicht auch praktisch die Unterscheidung zwischen Na⁺- und K⁺-spezifischen Anschwellungen. Die Stelle auf dem Chromosom war auch nur mit einiger Erfahrung und durch gründlichen Vergleich mit der lichtmikroskopischen Aufnahme aufzufinden.

Ioneninduzierte puffs unterschieden sich von Interbanden, die ebenfalls eine aufgelockerte Struktur aufwiesen, durch ihr etwas dichteres Netzwerk. In Interbanden waren relativ mehr längsorientierte Fibrillen anzutreffen.

In keinem Präparat konnten globuläre Strukturen gefunden werden, die Ähnlichkeit mit RNP-Partikeln in nativen Chromosomen aufwiesen. Bei Anwendung der EDTA-Methode (BERNHARD 1969) wurde erwartungsgemäss das ganze Netzwerk kontrastlos, einschliesslich der dichten Konglomerate in den "Banden". Durch RNase-Verdauung konnte der Kontrast bei normaler Anfärbung mit Uranylacetat und Wismuth-Subnitrat nicht abgeschwächt werden; ebenfalls trat kein bedeutender Kontrastverlust ein bei Trypsinverdauung. - Diese Befunde sind jedoch, wie schon weiter oben erwähnt, höchstens als Hinweise zu werten, da normalerweise für enzymatische Versuche Methacrylat-Schnitte verwendet werden. In Methacrylat-Schnitten zeigten die Chromosomen jedoch eine andere Struktur als in Epon/Araldit geschnittene Chromosomen; das Netzwerk sah "verklebt" aus. Um jedoch bei allen Versuchen vom gleichen Strukturbild ausgehen zu können, war es also angezeigt, auch für die Enzym-

versuche Epon/Araldit-Schnitte zu verwenden, obwohl bekannt ist, dass in diesem Plastic wegen seiner geringen Durchdringbarkeit für wässrige Medien enzymatische Verdauungen schlechter funktionieren als in Methacrylat.

4. DISKUSSION

4.1. Chromosomen bei pH 7.3

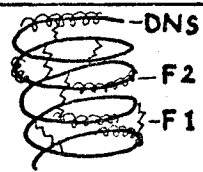
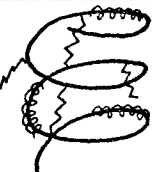
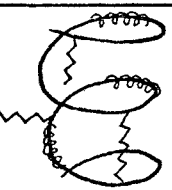
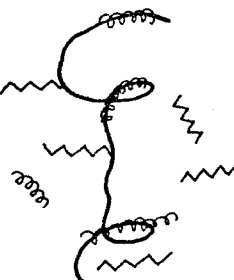
Isolierte Chromosomen zeigen in einem Medium, das keine zweiwertigen Kationen enthält (Glancy-Medium) schon im Lichtmikroskop ein anderes Bild als solche, die z.B. in Gegenwart von Mg^{2+} präpariert wurden: Die Struktur sieht lockerer aus, Banden scheinen weniger scharf gegen Interbanden abgegrenzt zu sein. Im EM bestätigt sich dieses Bild (Fig. 2): Die meisten Banden bestehen aus einem mehr oder weniger dichten Netzwerk von Fibrillen, die aus den Interbanden herauskommen. Einige Banden sind sehr dicht. Wenn die Chromosomen einem Mg^{2+} -haltigen Medium ausgesetzt werden, verdichten sich noch weitere Banden und es entsteht das Bild eines Chromosoms, ähnlich demjenigen, das z.B. PEROV und CHENTSOV (1971) oder SORSA (1969) zeigen, wobei jedoch im vorliegenden Präparat das Chromosom viel schöner dargestellt wird, da weder Kernsaft noch Zellbestandteile einen störenden Hintergrund verursachen. Ich glaube also sagen zu können, dass durch den Vorgang der Isolation die Chromosomen in ihrer Struktur bei pH 7.3 nicht wesentlich verändert werden. Die Abwesenheit von zweiwertigen Kationen erwies sich für die Isolation als vorteilhaft, da sonst Sekret und Plasma zähflüssig wurden, das Chromosom bedeckten und auch durch ein gründliches Waschen nicht mehr entfernt werden konnten.

4.2. Chromosomen bei pH 4.3

Die meisten Versuche in dieser Arbeit wurden mit der KCl-Konzentrationsreihe gemacht. K^+ wirkt auf die Stelle III dl (ROBERT 1971), die während der Normalentwicklung nur in Gegenwart von Ecdyson kurz vor und während der Häutung "gepufft" ist, während die Na^+ -empfindliche Stelle III dl.1 in Gegenwart von Juvenilhormon während fast des ganzen Larvenstadiums einen mehr oder weniger starken puff bildet (CLEVER 1962). Daher wurden vorwiegend junge Tiere verwendet, deren puff III dl sicher abwesend ist; durch diese Selektion konnte die Möglichkeit verringert werden, mit Ionenwirkung einen präexistierenden puff zu vergrössern. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass bei jungen Tieren der puff III dl.1 bereits vorhanden ist, und dass deshalb keine Aussagen bezüglich der Spezifität der Na^+ - und K^+ -Effekte auf diese Region gemacht werden können. Die im Laufe der Dekondensation auftretenden Strukturveränderungen entsprechen den Erwartungen:

4.2.1. Erniedrigung des pH von 7.3 auf 4.3: die freien Carboxylgruppen der Aminosäuren werden neutralisiert, die sauren Proteine befinden sich in der Nähe ihres isoelektrischen Punktes, die Hydratation verschwindet: die Chromosomen kontrahieren sich. Im Lichtmikroskop ist diese maximale Kontraktion sichtbar, begleitet vom Verlust einer deutlichen Gliederung in Banden und Interbanden. Im EM stellt sich diese kontrahierte Struktur als undifferenzierte Masse dar; das bandenförmig auftretende elektronendichte Material ist nicht näher charakterisiert worden; es könnte sich dabei tatsächlich um Banden handeln, deren Protein verklumpt ist, oder aber um puffs, deren RNP-Partikel aggregiert sind.

4.2.2. Erhöhung der Ionenstärke bei pH 4.3: die Bindungen zwischen DNS und Proteinen werden gelockert; durch Freiwerden der Phosphatgruppen der DNS entstehen zunehmend negative Ladungen im Ueberschuss. Dies führt schliesslich zur Dekondensation. Tabelle 3 soll in Anlehnung an ROBERT (1971) die bei der Dekondensation sich abspielenden Veränderungen der Ultrastruktur schematisieren:

Konzentration	Zustand des DNP	Kommentar
300 mM Na ⁺ oder K ⁺		EM: homogene Erscheinung
350 mM Na ⁺ oder K ⁺		Ablösung der Histone beginnt. Fibrilläre Struktur wird sichtbar
400 mM Na ⁺ oder K ⁺		Weitere Ablösung der Histone. Das Netzwerk wird lockerer.
450 mM Na ⁺ oder K ⁺		Histon F1 ist zum grössten Teil abgelöst. Andere Histone beginnen sich zu lockern. Die Maschen des Netzes werden weiter.

Tab. 3

Diese Erscheinungsbilder decken sich ziemlich genau mit den Befunden von BRASCH et al. (1972): Bei schrittweiser Dissoziation von Histonen geschieht eine graduelle Dekondensation des Chromatins. Meine Befunde lassen sich vor allem mit den Bildern von Erythrocytenkernen vergleichen. Die einzelnen

Dekondensationsstufen entsprechen sich, obwohl die genannten Autoren die Histone durch Senkung des pH allein entfernt haben. Die Dichte des Netzwerks und die Fibrillenqualität sind gleich. Die beobachtete Reversibilität bei Ionenstärken bis ca. 400 mM NaCl oder KCl ist aufgrund des obigen Schemas verständlich: Bis zu dieser Ionenstärke ist noch fast kein Histon wirklich aus dem DNP-Komplex herausgelöst; wenn nun die Ionenstärke wieder gesenkt und der pH erhöht wird, können lockere Bindungen wieder gefestigt, eventuell auch neue geknüpft werden, da noch die nötigen Bestandteile des Komplexes in genügender Menge vorhanden sind.

4.2.3. Vergleich mit physiologischen puffs: Es stellt sich die Frage, weshalb bei pH 4.3 die Dekondensation erst bei einer Ionenstärke von 300 mM beginnt. Nach ZUEGER (1974) dissoziiert Histon Fl bei dieser Ionenstärke von Chromatin. Es ist also anzunehmen, dass die Dekondensation eine Folge der Ablösung von Histon Fl ist. Als nächste Frage muss gestellt werden: entstehen natürliche puffs ebenfalls durch Ablösung von Histon Fl? Es ist schwierig, hierauf eine Antwort zu geben. Das Problem liegt darin, dass im Zellkern erstens der pH höher ist als 4.3, und dass zweitens die Ionenstärke sicher unter 300 mM liegt. LEZZI und GILBERT (1970) haben an isolierten Chromosomen bei 150 mM und physiologischem pH eine Dekondensation erreicht; ob diese jedoch von Dissoziation von Histon begleitet ist, wurde nicht untersucht. Diese Möglichkeit ist aber mit Blick auf die Reversibilität der Reaktion eher auszuschliessen (s. oben).

Es ergeben sich nun folgende Schlüsse:

1. Ioneninduzierte Dekondensationen und natürliche puffs haben nichts Gemeinsames. Die beiden Anschwellungen entstehen durch verschiedene Mechanismen und können nicht verglichen werden.

2. Sowohl bei natürlichen wie bei ioneninduzierten Dekondensationen bei neutralem pH wird Histon nur teilweise dissoziiert. Die bei tiefem pH erreichbare Situation, dass die eine oder andere Histonfraktion quantitativ extrahiert wird, tritt gar nie auf. Bei tiefem pH deckt sich die Phase der teilweisen Dissoziation mit derjenigen des Verbackens der Struktur und ist deshalb nicht sichtbar. Die Dekondensation und das Freiwerden von Histonen wären damit die Fortsetzung eines Vorganges, der schon bei niedriger Ionenstärke eingesetzt hat.

Eine Erklärung für die grosse Ausdehnung der Dekondensation bei 450 mM Na⁺ oder K⁺ wäre aufgrund der Versuche von JONES und BEER (1970) an gespreitetem Kalbsthymuschromatin möglich. Frisch isolierte Chromatinfibrillen haben nach ihren Angaben 250 Å Durchmesser. Bei Erhöhung der Salzkonzentration in der Hypophase wird der Anteil an 100 Å messenden Fibrillensegmenten grösser, begleitet von einer Elongation der einzelnen Fäden. Weitere Erhöhung der Salzkonzentration bewirkt nochmals Verlängerung und Abnahme des Durchmessers auf 35 Å. Die Umwandlung einer 250 Å-Fibrille in eine 35 Å-Fibrille ist von einer Verlängerung um das 20 - 30fache begleitet. - Wenn nun im nativen Chromosom in Banden Fibrillen von 250 Å oder 100 Å vorliegen, die bei Salzbehandlung in mehrheitlich 100 Å oder 35 Å dicke umgewandelt würden, so wäre verständlich, dass das daraus entstehende Netzwerk beträchtliche Dimensionen annehmen kann.

Wegen der enormen Ausdehnung der dekondensierten Stellen kann nicht mit Gewissheit eine lokale Spezifität der Reaktion erkannt werden. Unter den in dieser Arbeit angewandten Bedingungen ist es unmöglich, den Entstehungsort einer durch Na⁺ erzeugten Dekondensation von demjenigen einer durch K⁺ hervorgerufenen zu unterscheiden. Die beiden Stellen, die nach LEZZI und GILBERT (1970) bei physiologischem pH spezifisch

auf die beiden Ionen reagieren, liegen nämlich sehr nahe beieinander. Das führt dazu, dass immer beide Stellen von der Dekondensation erfasst werden und deshalb nicht mehr auseinandergehalten werden können. Dabei könnte das Fehlen von Mg^{2+} im Medium, sowie die Gegenwart von puff III dl.1 eine Rolle spielen. Diese Beobachtungen erlauben keine Aussagen bezüglich einer ionalen Spezifität der dekondensierten Stellen. Ein weiterer Unterschied zu in vivo puffs besteht im Fehlen von RNP-Partikeln. Aus der Versuchsanordnung sind solche jedoch nicht zu erwarten, da weder RNS-Vorläufer noch Polymerase beigegeben wurden. Hingegen stellt sich die Frage, ob die dichten "Bandenreste" eventuell Ueberbleibsel von RNP-Partikeln und/oder puff-Proteinen von in vivo entstandenen puffs sind. Die Ergebnisse der Versuche mit der EDTA-Methode lassen ersteres eher unwahrscheinlich erscheinen; letzteres wäre möglich, wenn ein Mechanismus der Dekondensation angenommen würde, bei dem die Banden von der Mitte her nach der einen oder andern Seite oder beidseitig aufgelockert werden, wobei das aggregierte puff-Protein zur Seite gedrückt würde. puff-Protein ist nach LEZZI (1967b) zumindest in Gegenwart von Mg^{2+} mit Trypsin schwer zu verdauen, was die zweideutigen Resultate der enzymatischen Versuche wenigstens teilweise erklärt. Ein solcher Mechanismus ist somit weder ausgeschlossen noch bestätigt.

4.3. Bilanz und Ausblick

Diese Arbeit bestätigt am Modell von unter schonenden Bedingungen isolierten Polytänchromosomen Beobachtungen, die schon an isoliertem Interphasechromatin in analogen Versuchen gemacht wurden. Was das Verhalten bei schrittweiser Histonablösung betrifft, dürften Polytänchromosomen und Interphasechromatin gleichgesetzt werden, denn beide zeigen

dabei eine graduelle Dekondensation ihrer Ultrastruktur. Bei den Polytänochrosomen tritt dabei die Differentialität zutage, d.h. es gibt neben Stellen, die auf Behandlung mit einem bestimmten Ion reagieren, auch solche, die nicht de-kondensieren. Dies ist ein Befund, der bei Chromatin nicht möglich ist.

In dieser Arbeit wird hingegen keine Aussage über die Spezifität einzelner Stellen für ein bestimmtes Ion gemacht; aufgrund der gewählten Bedingungen ist eine solche nicht möglich. Der Entstehungsort einer Na^+ -bedingten Dekondensation ist nicht von demjenigen einer K^+ -bedingten zu unterscheiden, da die beiden angesprochenen Stellen zu nahe beieinander liegen. Eine unterschiedliche Ultrastruktur ist nicht zu erwarten. Mg^{2+} scheint eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen, und schliesslich schafft die nicht kontrollierbare Kontraktion der Chromosomen bei Senkung des pH zusätzliche Unklarheiten.

Es kann anhand der Bilder auch keine eindeutige Aussage über die Fibrillenqualität gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine solche auch nicht unbedingt nötig, da die Qualität des Netzwerks genügend aufschlussreich ist.

Um diese Arbeit sinnvoll fortsetzen zu können, müssten mindestens folgende Bedingungen erfüllt werden:

1. müssten zwei weit auseinanderliegende Stellen auf dem Chromosom für die Versuche gewählt werden, um Verwechslungen von vornherein auszuschliessen.
2. müssten Bedingungen geschaffen werden, die die starke Kontraktion bei der Senkung des pH verhindern.
3. sollten Möglichkeiten bestehen, vor allem den Anfang der Dekondensation genauer und mit besserer Auflösung zu verfolgen.
4. müsste Mg^{2+} in die Untersuchung miteinbezogen werden.

Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, glaube ich, sollte man auch der Lösung des Problems der Spezifität und der genauen Lokalisation einen Schritt näher kommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Ultrastruktur von ioneninduzierten Veränderungen isolierter Polytänchromosomen von C. thummi untersucht. Die dabei festgestellten Vorgänge werden mit den Ergebnissen analoger Versuche an Chromatin verglichen. Es wird versucht, in der Ultrastruktur einen Hinweis auf die Spezifität der Reaktion zu finden.

a) Chromosomen werden aus den Speicheldrüsenkernen einzeln von Hand in Glancy-Medium isoliert. Als Kontrolle des Ausgangsmaterials werden nach Fixation in 0.1 % und 2.5 % Glutaraldehyd in Glancy-Medium die Chromosomen entwässert, in Epon/Araldit eingebettet und dünn geschnitten. Das gleiche Experiment wird in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$ wiederholt.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen vermuten, dass die Chromosomen durch den Isolationsvorgang nicht wesentlich geschädigt werden.

b) Die isolierten Chromosomen werden einer Reihe von Medien ausgesetzt, die bei pH 4.3 Konzentrationen von NaCl resp. KCl zwischen 300 mM und 450 mM nebst 2 mM $CaCl_2$ enthalten. Dabei entsteht nach anfänglicher, pH-bedingter starker Kontraktion, eine sukzessive Auflockerung bestimmter Stellen auf dem Chromosom. Die Qualität dieser Auflockerung wird mit der Lockerung der Struktur von Chromatin nach Histonextraktion in Hühner-Erythrocyten- und Leberkernen (BRASCH et al. 1972) verglichen und weitgehende Übereinstimmung festgestellt. Ferner werden die im EM sichtbaren Strukturveränderungen mit Experimenten von ZUEGER (1974) verglichen, der an Rattenleberchromatin unter ähnlichen Salzbedingungen das Ablösungsverhalten von Histon und die Matrizenaktivität untersucht hat. Die Resultate dieser Arbeit korrelieren gut mit ZUEGERS Befunden, indem sie

die Ablösung von Histon in Form von Dekondensation widerspiegeln.

Aufgrund der Versuche von JONES und BEER (1970) wird versucht, die enorme Ausdehnung der ionenspezifischen Dekondensationen zu erklären. Ueber die ionale Spezifität der Reaktion kann keine Aussage gemacht werden, Es werden Bedingungen genannt, die erfüllt werden müssten, um eine Spezifität im EM eventuell nachweisen zu können.

6. LITERATUR

BERNHARD, W.: Techniques de microscopie electronique employées au service de microscopie electronique, Institut de Recherches sur le Cancer, Villejuif (Seine).

Internes Laborhandbuch

- (1969): A new staining procedure for electron microscope cytology

J. Ultrastruct. Res. 27, 250-265

BRASCH, K., G. SETTERFIELD and J.M. NEELIN (1972): Effects of sequential extraction of histone proteins on structural organization of avian erythrocyte and liver nuclei

Exp. Cell Res. 74, 27-41

CLEVER, U. (1962): Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von Chironomus tentans und ihre Beziehungen zur Entwicklung. II. Das Verhalten der puffs während des letzten Larvenstadiums und der Puppenhäutung

Chromosoma (Berl.) 13, 385

D'ANGELO, E.G. (1946): Micrurgical studies on Chironomus salivary gland chromosomes

Biol. Bull. 90, 71-87

HAEGELE, K. (1970): DNS-Replikationsmuster der Speicheldrüsenchromosomen von Chironomiden

Chromosoma (Berl.) 31, 91-138

HUANG, R.C. and J. BONNER (1962): Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis

Proc. Natl. Acad. Sci. 48, 1216-1222

JONES, J.L. and M. BEER (1970): The structure of chromatin
28th Ann. Proc. EMSA

- KROEGER, H. (1963): Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells
Nature 200, 1234-1235
- LEDUC, E., V. MARINOZZI and W. BERNHARD (1963): The use of water-soluble glycol methacrylate in ultrastructural cytochemistry
J. Roy. Microsc. Soc. 81, 119-130
- LEZZI, M. (1967b): Cytochemische Untersuchungen an puffs isolierter Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomus
Chromosoma (Berl.) 21, 89-108
- and L.I. GILBERT (1970): Differential effects of K^+ and Na^+ on specific bands of isolated polytene chromosomes of Chironomus tentans
J. Cell Sci. 6, 615-627
- OHLENBUSCH, H.H., B.M. OLIVERA, D. TUAN and N. DAVIDSON (1966): Selective dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein
J. Mol. Biol. 40, 117-136
- PEROV, N.A. and Yu. S. CHENTSOV (1971): Electron microscope study of polytene chromosomes in the salivary glands of larvae of Chironomus plumosus
Dokl. Akad. Nauk. USSR 6, 1452-1455
- RIVA, A. (1974): A simple and rapid staining method for enhancing the contrast of tissues previously treated with uranyl acetate
J. Microscopie 19, 105-108
- ROBERT, M. (1971): Einfluss von Ionenstärke und pH auf die differentielle Dekondensation der Nukleoproteide isolierter Speicheldrüsen-Zellkerne und -Chromosomen von Chironomus thummi
Chromosoma (Berl.) 36, 1-33

SORSA, M. (1969): Ultrastructure of the polytene chromosomes
in Drosophila melanogaster

Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A. 151

STEVENS, B.J. and H. SWIFT (1966): RNA Transport from nucleus
to cytoplasm in Chironomus salivary glands

J. Cell Biol. 31, 55-77

ZUEGER, P.E. (1974): Schrittweise Freisetzung der Histone
von Rattenleber-Chromatin durch Salzlösungen unter-
schiedlicher Zusammensetzung und Konzentration.

Auswirkungen auf die Matrizenaktivität

Dissertation ETH Zürich

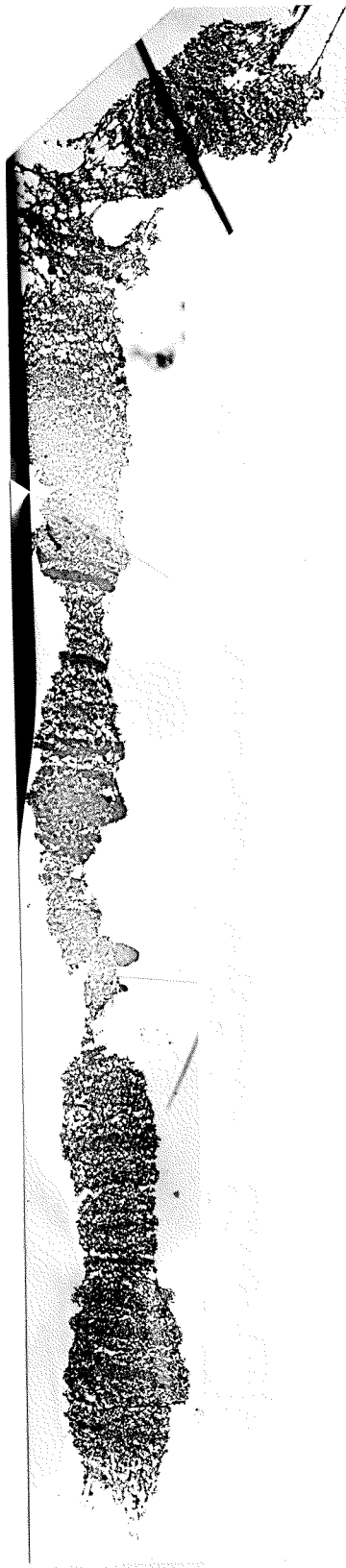


a

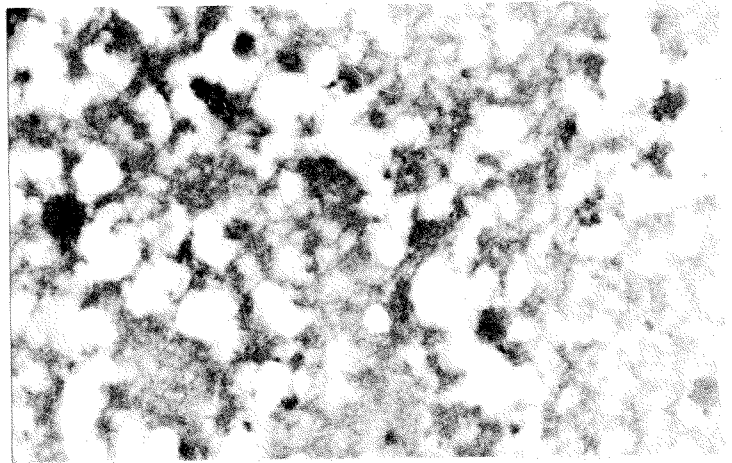
b

Fig. 1: Vergleich im Lichtmikroskop: a. Phasenkontrast,
b. Interferenzkontrast 2500x

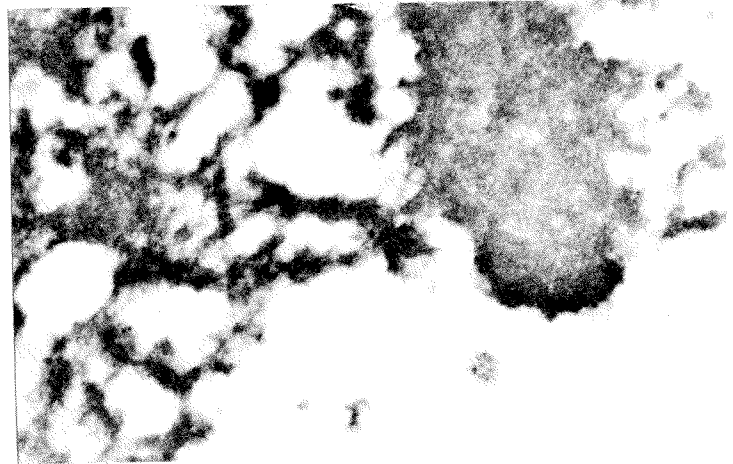
Fig. 2: Darstellung im Elektronenmikroskop. Längsgeschnittenes Chromosom II von C. thummi, isoliert und fixiert in Glancy-Medium. a. Uebersicht, 2320x. b. Ausschnitt, lockere Bande. c. Ausschnitt, dichte Bande. d. Zwischenstadium, näher bei b. e. Zwischenstadium, näher bei c. b - e 34200x



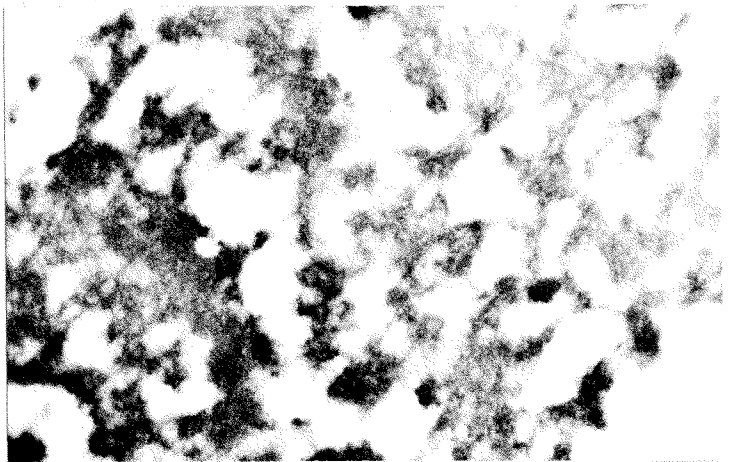
a



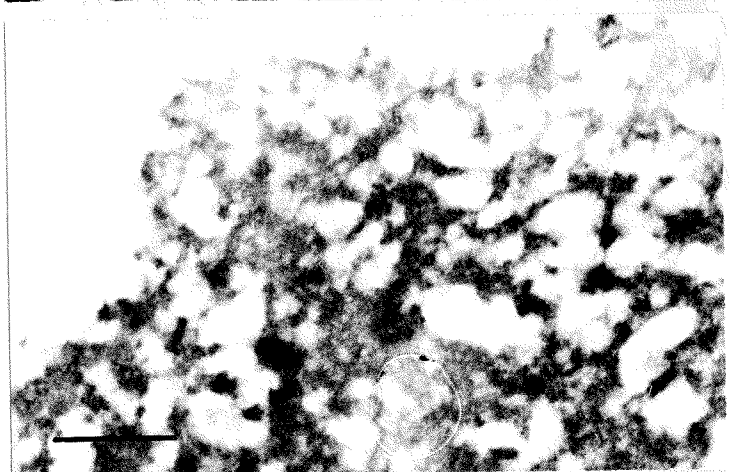
b



c



d



e

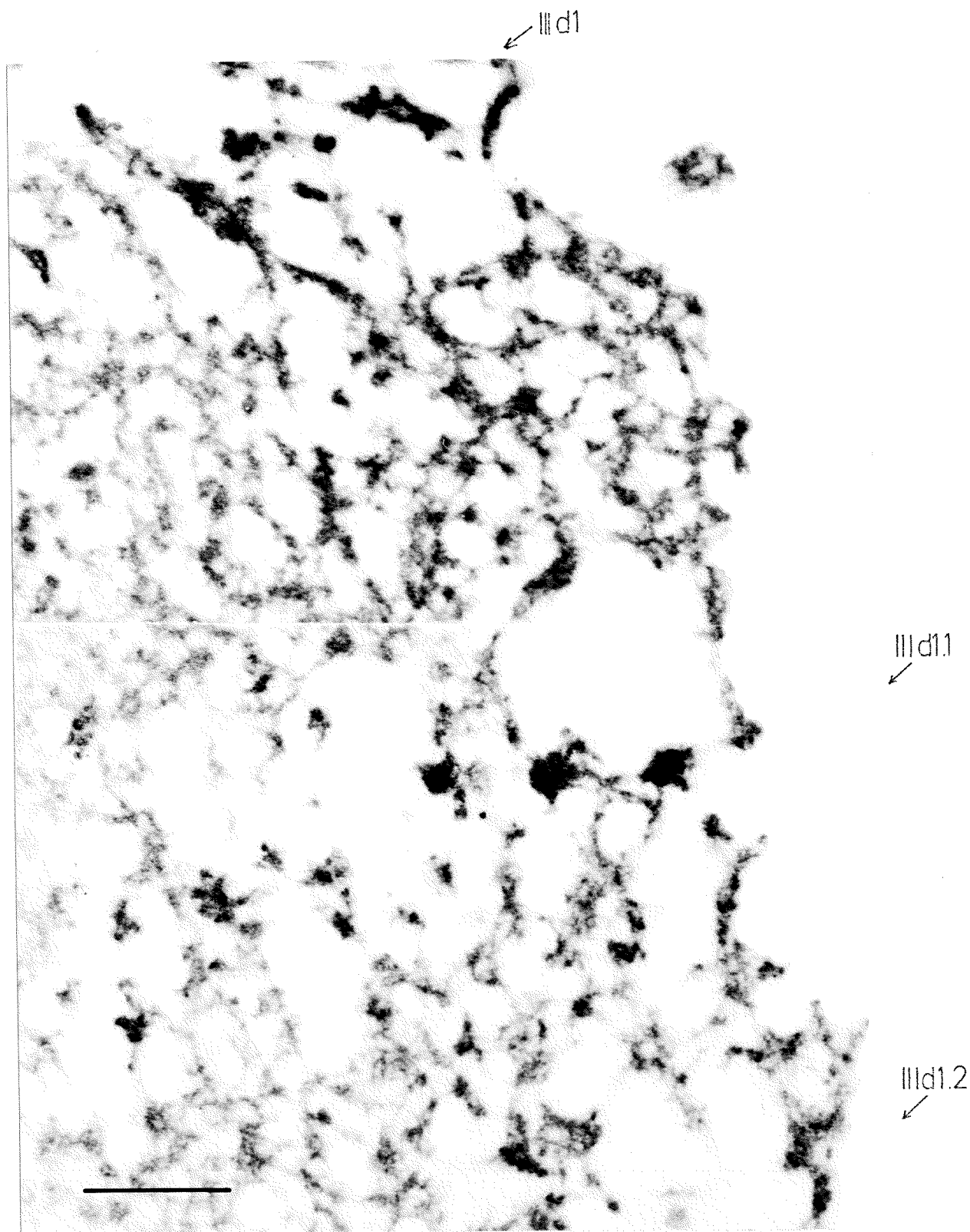


Fig. 3: Uebersicht über die Region III d1 - III d1.2.
Strecke = 0.5 μ . Erklärung siehe Text

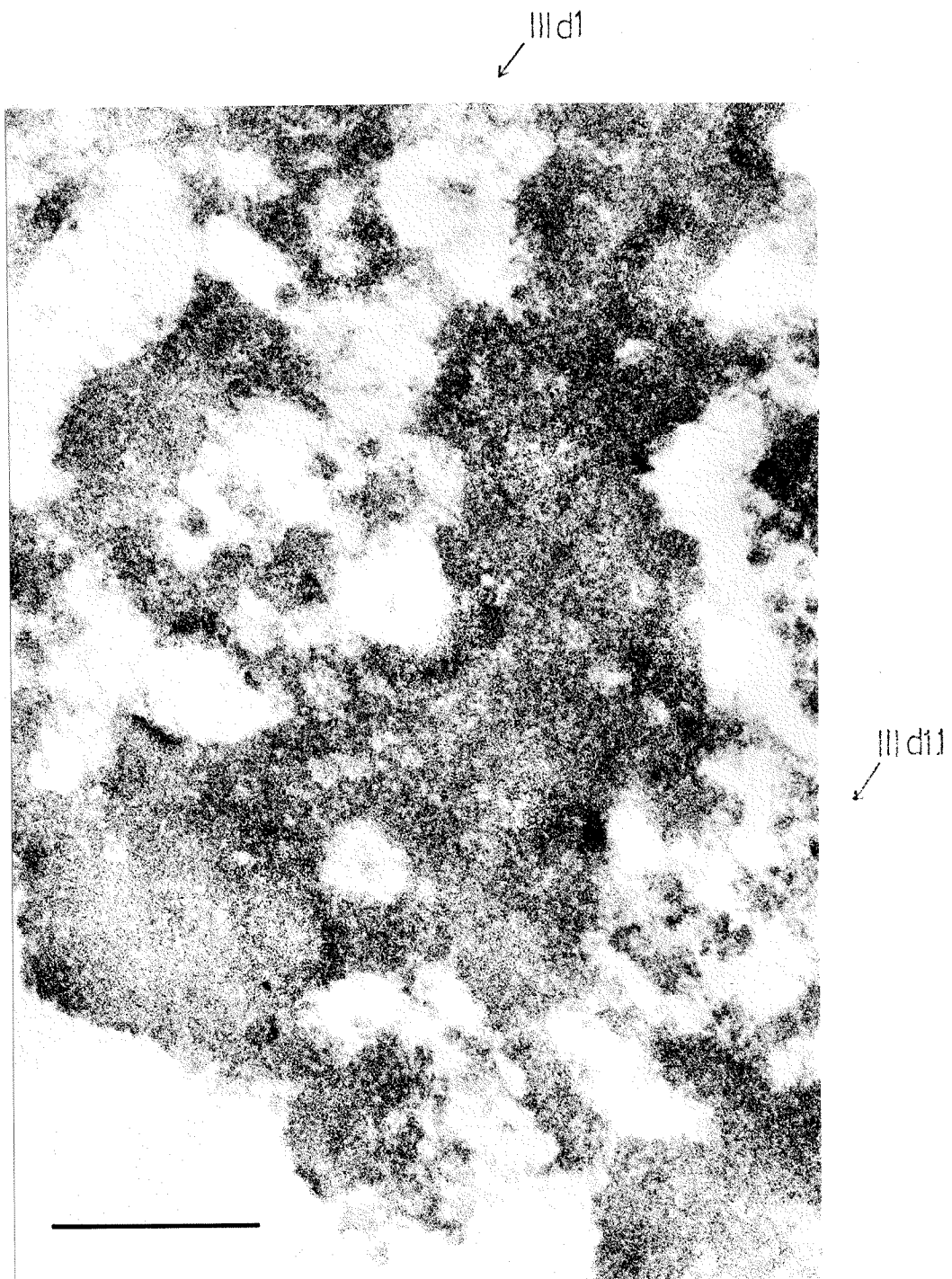


Fig. 4: Region III d1 - III d1.1. Strecke = 0.5 μ .
Isoliert und fixiert in Glancy Mod.I.
Die Bande in III d1g ist kondensiert

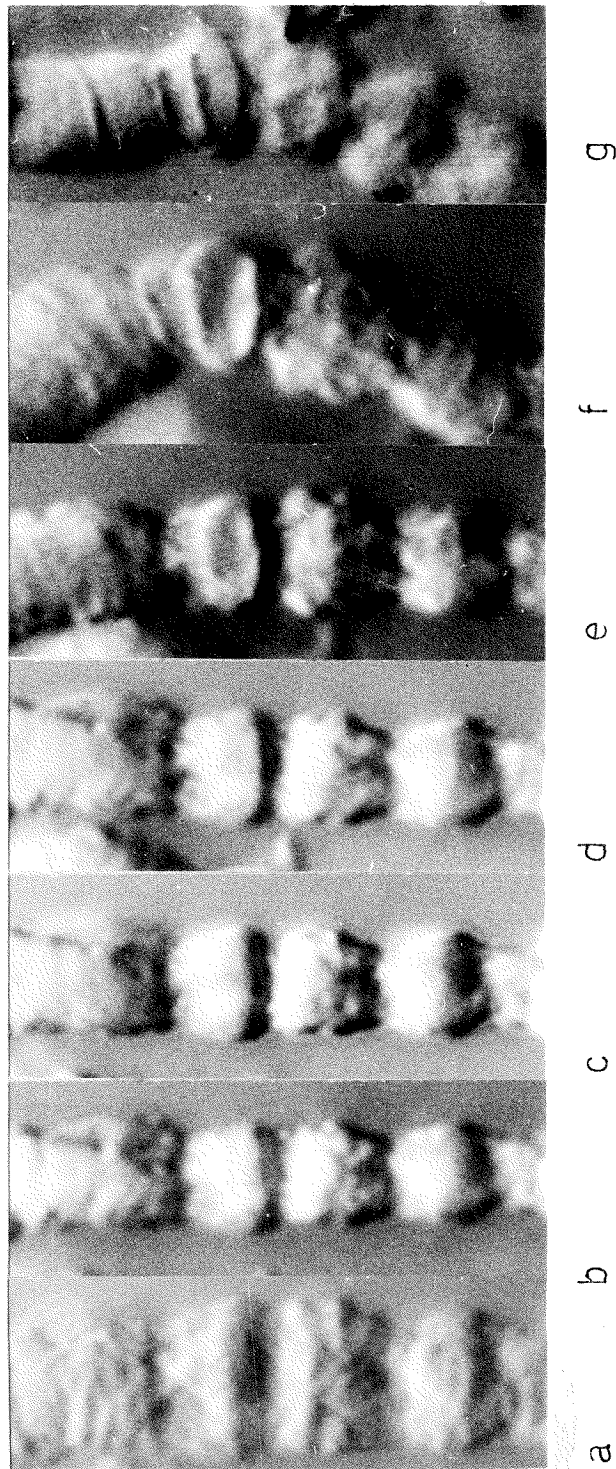


Fig. 5: Typischer Versuchsablauf im Lichtmikroskop, KCl-Reihe. a. Glancy-Medium, b. Medium 300K/2. c. 350K/2. d. 400K/2. e. 450K/2. f. 500K/2. g. Vergleich 450Na/2. 2500x

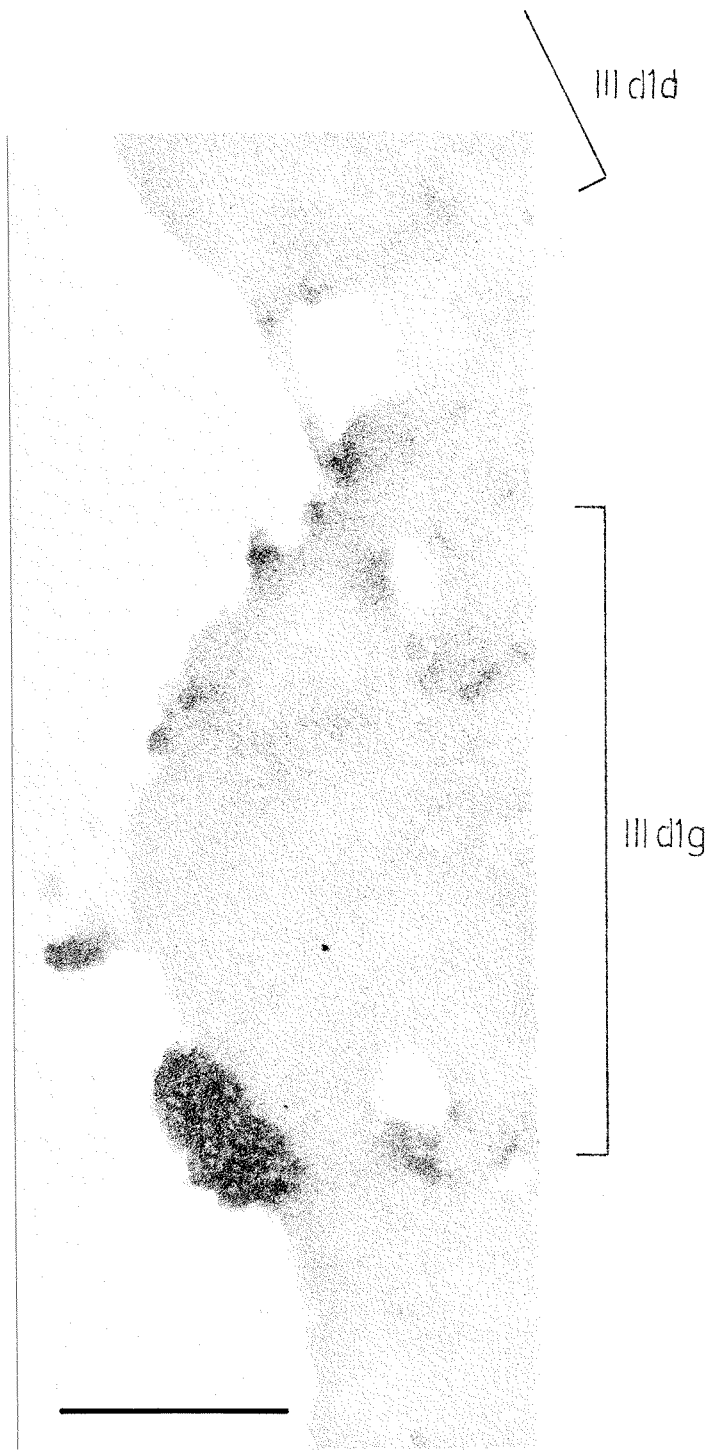


Fig. 6: Region III dl - III dl.1, Medium 300K/2, Strecke = 0.5 μ

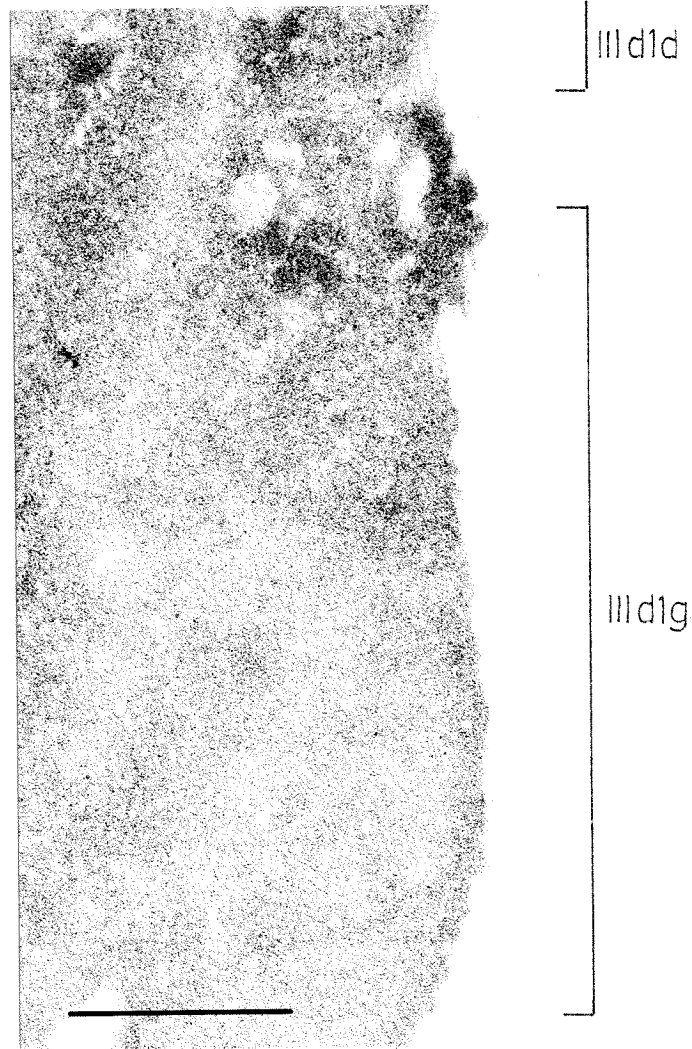


Fig. 7: Region III d1 - III d1.1, Medium 350K/2, Strecke = 0.5 μ

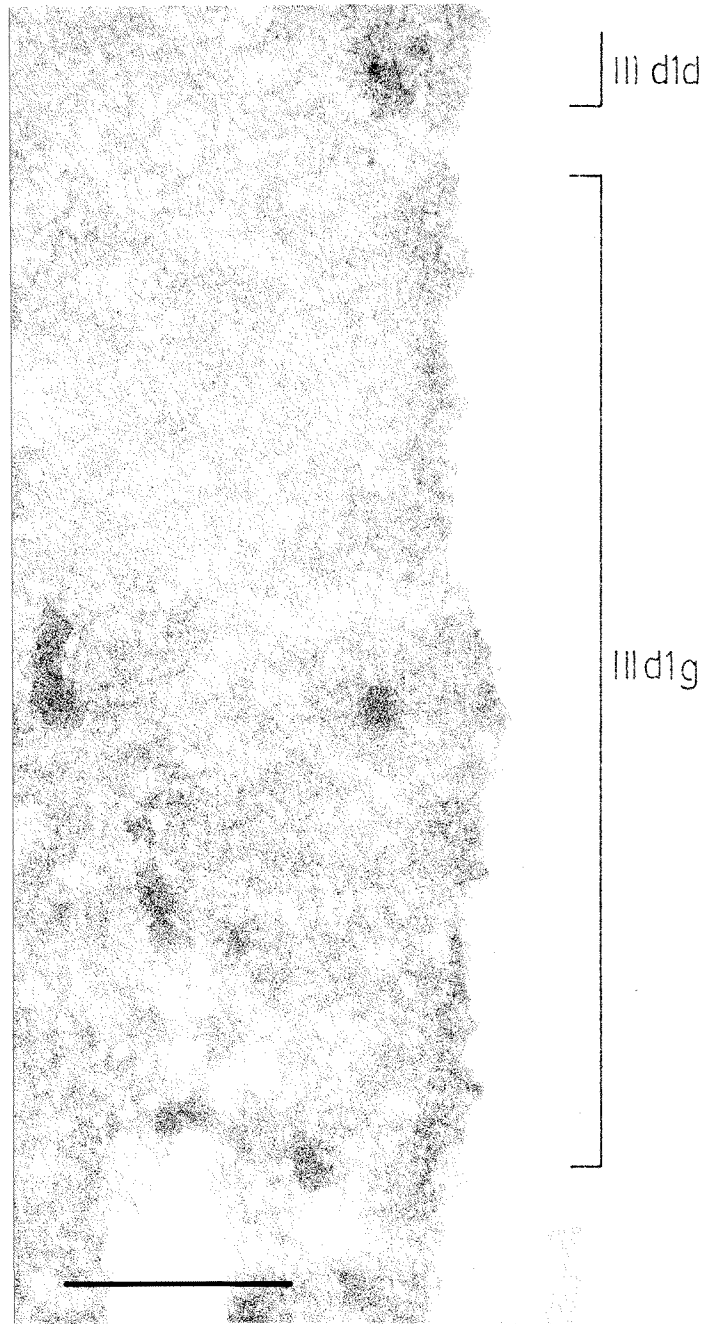


Fig. 8: Region III d1 - III d1.1, Medium 400K/2, Strecke = 0.5 μ

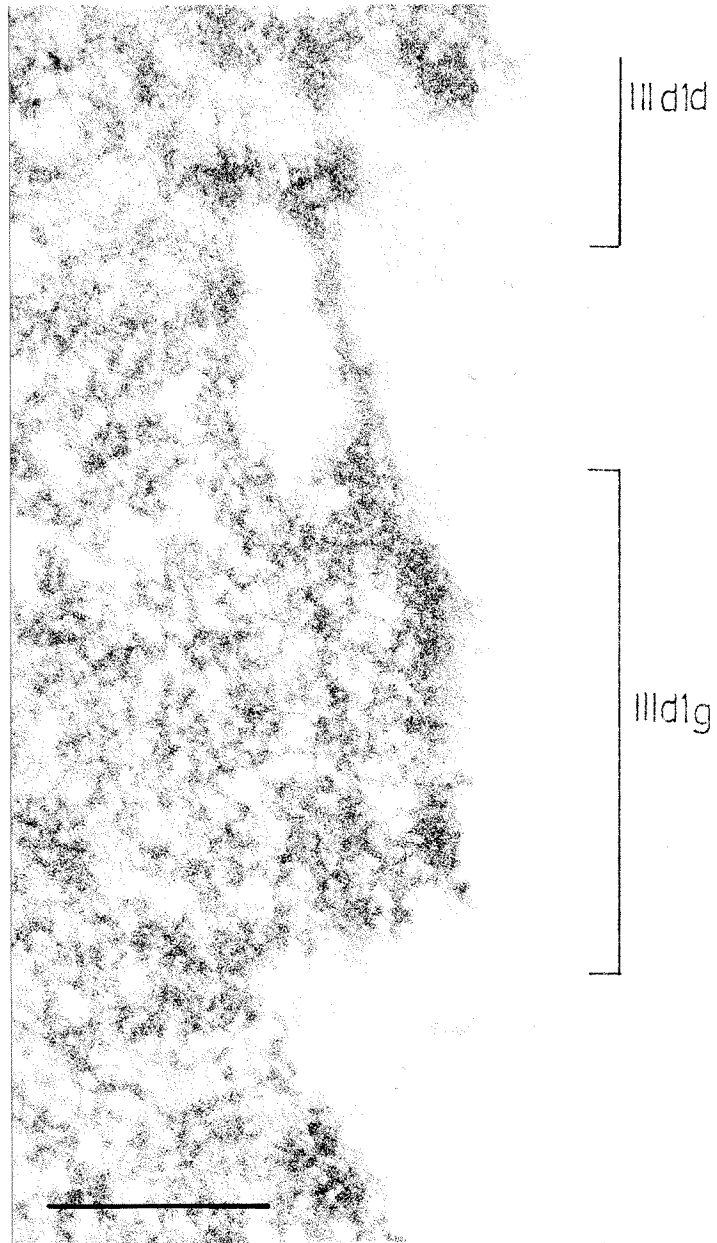


Fig. 9: Region III d1 - III d1.1, Medium 450K/2, Strecke = 0.5 μ

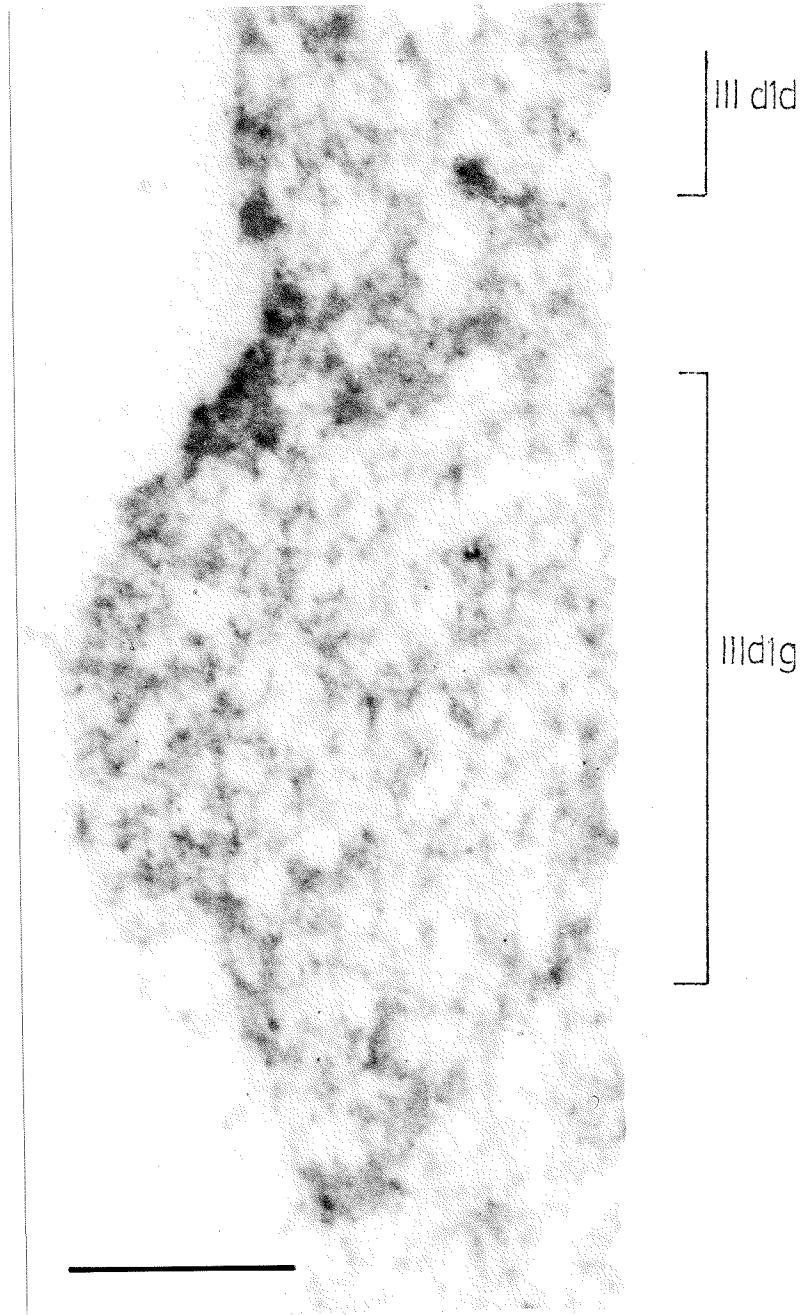


Fig. 10: Region III d1 - III d1.1, Medium 450Na/2, Strecke = 0.5 μ

Dank

Mein Dank geht an alle, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden. Ich weiss ihre Geduld und ihren guten Willen sehr zu schätzen.

Herr Prof. H. Ursprung hat mir durch die Anstellung am Institut ermöglicht, die Arbeit auszuführen. Herr Dr. M. Lezzi ist mir mit Rat und Kritik sehr behilflich gewesen.

Herrn Prof. H.R. Hohl, Cytologisches Labor der Universität Zürich, habe ich für die Möglichkeit zur Benützung des SEM zu danken, Herrn Prof. K. Mühlethaler und Herrn Prof. Th. Koller für Rat und Hilfe bei der konventionellen Elektronenmikroskopie.

Meiner Frau danke ich für das Verständnis und die Geduld, die sie in schweren Stunden für ihren manchmal undurchsichtigen und abwesenden Gatten aufbringen konnte.

Frau L. Wildi bin ich für die rasche und saubere Reinschrift des Manuskripts zu Dank verpflichtet.

SUMMARY

1. The three-dimensional structure of isolated polytene chromosomes of Chironomus thummi and Chironomus tentans is investigated by Scanning-Electronmicroscopy. The chromosomes are isolated by hand, fixed and dried by one of the following methods: freeze-drying with and without anti-freeze, freezing with Freon 22^R, freezing with HeII, Critical Point Drying with CO₂ or N₂O. The results are compared with thin sections of similarly treated chromosomes. It is found that the information obtained from these investigations is limited, mainly because of the poor resolution power of the SEM.
2. The ultrastructure of ion-induced decondensations of isolated giant chromosomes of Chironomus thummi salivary glands is investigated on thin sections and compared with the ultrastructure of physiological puffs. It is also compared with the ultrastructure of chromatin, from which the histones have been gradually removed by stepwise lowering of the pH (BRASCH et al.), as well as with the behavior of chromatin, from which the histones have been extracted by raising the salt concentration at a low pH (ZUEGER 1974). The results of this investigation match with those of chromatin, and it is concluded that giant chromosomes and chromatin are equivalent with respect to histone dissociation.

Lebenslauf

Christoph Ulrich Holderegger, von Gais AR, wurde am 31. Juli 1945 als Sohn des Hermann Gottfried und der Lydie, geb. Vodoz, in Zürich geboren. 1952 - 1958 besuchte er die Primarschule in Erlenbach ZH und anschliessend das Gymnasium in Zürich und Schiers GR, wo er im Frühling 1966 die Matura Typ B bestand. Im Herbst des gleichen Jahres begann er seine Studien an der Abteilung X A der ETH Zürich. Im Herbst 1971 erwarb er das Diplom als Naturwissenschaftler mit einer Arbeit über die experimentelle Veränderung des puffing in den Malpighi'schen Gefässen von C. tentans. Seither war Christoph Holderegger am Labor für Entwicklungsbiologie der ETH, später Institut für Zellbiologie, als Assistent II tätig. Im Sommer 1974 heiratete er Ingrid Mähling.