

Chromosomale Strukturen von *Pseudomonas testosteroni*

I. Isolierung und Charakterisierung der chromosomalen Komplexe

Chromosomal Structures of *Pseudomonas testosteroni*

I. Isolation and Characterization of the Chromosomal Complexes

Günter Reimer und Dusan Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für Therapeutische Biochemie
der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. 31 c, 91–97 [1976]; eingegangen am 29. August/8. Oktober 1975)

Bacterial Chromosome, Different Forms, Deoxyribonuclease Digestion

After lysis of *Pseudomonas testosteroni* with lysozyme and non-ionic detergents different DNA-protein complexes can be separated in 5–25% (w/v) neutral sucrose gradient. The protein to DNA ratio of these complexes varies between 0.5–4.5 to 1, whereby the faster sedimenting forms contain more protein than the slower sedimenting ones. Different initial rates of DNase digestion may indicate various degrees of DNA packing in these complexes. The chromosomal complexes of *Pseudomonas testosteroni* are relatively stable towards pronase. Treatment with RNase or sodium dodecylsulphate is accompanied by a dramatic increase in viscosity and decrease in relative density. It suggests that DNA in these complexes is maintained in its supercoiled form by RNA molecule(s) in a similar way as in isolated chromosome of *E. coli*.

Stonington und Pettijohn¹ sowie Worcel und Burgi² gelang es, mit einer speziellen Lyse das Chromosom von *E. coli* in seiner natürlichen Form zu isolieren. Hierfür werden die Bakterien in einer hyperosmotischen Lösung mit Lysozym behandelt und die entstandenen Sphäroblasten mit den nicht-ionischen Detergentien Brij 58 und Desoxycholat bei hoher Ionenstärke lysiert. Das freigesetzte, kompakt angeordnete Chromosom kann mit einem Saccharose-Gradienten von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Abhängig von den Bedingungen während der Lyse sedimentieren die Chromosomen entweder als 1200–2200 S oder 3000–4000 S schwere DNA-Protein-Komplexe^{3, 4}. Das einmal isolierte Chromosom bleibt in seiner Form stabil und kann durch proteolytische Enzyme nicht verändert werden. Nukleolytische Enzyme hingegen führen zu einem Auseinanderfallen der DNA in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Inkubationsdauer; DNase bewirkt ein teilweises Entspiralisieren der in „supercoils“ angeordneten DNA, während RNase die kompakt angeordnete DNA des Chromosoms völlig auseinanderfallen kann^{1–4, 7}. Die Autoren folgern hieraus, daß die im „core“ des Chromosoms befindliche RNA wesentlich dazu beiträgt, das Chro-

mosom in seiner kompakten Form zusammenzuhalten.

Da wir ein geeignetes *in vitro*-System für Studien der Genregulation an einem kompakten und möglichst in seiner natürlichen Form angeordneten Genom suchten, isolierten wir adäquate chromosomale DNA-Protein-Strukturen aus *P. testosteroni*. Dieses gramnegative Bakterium kann mit Testosteron und Derivaten als einzige Kohlenstoffquelle wachsen, indem mehrere, monocistronisch im Genom codierte Enzyme *de novo* synthetisiert werden^{8–10}.

Material und Methoden

Kultivierung von *P. testosteroni*

Auf Schrägagar (1,2% Bacto-Agar, Difco, mit 500 µg/ml mit Ultraschall fein suspendiertes Testosteron, Merck) gewachsene *P. testosteroni* (ATCC 11996) werden in Hefemedium (10 g/l Bacto Yeast Extract, Difco, 1 g (NH₄)₂HPO₄, 1 g (NH₄)H₂PO₄, 2 g KH₂PO₄ in 1 l Wasser mit 10 ml Spurenelement-Lösung von 20,0 g MgSO₄·7 H₂O, 1,0 g NaCl, 0,5 g ZnSO₄·7 H₂O, 0,5 g MnSO₄·3 H₂O, 0,5 g CuSO₄·5 H₂O, 0,5 mg FeSO₄·7 H₂O und 10 ml 0,1 N H₂SO₄ in 1 l Wasser) überimpft und 20–24 Stunden bei 30 °C im Schüttelinkubator vorkultiviert⁹. Von dieser stationär wachsenden Zellsuspension werden 15 ml auf 200 ml Hefemedium überimpft und 5 h bei 30 °C kultiviert. Die Reinheit des Stammes wird durch Phasenkontrastmikroskopie und Messen der

Sonderdruckerfordernungen an G. Reimer, Zentrum der Dermatologie und Venerologie, Abteilung IV (Biochemie), Universität Frankfurt am Main, Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt am Main.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Lyse von *P. testosteroni*.

Ablauf der Lyse	Methode I	Methode II
Anzahl der Bakterien pro Lyse	$2-5 \times 10^{10}$	$1-2 \times 10^{10}$
Resuspension in Lysatlösung A	2,0 ml	2,0 ml
Einfrieren und Auftauen (in CO ₂ /MeOH-Gemisch)	3mal	entfällt
Zugabe von Lysatlösung B	0,4 ml	0,4 ml
Lysozymwirkung	5–10 sec	20 sec
Zugabe von Lysatlösung C	2,3 ml	3,0 ml
Inkubation	4–6 min bei 37 °C oder 10–15 min bei 20 °C	8–10 min bei 15 °C
Ende der Lyse bei	minimalem Viskositätsanstieg; Lysat etwas klarer	starkem Aufklaren des Lysats; bleibt flüssig
Isolierung der chromosomalen Strukturen (5–25% Saccharose- Gradient, SW 25-Rotor, 2 °C)	15 min bei 6000 rpm	15 min bei 20000 rpm

induzierten Ketosteroidisomerase-Aktivität überprüft⁹.

Lyse nach Methode I

In der Mitte der logarithmischen Phase gewachsene Zellen (ca. $2-4 \times 10^{10}$) werden in 2,0 ml Lysatlösung A (10 mM Tris (HCl), pH 8,1 10 mM Na₂S₂O₃, 20% Saccharose, 50 mM NaCl) resuspendiert und dreimal im Trockeneis/Methanol-Gemisch eingefroren und aufgetaut. Nun wird 0,4 ml der frisch angesetzten, Lysozym enthaltenden Lösung B (120 mM Tris (HCl), pH 8,1, 80 mM EDTA, 4 mg/ml Lysozym, Serva) für 5–10 sec einwirken lassen und 2,4 ml Lysatlösung C (1% Brij 58, 0,4% Desoxycholat, 2,0 M NaCl) hinzugefügt. Dieses Gemisch wird zur vollständigen Lyse für 4–8 min bei 37 °C oder 15 min bei 22 °C inkubiert, bis ein geringfügiger Viskositätsanstieg bemerkbar ist und dann sogleich im Eiswasser abgekühlt (Tab. I).

Lyse nach Methode II

Am Ende der logarithmischen Phase wachsende Zellen (ca. 10^{10}) werden in 2,0 ml Lysatlösung A gut resuspendiert. Nach Zugabe von 1,0 ml frisch angesetzter Lysatlösung B wird das Lysozym 20 sec bei 2 °C wirken lassen und sogleich 3,0 ml Lysatlösung C dazugemischt. Nach 8–10 min wird das Lysat deutlich klarer, ohne jedoch viskös zu werden (Tab. I).

Isolierung der chromosomalen Strukturen

Das Lysat wird auf einen 5–25-prozentigen (w/v) Saccharose-Gradienten (mit 30% (v/v) Glycerin, 1,0 M NaCl, 40 mM Tris (HCl), pH 7,9, 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM Dithiothreitol) auf-

getragen und mit einem SW 25-Rotor einer Beckman-Ultrazentrifuge in 15 min bei 6000 rpm (bei Methode I) bzw. 20 000 rpm (bei Methode II; Tab. I) aufgetrennt. Während der Fraktionierung des Gradienten wird die Absorption bei 254 (*A*₂₅₄) kontinuierlich gemessen und das Sedimentationsprofil aufgezeichnet.

Bestimmung der Proteine und der DNA

Die Gradientenfraktionen mit den entsprechenden chromosomalen Strukturen werden vor der Bestimmung der Proteine (Lowry *et al.*¹¹) und der DNA (Dische¹²) gründlich gegen 20 mM Tris (HCl), pH 7,5, dialysiert.

Spaltung der DNA durch DNase

Die Empfindlichkeit der chromosomalen DNA gegenüber DNase wird nach der Methode von Billing und Bonner¹³ bestimmt. Die isolierten DNA-Protein-Komplexe werden mit 40 mM Tris (HCl), pH 7,9, in 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ und 0,1 mM Dithiothreitol auf eine optische Dichte (*A*₂₆₀) von 1,5 bis 2,5 verdünnt. Es werden jeweils 10 µg/ml DNase I oder DNase II hinzugegeben und bei 37 °C 0 bis 60 min inkubiert. Die DNase liegt hierbei im Überschuß vor, da 4 bzw. 50 µg/ml DNase im Ansatz keine veränderte Rate der DNA-Verdauung ergibt. Die nicht hydrolysierten Nukleinsäuren werden mit TCA (5% Endkonzentration) gefällt und abzentrifugiert. Im Überstand hiervon mißt man nun die optische Dichte der abgespaltenen Nukleotide. Parallel wird die Hydrolyse der nach Marmur¹⁴ gereinigten *P. testosteroni*-DNA mit DNase ermittelt und zu der Spaltung der isolierten DNA-Protein-Komplexe in Relation gesetzt.

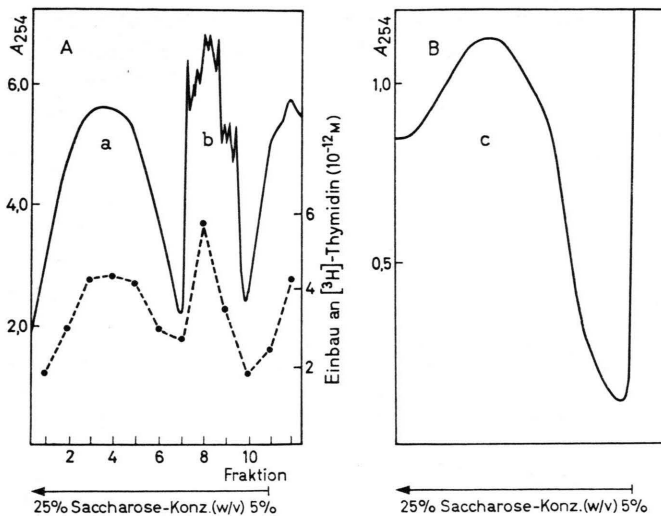


Abb. 1. Isolierung verschiedener chromosomaler DNA-Protein-Komplexe aus *P. testosteroni* nach Methode I (A) bzw. II (B). (—) Absorptionsprofil des Gradienten bei 254 nm (A_{254}). (• - - •) TCA-präzipitierbare Radioaktivität des *in vivo* in die DNS der Bakterien inkorporierten [3 H]Thymidins (6,7 Ci/mM, NEN).

Ergebnisse

Isolierung der chromosomalen Komplexe

Bei einer identischen Durchführung der von Stoughton und Pettijohn¹ für *E. coli* beschriebenen Methode resultiert bei logarithmisch gewachsenen *P. testosteroni* nur eine unvollständige Lyse. Werden die Bakterien jedoch vor Anwendung dieser Methode mehrmals in einem Trockeneis-Methanol-Gemisch tiefgefroren und aufgetaut und die Lysatlösungen verändert, so wird die Lyse wesentlich effektiver. Diese Modifikation der Lyse wird im weiteren als Methode I bezeichnet (Tab. I). Nach Zentrifugation des Lysates im 5 – 25% (w/v) Saccharose-Gradienten bei 6000 rpm erhält man zwei heterogene DNA-Protein-Strukturen (a und b in Abb. 1 A) mit unterschiedlicher relativer Dichte. Der Protein-DNA-Quo-

tient beider Formen ist jeweils gleich, er schwankt jedoch je nach Lysat von 2 : 1 bis 4,5 : 1.

Mehrere Generationen mit [3 H]Thymidin gewachsene und in der gleichen Weise präparierte Bakterien ergibt eine zum Absorptionsprofil (A_{254}) parallele Verteilung der mit TCA präzipitierbaren Radioaktivität; ca. 90% der in die DNA eingebauten Radioaktivität sedimentiert hierbei in den Gradienten. Da nicht mit völlig auxotrophen Mutanten von *P. testosteroni* gearbeitet wurde, ist der Einbau an [3 H]Thymidin in die DNA jedoch zu gering, um weitere Analysen anschließen zu können.

Neben den beiden oben beschriebenen DNA-Protein-Komplexen kann aus dem gleichen *P. testosteroni*-Lysat noch eine weitere, kompakte chromosomale Form mit einem Protein-DNA-Verhältnis von 0,5 : 1 isoliert werden. Dieser Komplex ist im glei-

	Isolierung nach	
	Methode I	Methode II
Sedimentation im Gradienten bei	6000 rpm	20 000 rpm
Protein/DNS-Verhältnis	2 – 4,5 : 1	0,5 : 1
Veränderung der Komplexe durch	keine Wirkung	keine Wirkung
Inkubation (60 min, 30 °C)		
Pronase (50 bzw. 100 µg/ml 15 min bei 30 °C)	keine Wirkung	keine Wirkung
DNase (12 bzw. 25 µg/ml 15 min bei 30 °C)	keine Wirkung	keine Wirkung
RNase (8, 10 bzw. 20 µg/ml 10 min bei 30 °C)	keine Wirkung	Viskositätsanstieg
Natriumlaurylsulfat (0,5% Endkonzentration)	Viskositätsanstieg	Viskositätsanstieg
Sarkosin (1,5% Endkonzentration 15 min bei 4 °C)	auf Membranspaltung hinweisend	keine Wirkung

Tab. II. Eigenschaften der isolierten DNA-Protein-Komplexe von *P. testosteroni*.

chen 5–25% (w/v) Saccharose-Gradienten vorzufinden, wenn man bei 20 000 rpm 15 min lang zentrifugiert; die beiden vorher beschriebenen Formen (a, b) sedimentieren als Pellet am Boden des Gradienten. Um diese proteinärmere chromosomale Form in einer höheren Ausbeute isolieren zu können, werden *P. testosteroni* nach einer weiteren, hier als Methode II bezeichneten Lyse aufgebrochen. Hierbei erübrigt sich mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Bakterien. Die Lysozym enthaltende Lösung B wird vermehrt zugegeben, 20 Sek. wirken lassen und nach Zugabe der Lösung C das Gemisch inkubiert (Tab. II). Sind alle Bakterien lysiert, so wird das Lysat beträchtlich klarer als bei Methode I, behält jedoch seine flüssige, nicht visköse Konsistenz. Diese chromosomalen Komplexe (c) ergeben im Gradienten einen homogenen Peak (Abb. 1 B).

Stabilität der proteinreichen chromosomalen Strukturen

Während der Lyse der Bakterien nach Methode I ist der kompakte, schnell sedimentierende DNA-Protein-Komplex (a) in die visköse und expandiertere Form (b) oder in eine sehr visköse Form mit wahrscheinlich völlig expandierter DNA irreversibel überführbar. Ein solcher Übergang kann bei verlängerter Inkubation des Lysates bei 30 °C ebenso beobachtet werden (Abb. 2 A, B, C) wie bei einer höheren Inkubationstemperatur, größeren Lysozym-

konzentration oder mechanischen Reibung. Durch entsprechende Variation der erwähnten Bedingungen während der Lyse nach Methode I erhält man daher nur die schnell sedimentierende Form oder beide Formen in verschiedenen Relationen zueinander.

Wirkung von Sarkosin

Werden *P. testosteroni* nach Methode I lysiert und das Lysat 20 min mit 1,5% Sarkosin inkubiert, so können nach Auftrennung im Gradienten erheblich weniger schnell sedimentierende DNA-Protein-Komplexe (a) isoliert werden (Abb. 3 A). Wird das gleiche Lysat jedoch anstatt bei 6000 rpm bei 20 000 rpm zentrifugiert, so ist eine größere Menge an proteinärmeren, chromosomalen Strukturen (c) vorzufinden. Im Gegensatz zu den proteinreichen Strukturen (a) zeigt sich der proteinärmere Komplex (c) gegenüber Sarkosin als unempfindlich (Abb. 3 B). Dies wird auch durch das unveränderte DNA-Protein-Verhältnis der Komplexe (c) verdeutlicht.

Eigenschaften der isolierten DNA-Protein-Komplexe

Für die Isolierung der verschiedenen chromosomalen Komplexe ist eine Salzkonzentration von 1,0 M NaCl erforderlich. Die einmal isolierten Komplexe bleiben hingegen auch bei einer Inkubationsdauer von 60 min bei 30 °C stabil. Durch diese Eigenschaft ist es möglich, enzymatische Reaktionen der

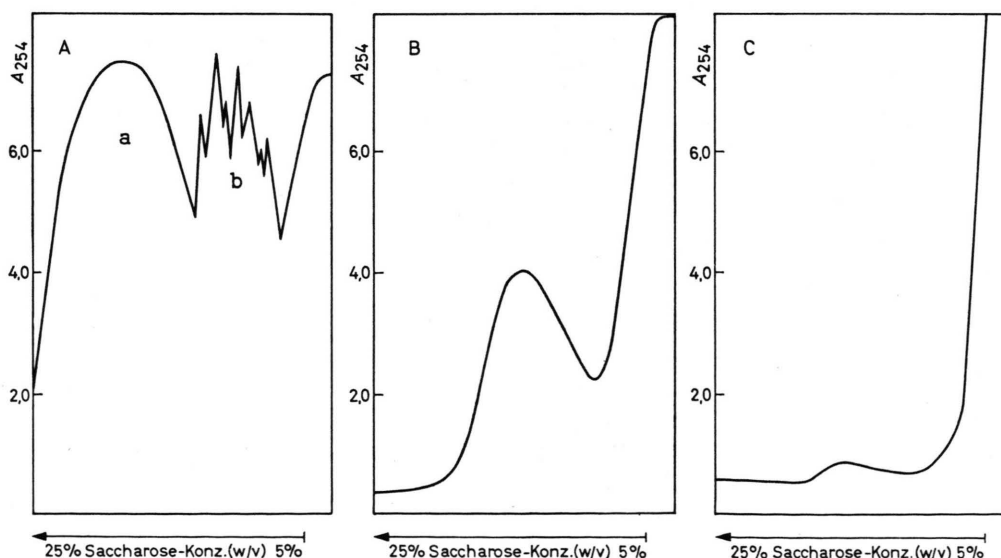


Abb. 2. Wirkung der Inkubationsdauer auf das Sedimentationsprofil (A_{254}) des nach Methode I aus *P. testosteroni* präparierten Lysates. Das Lysat wurde für 4, 8 bzw. 12 min (A, B bzw. C) bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 6000 rpm zentrifugiert.

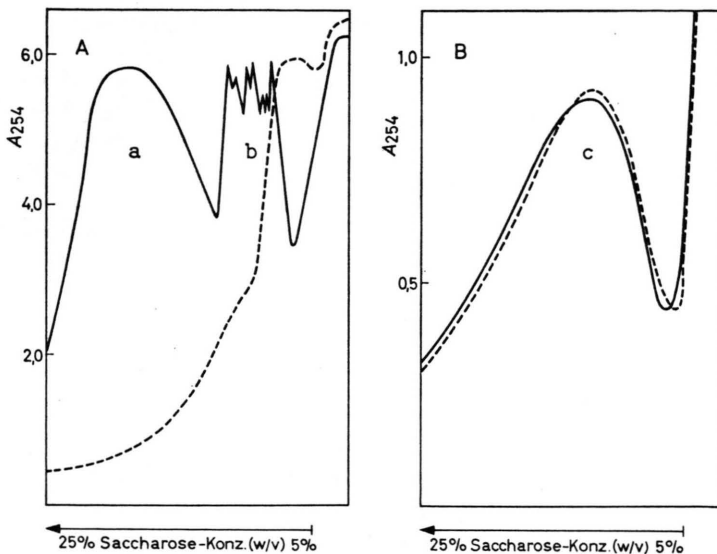


Abb. 3. Wirkung von Sarkosin: *P. testosteroni* werden nach Methode I (A) bzw. II (B) lysiert und während der Lyse zu der Hälfte des Lysates vorsichtig Sarkosin hinzugemischt (1,5% Endkonzentration). Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wird das Lysat im 5–25% (w/v) Saccharose-Gradienten bei 6000 rpm (A) bzw. 20 000 rpm (B) fraktioniert. (—) Sedimentationsprofil (A_{254}) des unbehandelten Lysates; (---) Sedimentationsprofil (A_{254}) des mit Sarkosin behandelten Lysates.

verschiedenen DNA-Protein-Strukturen zu untersuchen.

Inkubiert man den proteinreichen Komplex (a) jeweils 15 min mit Pronase, DNase I bzw. DNase II oder RNase, so ist keine signifikante Änderung der Sedimentationsgeschwindigkeit festzustellen (Tab. II). Die nach Marmur nach Methode II aus *P. testosteroni* isolierten Komplexe (c) bleiben bei 80 mM NaCl-Konzentration, längerer Inkubation bei 30 °C sowie Einwirkung von Pronase oder DNase ebenfalls unverändert (Tab. II). Inkubation mit RNase für 10 min erhöht hingegen die Viskosität dieser chromosomalen Form ebenso stark wie 0,5% Natriumlaurylsulfat (Tab. II). Diese Eigenschaft der chromosomalen Form (c) ist ein wesentlicher Unterschied zu der erst beschriebenen Form (a).

Spaltung der chromosomalen DNA mit DNase

Die Spaltung der verschiedenen chromosomalen Strukturen durch DNase zeigt hier ebenso wie die Hydrolyse der DNA von Interphasenchromatin einen zweiphasigen Verlauf (Abb. 4, 5). Hierbei wird in der ersten Phase der Enzymreaktion freie, für die DNase sofort zugängliche DNA gespalten, während in der zweiten, langsameren Phase auch die restliche chromosomale DNA hydrolysiert wird. Vergleicht man die Empfindlichkeit der verschiedenen Komplexe, so wird die DNA der proteinreichen, kompakten Struktur (a) am wenigsten hydrolysiert. Extrapoliert man von dem zweiten Teil der Kurve jeweils auf die Ordinate, so erhält man den Anteil

der DNA, der für die DNase direkt zugänglich ist. Somit kann man erkennen, daß 10–15% der chromosomalen DNA der kompakten Form (a) und 40 bis 50% der ebenfalls kompakten, jedoch proteinärmeren Form (c) frei zugänglich vorliegen.

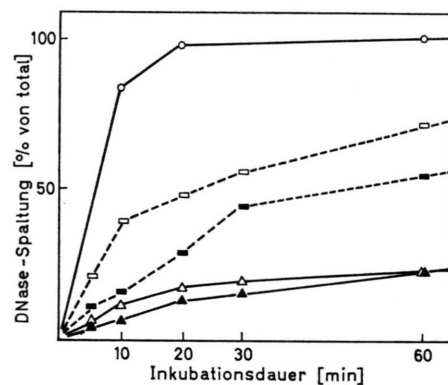


Abb. 4. Spaltung der chromosomalen DNA der nach Methode I isolierten DNA-Protein-Komplexe. Die Gradientenfractionen mit den entsprechenden chromosomalen Strukturen (a und b) werden auf eine optische Dichte (260 nm) von 2,5 verdünnt und bei 37 °C mit DNase inkubiert. Die nicht hydrolysierte DNA wird mit TCA gefällt und die optische Dichte (260 nm) des Überstandes gemessen. Die Werte werden zu der Spaltung von gereinigter *P. testosteroni*-DNA in Relation gesetzt.

P. testosteroni-DNA: ○ Exp.: 150 µg DNA und 50 µg DNase/ml.

Chromosomaler Komplex (a): △ Exp. I: 125 µg DNA und 50 µg DNase/ml; ■ Exp. II: 125 µg DNA und 10 µg DNase/ml.

Chromosomaler Komplex (b): □ Exp. I: 155 µg DNA und 50 µg DNase/ml; ▲ Exp. II: 155 µg DNA und 10 µg DNase/ml.

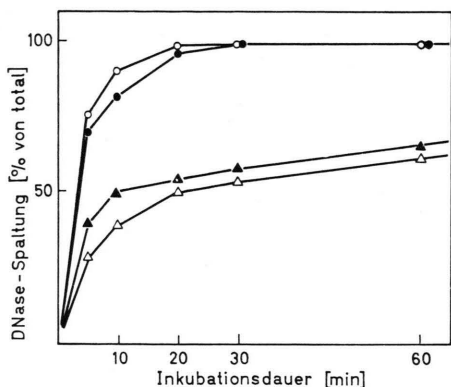


Abb. 5. Spaltung der chromosomalen DNA der nach Methode II isolierten DNA-Protein-Komplexe. Die entsprechende Gradientenfraction wird auf eine optische Dichte (260 nm) von 1,4 verdünnt und wie in Abb. 4 beschrieben behandelt.

P. testosteroni-DNA: ○ Exp. I: 70 µg DNA und 25 µg DNase/ml; ● Exp. II: 50 µg DNA und 10 µg DNase/ml. Chromosomale Form (c): △ Exp. I: 70 µg DNA und 25 µg DNase/ml; ▲ Exp. II: 50 µg DNA und 10 µg DNase/ml.

Diskussion

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir chromosomale Strukturen aus *P. testosteroni* isolieren und charakterisieren, nachdem wir die von Stenington und Pettijohn^{1,3} für *E. coli* beschriebene Lyse entsprechend abgeändert hatten. Die verschiedenen isolierten Chromosomen unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Sedimentationsgeschwindigkeit, den Proteingehalt sowie Empfindlichkeit gegenüber RNase. Diese Unterschiede dürften durch eine Assoziation von Membranfragmenten bewirkt werden, zumal Sarkosin, das die Nukleoprotein-Membranbindung zerstört, hier ebenso wie bei *E. coli*³⁻⁵ den schnell sedimentierenden Komplex (a) in die proteinärmere Form (c) überführt. Der von 2 : 1 bis 4,5 : 1 variierende Proteingehalt der Form (a) dürfte wie bei *E. coli*³⁻⁵ auf unterschiedlich große Membranfragmente zurückzuführen sein.

Während der Lyse sind die kompakten chromosomalen Strukturen instabil (Abb. 2), nach ihrer Isolierung widerstehen sie jedoch längerer Inkubation bei geringerer Ionenstärke (Tab. II). Es erscheint somit möglich, daß Faktoren oder Mechanismen, die eine Umstrukturierung der chromosomalen Anordnung bewirken, bei der Isolierung der Komplexe verloren gehen oder inaktiviert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß Wang¹⁵ aus *E. coli* ein Protein isolieren konnte, das die in super-

helikalen Windungen angeordnete DNA *in vitro* entspiralisieren kann.

Wie für *E. coli*-Chromosomen beschrieben^{1,2}, behalten die isolierten kompakten DNS-Protein-Komplexe von *P. testosteroni* ihre strukturelle Anordnung auch nach Inkubation mit proteolytischen Enzymen.

Bei Hydrolyse mit DNase wird zwar die chromosomale DNA gespalten, die Sedimentationsgeschwindigkeit wird jedoch nicht entscheidend beeinflusst (Tab. II). Dies könnte einerseits auf einer relativ geringen Gewichtsabnahme des Komplexes beruhen; es wäre andererseits auch möglich, daß der DNA-Protein-Komplex durch Abspaltung peripherer, frei zugänglicher DNA-Stränge einen kleineren Radius besitzt und dadurch an der gleichen Stelle des Gradienten sedimentiert.

Ähnlich wie bei *E. coli*¹⁻⁴ bewirkt RNase ebenso wie Natriumlaurylsulfat bei *P. testosteroni*-Chromosomen eine starke Zunahme der Viskosität der proteinärmeren Strukturen (c). Die Empfindlichkeit gegenüber RNase steht in Analogie zu der strukturellen Änderung des aus *E. coli* isolierten chromosomalen Struktur nach RNase¹⁻⁴. Diese Beobachtung wird mit dem Auseinanderfallen der kompakt angeordneten DNA interpretiert, die mit RNA-Molekül(en) zusammengehalten werden dürfte.

Die Resistenz des Komplexes (a) gegenüber RNase beruht möglicherweise auf dessen hohem Proteingehalt, der es der RNase nicht ermöglicht, freie Bindungsstellen zu finden.

Die Spaltbarkeit der chromosomalen DNA bei einem Überschuß an DNase veranschaulicht, daß die DNA der verschiedenen Komplexe in unterschiedlichem Maße frei vorliegt und Bindungsstellen für Enzyme bietet. So ist die DNA der proteinreichen Struktur (a) nur zu 10–15% frei zugänglich, während die DNS des visköseren Komplexes (b) besser gespalten wird, obwohl er den gleichen Proteingehalt besitzt. Dies kann durch eine auseinandergefaltete Anordnung der DNA erklärt werden, die somit mehr Bindungsstellen für die DNase bietet. Mit der Empfindlichkeit gegenüber DNase wird auch verdeutlicht, daß der DNA-Protein-Komplex (a) reproduzierbarer in seiner Form isoliert werden kann als der visköse Komplex (b), dessen DNA unterschiedlich weit expandiert sein kann.

Die relativ gute Hydrolysierbarkeit der kompakt angeordneten Form (c) dürfte auf den 5–8mal geringeren Proteingehalt zurückzuführen sein, so daß die DNA zu ca. 40–50% frei zugänglich vorliegt.

Da die einmal aus *P. testosteronei* isolierten chromosomalen Strukturen relativ stabil sind, bieten sie sich an, sie auf endogene, kosedimentierende Enzyme zu untersuchen. So konnte bei Inkubation mit Nukleotidtriphosphaten eine endogene RNA-Polymerase-Aktivität festgestellt werden (in Vorbereitung). Durch diese Eigenschaft sowie die Induzierbarkeit von mehreren Enzymen durch Testosteron stellt das isolierte Chromosom von *P. testosteronei* ein einfaches Modell dar, Regulationsmechanismen

an einer natürlich vorliegenden, kompakten DNA-Struktur zu untersuchen.

Herrn Prof. Dr. A. Wacker möchten wir für sein Interesse an der Durchführung dieser Arbeit danken. Ein Teil dieser Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 104/2) unterstützt. Diese Arbeit ist Teil einer Dissertation (G.R.) im Fachbereich Biologie der Universität Frankfurt am Main.

¹ O. G. Stonington u. D. E. Pettijohn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **68**, 6 [1971].

² A. Worcel u. E. Burgi, J. Mol. Biol. **71**, 127 [1972].

³ D. E. Pettijohn u. R. Hecht, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**, 31 [1973].

⁴ A. Worcel, E. Burgi, J. Robinton u. C. L. Carlson, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**, 43 [1973].

⁵ A. Worcel u. E. Burgi, J. Mol. Biol. **82**, 91 [1974].

⁶ H. Delius u. A. Worcel, J. Mol. Biol. **82**, 107 [1974].

⁷ H. Delius u. A. Worcel, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**, 53 [1973].

⁸ M. Shikita u. P. Talalay, J. Biol. Chem. **242**, 5650 [1969].

⁹ A. Wacker, J. Drews, Pratt., K. Laurent u. K. Petzold, Z. Naturforsch. **20b**, 547 [1965].

¹⁰ B. N. Ames, Ann. Rev. Biochem. **33**, 235 [1964].

¹¹ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1951].

¹² Z. Dische, The Nuclei Acids, Vol. **I**, p. 286 [1955].

¹³ R. J. Billing u. J. Bonner, Biochem. Biophys. Acta **281**, 453 [1972].

¹⁴ J. Marmur, J. Mol. Biol. **3**, 208 [1961].

¹⁵ J. C. Wang, J. Mol. Biol. **55**, 523 [1971].