

Electron micrographs of three types of giant synaptosome seen in purified preparations from guinea-pig cerebellar cortex. 1, Type similar to those seen in whole tissue sections. 2, Type showing tubules. 3, Type with few vesicles and crenellated margins. Permanganate fixation, Araldite embedding and lead staining, $\times 35,000$.

guinea-pig, rat, and pigeon, but not for the cat, this conclusion is consistent with the recently reported histochemical distribution of cholinesterase in these species⁸. However, in the cat, the electrophysiological evidence⁹ indicates that the granule cells with which the mossy fibre endings synapse are not cholinceptive whereas the Purkinje cells are.

Morphological studies on the large synaptosome fraction in the electron microscope revealed three main types of synaptosome (Figure) with many intermediate forms. Type 1, similar in appearance to the endings seen in whole tissue sections, is commonest in preparations made with good refrigeration and contains numerous synaptic vesicles in its cytoplasm. Short tubules (arrow) are also almost invariably present. Type 2 contains few or no vesicles but many tubules, occasionally seen opening out through the external membrane. Type 3 endings contain few or no vesicles and the external membrane is often crenellated. On slight warming (to 8°) type 2 and 3 synaptosomes are much more frequent, sometimes with considerable disintegration of the external membrane. The tubular structure may in part be derived from autolysing mitochondria, but it seems likely that it results mainly from the intracytoplasmic fusion of the synaptic vesicles. Type 3 synaptosomes may represent those in which the tubular system has evaginated. The intracytoplasmic fusion of vesicles in this way may provide the mechanism for the release of acetylcholine from the vesicles which is known

to occur on warming¹⁰. A reversible fusion and reformation of vesicles could provide a mechanism for transmitter release *in vivo*¹¹.

Résumé. Les boutons terminaux des fibres moussues du cervelet ont été séparés des petits boutons de la couche moléculaire après homogénéisation et fractionnement. La fusion intracytoplasmique des vésicules synaptiques se produisant sous l'effet de la chaleur indiquerait un mécanisme de libération du médiateur.

M. ISRAËL and V. P. WHITTAKER

Agricultural Research Council, Institute of Animal Physiology, Babraham, Cambridge (England), January 14, 1965.

⁸ R. L. FRIEDE and L. M. FLEMING, *J. Neurochem.* 11, 1 (1964).

⁹ D. R. CURTIS, J. M. CRAWFORD, P. E. VOORHOEVE, and V. J. WILSON, *Nature, Lond.* 200, 579 (1963).

¹⁰ V. P. WHITTAKER, *Biochem. J.* 72, 694 (1959).

¹¹ The work was supported by USPHS grant No. NB 03928-03 from the National Institute of Neurological Diseases and Blindness. The electron microscope was provided by the Wellcome Trust. The participation of Dr. M. N. SHERIDAN in the early stages of this work and the technical assistance of Miss L. SWALES are gratefully acknowledged.

Lokalisation zusätzlicher RNS-Synthese in Trypsin-behandelten Riesenchromosomen von *Chironomus thummi*

Ausgehend von der Annahme¹, dass es Histonmoleküle sind, die in einer differenzierten Zelle durch Blockierung der RNS-Synthese den grössten Teil der genetischen Loci inaktiv halten, versuchten ALLFREY, LITTAU und MIRSKY diese Blockierung durch Trypsin (das spezifisch basische Proteine hydrolysiert) aufzuheben². Tatsächlich gelang es ihnen zu zeigen, dass in isolierten Kalbsthymus-Zellkernen die partielle Entfernung von Histonen die RNS-Synthese auf etwa das 3fache erhöht. Wir haben versucht festzustellen, von welchen Teilen des Genoms diese zusätzliche RNS-Synthese ausgeht.

Als Objekt diente die larvale Speicheldrüse der Zuckmücke *Chironomus thummi*, in deren Riesenchromosomen

die Aktivität eines Locus direkt auf Grund einer Strukturmodifikation («puff»), bzw. autoradiographisch feststellbar ist. Die Zellkerne unseres Objektes liessen sich nicht isolieren, und die Explantation ganzer Drüsen in Trypsinhaltige Medien führte nicht zum Ziel; daher wurde eine 0,05%ige Trypsinlösung (gepuffert auf pH 7,3) mittels einer neuentwickelten Mikroinjektionstechnik³ direkt in die Zellkerne injiziert. 2–3 h nach der Injektion wurden die Drüsen fixiert, mit Orcein gefärbt und gequetscht. Es zeigte sich eine erhebliche Verstärkung des «puffing» in den Chromosomen. Erstaunlicherweise war diese Ver-

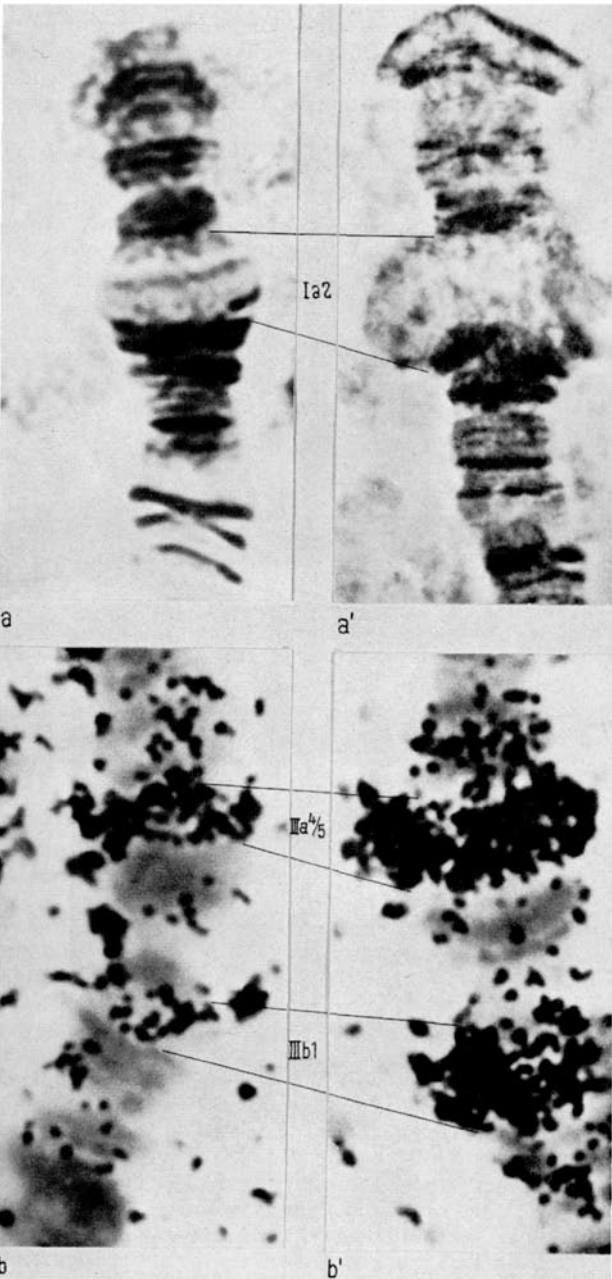
¹ E. STEDMAN and E. STEDMAN, *Nature* 166, 780 (1950).

² V. G. ALLFREY, V. C. LITTAU and A. E. MIRSKY, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 49, 414 (1963).

³ H. KROEGER, in Vorbereitung.

stärkung völlig auf die bereits vorhandenen «puffs» beschränkt; diese wurden in allen Präparaten – z.T. recht erheblich – vergrößert (Figur a); neue «puffs» tauchten jedoch nicht auf. Als Kontrolle dienten jeweils nicht injizierte Zellkerne derselben Drüse.

Um festzustellen, ob es sich bei dieser Vergrößerung der bestehenden «puffs» tatsächlich um den Ausdruck einer vermehrten RNS-Synthese und nicht etwa um Quellung handelt, wurde bei einem weiteren Versuch nach der



Vergrößerte «puffs» mit vermehrter RNS-Synthese in Trypsin-behandelten Speicheldrüsenzellkernen von *Chironomus thummi*. a, der «puff» in I a 2 ohne Behandlung (Kontrolle), bzw. a', nach Trypsinbehandlung. b, Autoradiographie der «puffs» in III a 4/5 und III b 1 ohne Behandlung (Kontrolle), bzw. b', nach Trypsinbehandlung. Autoradiographien auf Ilford G 5 Emulsion. Expositionszeit: 34 Tage. Kontrolle und Experiment jeweils aus Zellkernen derselben Drüse.

Trypsininjektion der Einbau von H³-Uridin autoradiographisch dargestellt. Auszählen der Silberkörner ergab, dass die «puffs» in den Trypsin-behandelten Kernen tatsächlich vermehrt RNS produzieren, und zwar etwa 3mal mehr als in den Kontrollkernen (Tabelle, Figur b). Eine erhöhte Inkorporierung ausserhalb der «puffs» war nicht zu beobachten.

Wir wissen, dass in den aktiven Chromosomenstellen das Histon in etwa gleicher Konzentration vorliegt wie in inaktiven Abschnitten⁴; offenbar liegt es aber dort in einer Form vor, in der es die RNS-Synthese nicht oder nur partiell blockiert. Zur Charakterisierung dieses «nicht-blockierenden Zustandes» trägt unser Experiment bei. Es ist nämlich bekannt, dass Trypsin vorwiegend Proteine angreift, die in ihrer sekundären oder tertiären Struktur verändert sind; dass offenbar immer nur die Histonmoleküle in den gerade «gepufften» Chromosomenabschnitten auf Trypsin reagieren, legt nahe, dass sie dort in einer Form vorliegen, die sie einerseits besonders angreifbar für Trypsin, andererseits unfähig macht, die RNS-Synthese zu blockieren. Der erste Schritt bei der Aktivierung eines Locus dürfte also in einer Änderung der sekundären oder tertiären Struktur seiner Histonmoleküle bestehen⁵.

Vermehrte RNS-Synthese der «puffs» in Trypsin-behandelten Zellkernen

Chromosomenabschnitte mit «puffs» ^a	Inkorporierung von H ³ -Uridin: Zahl der Silberkörner ^b		
	Kontrolle	Experiment (nach Trypsinbehandlung)	Erhöhung der RNS-Synthese
III a 4/5	77 ± 6	234 ± 17	3,0 mal
III b 1	75 ± 12	179 ± 11	2,4 mal
II a 3	60 ± 5	253 ± 13	4,2 mal
II b 3	55 ± 12	158 ± 5	2,9 mal
II d 3/4	96 ± 10	280 ± 19	2,9 mal
Durchschnittliche Erhöhung der RNS-Synthese:			3,1 mal

^a Nach der Chromosomenkarte von KEYL⁶. ^b Mittelwerte von je vier «puffs»; im Experiment wie in der Kontrolle wurden in jeder Drüse die vier «puffs» mit der stärksten Inkorporierung ausgewertet. Kontrolle und Experiment jeweils aus Zellkernen derselben Drüse.

Summary. After injection of buffered trypsin into nuclei of salivary gland cells of *Chironomus thummi*, the existing puffs in the giant chromosomes are enlarged. Autoradiography shows an increase in RNA synthesis of approximately 3-fold in these puffs. It is argued that histones in puffed chromosome segments are in a structural state that renders them unable to prevent RNA synthesis and at the same time causes them to be attacked earlier by trypsin.

M. ROBERT und H. KROEGER

Zoologisches Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich (Schweiz), 7. Januar 1965.

⁴ H. SWIFT, in *The Molecular Control of Cellular Activity* (Ed. J. M. ALLEN; McGraw-Hill, New York 1962), p. 73.
⁵ Untersuchungen durchgeführt mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und des Damon Runyon Memorial Fund for Cancer Research (DRG-668).
⁶ H.-G. KEYL, *Chromosoma*, Berl. 8, 739 (1957).