

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530119

(P2004-530119A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	Z 2GO45
GO 1 N 1/28	GO 1 N 1/30	Z 2GO52
GO 1 N 1/30	GO 1 N 33/58	Z 5CO33
GO 1 N 1/36	HO 1 J 37/26	
GO 1 N 33/58	GO 1 N 1/28	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-570181 (P2002-570181)	(71) 出願人	503322168 シデック テクノロジーズ アーバー スウェーデン, エスイー-171 77 ストックホルム, フォグデヴレテン 2 アー
(86) (22) 出願日	平成14年2月28日 (2002.2.28)	(74) 代理人	100103816 弁理士 風早 信昭
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月4日 (2003.9.4)	(74) 代理人	100120927 弁理士 浅野 典子
(86) 国際出願番号	PCT/SE2002/000354	(72) 発明者	スコグルンド, ウルフ スウェーデン, エスイー-141 39 フッディング, スネークヴェーゲン 34
(87) 国際公開番号	W02002/071336		
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002.9.12)		
(31) 優先権主張番号	0100728-5		
(32) 優先日	平成13年3月5日 (2001.3.5)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		

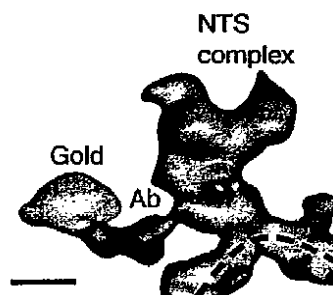
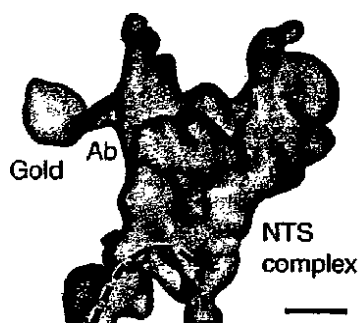
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エピトープの位置を確認して同定する方法

(57) 【要約】

本発明は分子上に位置する特定のエピトープの位置を確認して同定する方法に関する。対象の分子は細胞又は試験管中に位置されることができる。本発明は例えば抗体によるエピトープの特異的な標識付けと組合わせた電子顕微鏡法の使用に基づく。電子顕微鏡法は極めて低い電子線の線量を使用して行われ、これは標識付けする分子をそれらのエピトープに結合させたまま維持することを可能にする。さらに、方法は生物学的文脈における分子の研究を可能にする。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の分子上に位置する特定のエピトープの位置を確認して同定する方法であって、下記のステップを含む方法：

- (a) アフィニティ試薬又は 1 又は 2 以上のこのようなアフィニティ試薬の複合体を、前記試料中の前記分子に結合させることによってアフィニティ標識付けを行い；
- (b) 試料中の前記分子と他の要素の間の空間関係を固定し；
- (c) 試料を電子顕微鏡法のグリッド上に配置し、
- (d) 試料を、透過型電子顕微鏡の低線量電子線に露出させ；
- (e) データをティルトシリーズから収集し；
- (f) 収集したデータを利用して、個々の分子の構造を三次元で再構成し；
- (g) C O M E T を使用して、前記再構成物を改善し、前記試料中の個々の分子を目視可能にする。

10

【請求項 2】

前記分子上の 2 以上のエピトープに対する前記アフィニティ試薬を、アフィニティ標識付けのために使用する請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記アフィニティ試薬が高電子密度のマーカで標識付けされている請求項 1 又は 2 の方法。

【請求項 4】

第二アフィニティ試薬が、前記分子に結合される前記アフィニティ試薬に結合される請求項 1 ~ 3 のいずれか一つの方法。

20

【請求項 5】

前記アフィニティ試薬を、前記分子が位置している細胞又は組織中に注入する請求項 1 ~ 4 のいずれか一つの方法。

【請求項 6】

前記アフィニティ試薬を含有する前記細胞又は組織を、厚さが 25 nm ~ 1 μm の範囲内の薄い切片にスライスする請求項 5 の方法。

【請求項 7】

前記試料を、アフィニティ標識付けする前に、厚さが 25 nm ~ 1 μm の範囲内の切片にスライスする請求項 1 の方法。

30

【請求項 8】

試料を、アフィニティ標識付けを行った後に凍結し、次に前記試料を、前記低線量の電子線に露出する請求項 1 ~ 7 のいずれか一つの方法。

【請求項 9】

試料をスライスした後、埋包する請求項 8 の方法。

【請求項 10】

試料の要素間の空間関係を化学固定法で固定した後、凍結及び / 又は埋包を行う請求項 1 ~ 9 のいずれか一つの方法。

【請求項 11】

試料の要素間の空間関係を埋包及び / 又は凍結によって固定した後、スライスする請求項 1 ~ 10 のいずれか一つの方法。

40

【請求項 12】

試料を、前記電子顕微鏡法のグリッド上に配置した後に凍結し、次に前記低線量の電子線に露出する請求項 1 ~ 11 のいずれか一つの方法。

【請求項 13】

データを集める前に、試料を重原子で染色する請求項 1 ~ 12 のいずれか一つの方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

50

本発明は、巨大分子及び多分子複合体の生体外及び原位置での三次元構造を分析する方法並びにその生理的環境内での構造を分析する方法に関する。

【0002】

背景

分子の機能を機械論的観点から理解するため、その構造について知識を得ることは極めて重要である。この20年間で、タンパク質、タンパク質の複合体及び核酸の多数の構造が、主としてNMR及びX線結晶構造解析法で測定されてきた。一般に、典型的なタンパク質分子を測定する場合、これらの方法で提供されるデータは、通常3より優れた分解能を提供する。分子が大型分子及びその集合体になると、その分解能が大きく低下し、多くの場合、これらの大型構造を測定することが不可能になる。これらの方法を使用して構造を測定するには、被検物体を、その生物環境（例えば細胞）から取り出すことも必要である。

10

【0003】

透過型電子顕微鏡法を利用して、リボソーム類又はスプライソソームなどの超分子集合体を、二次元で目視可能にすることができる。電子顕微鏡の一変形すなわち電子顕微鏡断層撮影法（Auerの2000年の文献：J. Mol. Med., 78巻191~202頁2000年）を使用して物体の三次元画像をつくることができる。物体の詳細な三次元再構成（three dimensional reconstruction）を行うことは、高い電子線（一般に約 $2000\text{ e}^- / \text{ }^2 / \text{データセット}$ ）が必要なため、達成することが実際には不可能であった。3D再構成を行うとき達成される分解能が低いので、構造の諸部分を特定の機能と関連づけることは困難である。

20

【0004】

透過型電子顕微鏡法は、分類した後、平均することによって、単一物体を2D及び/又は3Dで再構成するのに利用できる。この方法は約1nmの分解能を提供することができる。この種の方法は、バクテリオファージ29のコネクタタンパク質（connector protein）の特定の領域の地図を、約3nmの分解能で2DにてつくるためValléeら（1999年の文献）が利用している。この方法にはいくつもの限界がある。第一に、分析される分子は、その分子の構造特性を変化させかねない表面に直接、結合される。第二に、その単一粒子を再構成する方法は、100kDaより小さい物体を解像する（resolve）ことができない（Hendersonの1995年の文献）。第三に、この方法は、平均の構造を提供するので、原位置での構造の分析又は個々の超分子複合体の分析を行うのに有効でない。抗体認識の画像を形成する別の方法を、Raabら（1999年の文献）が提案している。この場合も、被検試料が表面に結合される。Raabらによると、動的力顕微鏡法（dynamic force microscopy）を利用することによって、ナノメートルのスケールでエピトープの地図作成を達成できるはずである。しかし、このような結果を達成できる方法の詳細は提供されていない。

30

【0005】

最近、EM-実験で、信号対雑音比を劇的に増大するアルゴリズムが報告された（SEC 511737）。そのアルゴリズムはコンピュータプログラムのCOMETに利用されている。これは、低線量の電子線を使って試験することができるので、試料は、放射線による影響が非常に少ないから実験によってかき乱されることが少ない状態にある。なお、この方法で得られる分解能は低すぎるので、物体の特定部分の明確な同定を行うことができない。

40

【0006】

発明の要約

本発明の目的は、巨大分子の物体の詳細な3次元再構成物をつくる方法を提供しそして特定のエピトープがこの物体のどこに位置しているかを決定することである。本願に記述されている発明は、エピトープに原位置で標識をつけることによって、その生理的環境内で、エピトープ類を同定するのに使用することができ、又はそれらエピトープは生体外で同定できる。エピトープを同定するには、アフィニティ試薬、すなわち一般に、対象の分子

50

の一部に対して特異的な抗体であって、小さい高電子密度のマーカ―を接合されているか又は接合されていなくてもよい抗体を、電子断層撮影法及びCOMETアルゴリズムとともに使用する必要がある。COMETを使用すると、EMT画像をとるとき電子線量は低くてよい。いささか予想外のことであるが、このような低い線量は、前記アフィニティ試薬とそのエピトープの間の相互作用を妨げない。本発明の方法は、個々の分子又は超分子複合体の3D再構成物におけるエピトープの位置確認と同定を正確に行うことができるので、長年にわたって必要と感じていたことを満足させた。特定のエピトープの位置を正確に決定する方法の性能は図1Cに例示してある。

【0007】

発明の詳細な説明

本発明は、タンパク質、核酸又はこれらの1又は2以上の複合体もしくは集合体(assembly)などの巨大分子構造体の構造を決定する方法に関する。

【0008】

四つの重要な側面は以下のように区分できる。

- 1) 低線量の電子線を使用すること。
- 2) 被検物体に、アフィニティ試薬で標識を付けること。
- 3) 多数の画像の平均ではなくて個々の物体を分析すること。
- 4) 原位置で物体を分析すること。

【0009】

被検物体の調整は下記の手順のうちのいずれかに基づいて行われる。

1) 生体外の場合、分析される物体は、溶液(例えば緩衝液)中の分子又は多分子複合体である。アフィニティ試薬(AR)を上記溶液に添加して、標的分子に結合させる。試料(この場合、被検物体とARを含有している溶液)を、グリッド上に塗布し次に氷結晶が生成しない条件下(例えば液体エタン中に浸すことによるガラス化)で凍結する。次に、その凍結試料をデータを集めるために準備する。

【0010】

2) 原位置の場合、被検物体は、機能上、関連が深い環境内(例えば細胞内)の分子又は多分子複合体である。その被検物体は、ARで標識を付けて25nm~1µm(好ましくは70~90nm)の厚さになるようにスライスしなければならない。この標識付けとスライシングは、順序を変えて実施することも考えられる。一つの場合、標識付けはスライスをを行う前に行われる。こうすることによって、研究者は、生細胞内又はかき乱されていない試料中の物体に標識を付けた後、スライスすることができる。もう一つの場合、スライシングを行った後、標識付けを行う。この場合、そのスライスにはARで標識をつける。

【0011】

標識付けを実施した後、スライスを行う場合(例えばアフィニティ試薬を細胞中に注射することによって)、次のステップは、その試料を疎水性もしくは好ましくは親水性の物質中で固定し埋包するステップでもよく、又は代わりに試料を固定し凍結してもよい。その埋包したか又は凍結した細胞を、次に、ウルトラミクロトミーと呼ばれる方法でスライスして、厚さが一般に20~100nmのいわゆる薄い切片を得る。凍結した細胞の場合、スライシング法は低温ミクロトミーと呼ばれそして得られる切片は低温切片と呼ばれる。その低温ミクロトミーは、試料中の水が無定形に保たれて氷の結晶を生じることができないような条件下で行われる。この低温ミクロトミーは、試料を冷凍防止剤、一般にスクロースの存在下で凍結させることによって達成できる。

【0012】

上記試料を次に電子ビームにかける。データを収集している間、試料のいくつもの画像(各画像は角度を少しずつ変えてとった画像である)を記録した。これら画像はいわゆるティルトシリーズ(tilt-series)を形成している。生体外の場合、データ収集は、試料を無定形状態に維持するため低温で行わねばならない。原位置の場合、データ収集は低温又は室温で実施できる。このようにして収集したデータは、次に、標準のソフトウェアを利用して加工する(Skoglundらの1996年の文献b)。これらの方法

10

20

30

40

50

は、当業技術者にとって周知の方法である。

【0013】

本発明の一実施態様で、試料中の分子上に位置する特定のエピトープの位置を確認して同定する方法が提供され、その方法は下記のステップを含んでいる。すなわち、

(a) アフィニティ試薬又は1又は2以上のこのようなアフィニティ試薬の複合体を、前記試料中の前記分子に結合させることによってアフィニティ標識付けを行い；

(b) 上記試料中の前記分子と他の要素の間の空間関係を固定し；

(c) 上記試料を電子顕微鏡法のグリッド上に配置し；

(d) その試料を、透過型電子顕微鏡の低線量電子線に露出させ；

(e) データをティルトシリーズから収集し；

10

(f) その収集したデータを利用して、個々の分子の構造を三次元で再構成し；

(g) COMETを使用して、前記再構成物(reconstruction)を改善し、前記試料中の個々の分子を目視可能にする；

ステップを含んでいる。

【0014】

別の実施態様で、前記分子上の2以上のエピトープに対する前記アフィニティ試薬を、アフィニティ標識付けのために使用する上記方法が提供される。

【0015】

さらに別の実施態様で、前記アフィニティ試薬が高電子密度のマーカーで標識付けされている上記方法が提供される。

20

【0016】

さらに別の実施態様で、第二アフィニティ試薬が、前記分子に結合される前記アフィニティ試薬に結合される上記方法が提供される。

【0017】

さらに別の実施態様で、前記アフィニティ試薬を、前記分子が位置している細胞又は組織中に注入する上記方法が提供される。

【0018】

さらに別の実施態様で、前記アフィニティ試薬を含有する前記細胞又は組織を、厚さが25nm~1µmの範囲内の薄い切片にスライスする上記方法が提供される。

【0019】

30

さらに別の実施態様で、前記試料が、アフィニティ標識付けする前に、厚さが25nm~1µmの範囲内の切片にスライスする上記方法が提供される。

【0020】

さらに別の実施態様で、試料を、アフィニティ標識付けを行った後に凍結し、次にその試料を、前記低線量の電子線に露出する上記方法が提供される。

【0021】

さらに別の実施態様で、試料をスライスした後、埋包する上記方法が提供される。

【0022】

さらに別の実施態様で、試料の要素間の空間関係を化学固定法で固定した後、凍結及び/又は埋包を行う上記方法が提供される。

40

【0023】

さらに別の実施態様で、試料の要素間の空間関係を埋包及び/又は凍結によって固定した後、スライスする上記方法が提供される。

【0024】

さらに別の実施態様で、試料を、前記電子顕微鏡法のグリッド上に配置した後に凍結し、次に前記低線量の電子線に露出する上記方法が提供される。

【0025】

上記諸実施態様の方法は、溶液内又は試料の生物学上の生体内環境内の分子の試料を試験できることに留意すべきである。

【0026】

50

本発明の一実施態様で、アフィニティ試薬が被検物体に結合される。これらのアフィニティ試薬は電子顕微鏡法を使用して可視化することができる。抗体が向かうエピトープの位置決定を行うことができる。低線量放射線を使用する利点は、非共有結合で結合されるアフィニティ試薬でさえ、そのエピトープとともに可視化することができることである。これらアフィニティ試薬は、対象のエピトープに直接向ける（直接標識付けと呼ばれる）か、又は対象のエピトープにすでに結合されている一次アフィニティ試薬に向けることができ、この場合は間接標識付けと呼ばれる。

【0027】

アフィニティ試薬の種類は、薬剤もしくは薬剤様分子及び炭水化物などの小分子から、ペプチド、ヌクレオチド、ポリペプチド及びポリヌクレオチドを経て、タンパク質、ホルモン及び抗体に至るまでの範囲で広く変えることができ、唯一の条件は、そのアフィニティ試薬が、データを収集する前又はデータ収集中に、電子線量によって、そのエピトープから放出されないということである。しかし、アフィニティ試薬が小分子である場合、例えば、高電子密度のマーカ―又は電子顕微鏡で可視化できる何らかの他の分子で、アフィニティ試薬に標識をつける必要があることがある。

10

【0028】

本発明の別の実施態様では、高電子密度のマーカ―で標識付けした抗体がアフィニティ試薬として使用される。その高電子密度のマーカ―は、電子顕微鏡によって容易に可視化することができる。

【0029】

別の実施態様では、その抗体の大きさは、その抗体を、高電子密度のマーカ―なしでも検出できる大きさである。

20

【0030】

本発明のさらに別の実施態様では、薬剤候補物などの小分子（一般に200～600Daの大きさ）は、高電子密度のマーカ―で標識付けされる。これは、その小分子が巨大分子のどこに結合できるか位置を確認するのに利用できる。

【0031】

本発明の別の実施態様では、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質を、アフィニティ試薬として使用して、研究者は、プローブ（アフィニティ試薬）と被検物体が相互に作用する部位の位置を確認して同定することができる。

30

【0032】

本発明の別の実施態様では、2種以上のプローブが、被検物体上の異なるエピトープに対するプローブとして利用される。これによって、研究者は、一実験によって、別個のエピトープの相対的位置を測定することができる。

【0033】

本発明の一実施態様で、画像のコントラストを増大することは好都合なことである。これは、データを集める前に、試料を重原子で染色する（stain）ことによって実施できる。

本発明を使用する実施例

下記実施例は、本発明を使用することによって達成される結果を示すために提供するものである。またこの実施例は、本願で特許請求されている本発明の範囲を限定するものではない。この実施例は、当業技術者が実験を繰り返すことができるように、使用される方法を提供しかつ参考文献を含んでいる。この実施例は、組織を原位置で試験する場合に使用される発明を例示している。

40

【0034】

緒言

プレメンセンジャーRNA（pre-mRNA）のスプライシングは、いわゆるスプライソソームによって実行される複雑な工程である。生体外で組立てられたスプライソソームは、酵母内で（Clarkらの1988年の文献）及び哺乳動物中で（Reedらの1988年の文献）、電子顕微鏡法によって研究されている。そのスプライソソームは、順序

50

を付けた段階的な方式で組立てられ、多数のタンパク質と核内低分子RNA (snRNA) で構成されている。スプライソソームの生体内での組立て工程と構造は余りよく分かっていない。スプライシングは、主として、活性遺伝子において又はその近くで起こるようである。スプライシング要素は、光学顕微鏡法 (例えば、Ameroraの1992年の文献; Wuらの1993年の文献; Zhangらの1994年の文献; Baurenらの1996年の文献; NeugebauerとRothの1997年の文献a) 及び電子顕微鏡法 (Kiselevaらの1994年の文献; PuvionとPuvion-Dutilleutの1996年の文献; Cmarkoらの1999年の文献) の両者によって、活性遺伝子に位置が決定されている。

【0035】

いくつもの報告が、RNAポリメラーゼIIがキャッピング、スプライシング及びポリアダニル化に関与していることを立証している (Shumanの1997年の文献; CordenとPatturajanの1997年の文献; Steinmetzの1997年の文献, NeugebauerとRothの1997年の文献b; Bentlyの1999年の文献に概説されている)。組合わせた利用可能なデータは、転写及びプレ-mRNAプロセッシングが細胞核内で密接に連結しており、かつ延長しているRNAポリメラーゼIIが、新生転写物及び異なるRNAのプロセッシング因子も含む分子複合体中に存在しているはずであることを示している。

【0036】

同時転写RNAプロセッシングのモデルにおいて、スプライシング因子を含むプロセッシング要素は、RNAポリメラーゼIIに結合している (NeugebauerとRothの1997年の文献b及びBentleyの1999年の文献参照)。しかし、このモデルのいくつもの側面は不明瞭であり、まだ生体内で分析されていない。このモデルでは、RNAポリメラーゼIIがスプライシング因子をどこでピックアップするのか及びその延長RNAポリメラーゼが、特に多重イントロン遺伝子 (multi-intron gene) を転写中、スプライシング因子をどんな程度まで保持しているか明らかでない。協調している転写とスプライシングの構造ベースについてもっと知って上記質問に答えるには、活性遺伝子の生体内の構造を研究することが非常に重要である。この点について、キロノムス・テンタンス (Chironomus tentans) の唾液腺細胞中の活性バルビアニ環3 (BR3) 遺伝子は可視化されており、そして構造が決定されている。そのBR3 30
BR3 遺伝子は長さが10.9 kbであり分泌タンパク質をコードしている。38個のイントロンが、全遺伝子全体にわたってほぼ同じ間隔で配置されており (Paulssonらの1999年の文献) そして、これらイントロンの1/2以上が転写時に同時に切除されることが分かっている (Wetterbergらの1996年の文献)。この系では、形態が損なわれていない細胞核内の顆粒と呼ばれている複合体の中の活発に転写するBR3 30
遺伝子を同定することができる。これによって、活性BR3 遺伝子の3次元 (3D) 構造を再構成するため電子断層撮影法を使用できるようになる。スプライシングが、特定のしかし動的な超分子複体内で起こることが確認された。

【0037】

本発明について、さらに一層重要なことであるが、RNAポリメラーゼとU2snRNP 40
が、スプライソソームのどこに位置しているか位置をつきとめることができる。これらの結果は、研究者が、本発明によって、特定のエピトープが分子上のどこに位置しているかを電子断層撮影法によって正確に示すことができるようになることを明確に実証している。

【0038】

構造のデータと免疫学のデータは、各顆粒が、関連する転写とスプライシングの要素を有する成長プレ-mRNA転写産物 (growing pre-mRNA transcript) であることを示している。このような顆粒は各々、「新生の転写産物とスプライシングの複合体 (nascent transcript and splicing complex)」すなわちNTS複合体と呼称する。 50

【0039】

本発明を添付図面を参照して説明する。

図1は、NTS複合体中のU2snRNPBとRNAポリメラーゼIICTDの免疫学的位置確認法を示す。

(A) 活性BR3遺伝子座を通る断面の一部。6nmの金粒子(矢印)は抗-U2snRNPB抗体による標識付けを示す。活発に転写するBR3遺伝子セグメントのみ標識付けされる。写真の右半分の不活性のコンパクトなクロマチン(Chr)の上には、金粒子が全く見えないか又はごく少数見える。4個の大きい金粒子も見える。これらの金粒子は、3Dの再構成を行うため使用され、プレパラート上に堆積させて、ティルトシリーズの写真を整列させるために使用するマーカーである。バーは長さ100nmである。

10

【0040】

(B) 抗U2snRNPB抗体で標識付けした活性BR3遺伝子セグメントを含む領域の3D再構成物の投影図である。その再構成物は、約0.5電子/ μ^2 /画像を有する低線量データからつくった。矢印は、上記二次抗体に結合した6nm金粒子をいくつか指摘している。3D再構成を行うために使用される一つの大きい金粒子も見られる(左上部)。バーの長さは50nmである。

【0041】

(C) 5nmの分解能で表面を表すように示した、Bに示す金粒子(大矢印)及び標識を付けたNTS複合体の3D再構成。金粒子(黄色)とNTS複合体(青色)の間の抗体接続部は赤色で示してある。破線はクロマチンの軸(chromatin axis)を示す。6nm金粒子は不透明物体であるから、再構成の後、いくぶん大きく見える。バーの長さは10nmである。

20

【0042】

(D) 抗-RNAポリメラーゼIICTD抗体で標識を付けた活性BR3遺伝子セグメントを含む領域の3D再構成物の投影図。その再構成物は、約0.5電子/ μ^2 /画像を有する低線量データから作った。その矢印は上記二次抗体に結合された6nm金粒子を指摘している。3D再構成を行うために使用される二つの大きい金粒子も見える。バーの長さは50nmである。

【0043】

(E) 5nmの分解能で表面を表すように示した、Dに示す金粒子(大矢印)及び標識を付けたNTS複合体の3D再構成。色のつけ方はCと同じである。破線はクロマチンの軸を示す。バーの長さは10nmである。

30

【0044】

図2は、比較実施例で得た結果を示す。この図は文献(Mirallesらの2000年の文献)中の図1である。これらの図には、前記唾液腺細胞の核細胞質内のBR粒子に関連する繊維が画かれている。(b)唾液腺の薄い凍結切片中の核細胞質BR粒子の2例を酢酸ウラニルで染色してEMで観察した。そのBR粒子は直径約50nmの高密度顆粒として見える。矢印は、BR粒子と接触し周囲の核細胞質に延びていると考えられる繊維を指摘している。(c)前記繊維内に位置するタンパク質に対するモノクローナル抗体及び金を接合された二次抗体で免疫標識された繊維の2例を示している。上のパネルは、核細胞質内に位置し、BR遺伝子と核膜の両者から離れて位置しているBR粒子を示す。バーの長さは50nmである。

40

【0045】

図3は比較実施例で得た結果を示す。この図は、文献(Mirallesらの2000年の文献)の6図である。繊維中のhrp65の位置確認(a)唾液腺の薄い凍結切片上のhrp65の免疫EM位置確認。その切片をhrp65に対する抗体とともにインキュベートし、次に金接合二次抗体とともにインキュベートした。繊維の3例(bとc)、唾液腺の薄い凍結切片上のhrp23とhrp36それぞれの免疫-EM位置確認。バーの長さは50nmである。これらの図(図2と3)は、二次元の表示であり、そして金のマーカーによって示されている抗原は、金のまわりの半径が約15nmの円内のどこかに存在

50

しているが、高い正確さで位置を確認できないことに留意すべきである。

【0046】

図4dは比較実施例で得た結果を示す。この図は文献(Miralliesらの2000年の文献)の図2dである。この図では、3次元の再構成物が作られた。図I-Vは高分解能でBR粒子を示す。しかし、粒子の特定の要素は、同定の基準がないので位置を正確に示すことができないことに留意すべきである。バーの長さは20nmである。

【0047】

定義と略語

AR - アフィニティ試薬

PVA - ポリビニルアルコール

EM - 電子顕微鏡法

TEM - 透過型電子顕微鏡法

EMT - 電子顕微鏡断層撮影法

COMET - 拘束最大エントロピー断層撮影法 (constrained maximum entropy tomography)

3D - 三次元の

【0048】

用語「試料」は、本願に開示されている場合、細胞、組織又は任意の種類容器もしくは試験管内に入っている試料などの生物学的試料又は化学的試料を意味する。

【0049】

用語「アフィニティ試薬」は、本願に開示されている場合、特定のエピトープに特異的に結合する分子を意味する。このようなアフィニティ試薬としては一般に、抗体、ペプチド、ポリペプチド、ヌクレオチド、ポリヌクレオチド、薬剤、候補薬剤、炭水化物、脂肪酸、タンパク質またはホルモンがある。

【0050】

用語「プローブ」は、本願に開示されている場合、「アフィニティ試薬」と同じ意味で使うことができる。

【0051】

用語「直接標識付け」は、本願に開示されている場合、アフィニティ試薬をマーカーで標識付けする方法を意味する。

【0052】

用語「高電子密度の」は、本願に開示されている場合、高密度の電子を有する物体の特性を意味する。このような物体の例としては一般に、ヨウ素、フェリチン及び金、ウランもしくはタングステートのような重原子がある。

【0053】

用語「エピトープ」は、本願に開示されている場合、アフィニティ試薬が認識する、分子上の特異的結合部位を意味する。

【0054】

用語「間接標識付け」は、本願に開示されている場合、対象のエピトープに結合した一次アフィニティ試薬に結合する二次アフィニティ試薬にマーカーを結合する方法を意味する。

【0055】

用語「低線量」は、本願に開示されている場合、 $35 e^- / \mu m^2$ / データセット以下の電子線量を意味する。

【0056】

用語「3D再構成」は、本願に開示されている場合、三次元画像をいくつかの二次元画像から再構成する方法を意味する。

【0057】

用語「データ収集」は、本願に開示されている場合、試料を電子に露出し、生成した画像を記録する方法を意味する。

10

20

30

40

50

【0058】

用語「ティルトシリーズ」は、本願に開示されている場合、電子断層撮影試験から収集した一組のデータを意味する。ティルトシリーズは、順にとった多数の連続画像である。各画像について、カメラは、物体に対して異なる角度で配置される。

【0059】

用語「プロセッシングデータ」は、本願に開示されている場合、Skoglundらの1996年の文献bに記述されているような、収集したデータを整列させ、再構成し次いで改善することを含んでいる。

【0060】

用語「化学固定」は、本願に開示されている場合、タンパク質及び/又は核酸を架橋する化合物、一般にグルタルアルデヒド又はホルムアルデヒドで処理する方法を意味する。 10

【0061】

用語「凍結」は、氷結晶が大きく形成されるのを防止する低温条件を意味する。この意味は、当業技術者にとって周知のことである。このような条件の一例は、圧力が1気圧で温度が-170より低いか、又は2.3Mのスクロースの存在下温度が-100より低い条件である。

【0062】

用語「超凍結切片法」又は「凍結切片法」は、試料を、凍結条件で、薄いスライス(20~90nm)に切断する方法を意味する。

【0063】

材料と方法

唾液腺の分離と化学固定

第四齡のシー・テンタンス(C. tentans)の唾液腺を、0.05Mスクロース含有0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)に2%のグルタルアルデヒドを添加した液で4にて2hr固定し、次に、グルタルアルデヒドなしの同じ緩衝液内で15分間ずつ4回洗浄した。

【0064】

クロモソームの分離と抗体の標識付け

唾液腺を、TKM(10mM トリエタノールアミン-HCl、pH7.0、100mM KCl、及び1mM MgCl₂)に2%のパラホルムアルデヒドを添加した液で4にて2分間固定した後、小ガラスピペットで採取することによってクロモソームIVを分離した(Bjoekrothらの1988年の文献; Kiselevaらの1994年の文献)。次にクロモソームIVをシリコーン処理したスライドガラスに移し、室温の4%パラホルムアルデヒド含有TKMで30分間固定した後、Sunらの1998年の文献に記述されているようにして免疫反応を実施した。そのクロモソームを2%グルタルアルデヒド含有TKMで1hr、後固定を行った。免疫標識されていないクロモソームを、分離した後、グルタルアルデヒド含有TKMで直接固定した。我々が試験することができたRNAポリメラーゼIICTDとすべてのhnRNPとスプライシング因子(2種のSRタンパク質、2種のhnRNPタンパク質、U1snRNP及びU2snRNP)は、これらの条件中、活性BR3遺伝子セグメントに結合したままである。 30 40

【0065】

ヤギ抗-ショウジョウバエ(Drosophila)RNAポリメラーゼIIo抗体(すなわちRNAポリメラーゼIIの大サブユニットの過リン酸化CTD)、「gAP-PCTD」は、Arno L. Greenleaf博士(米国Duke University Medical Center)からの親切な寄贈品である。マウスの抗-U2snRNPB抗体は、ICN Pharmaceuticals, Inc.から購入した。両方の抗体は、ウエスタンブロット法に特有のものである。6nmの金粒子を接合された二次IgG抗体は、Jackson Immuno Research Labs, Inc.から購入した。

【0066】

埋包、染色及び切片作製

試料（無傷の腺と分離したクロモソーム）はすべて、グルタルアルデヒドで固定した後、同じ方式（Bjorkrothらの1988年の文献）で脱水し次に埋包した。その分離したクロモソームは、シリコン処理をしたスライドガラスの上面で埋包した。その分離したクロモソームを含有するプラスチックを、液体窒素で冷却した後、かみそりで、スライドガラスから取り外した。対象の領域を切り離し、台にのせて60nm又は100nmの切片をつくった。これらの切片をEMのグリッドの上に置き（一連の切片を配列した）、次に2%の酢酸ウラニル含有エタノールで5分間染色した。上記配列のマーカースとして使用されるコロイドの10nm金マーカース（Auroprobe EM GAD IgG G19、Amersham）を、前記切片の上面に添加した。その金マーカースを1：3の比率で希釈し、グリッドとともに8～10分間インキュベートした。そのグリッドは最終的に水で3回洗浄してから風乾した。

【0067】データの収集

切片にした核の中のクロモソームのティルトシリーズ（データセット）は、前記標本を、前照射（pre-irradiation）して、前記ティルトシリーズ中、ビーム方向に20%初期収縮させてそれ以上収縮するのを防止した後、非弾性散乱フィルターを使って80kVの加速電圧でZeiss EM 902透過型電子顕微鏡に手で記録した。32000倍の倍率を利用し、+60°から-60°まで5°毎に記録して、合計25個の投影図を得た。試料が放射線で損傷するのを抑制するため、二つのエキストラゼロデグリーティルト（extra zero-degree tilt）を、前記ティルトシリーズの前後に記録した。改善されたティルトシリーズだけをその後、処理し、次に、そのネガタイプを、ラスタサイズ（raster size）が25μmのOptronics P-1000ドラムスキャナーで走査した。免疫標識されたクロモソームを含む分離されたクロモソームのティルトシリーズは、TVIPS（ドイツ、Gauting所在のTVIPS GmbH）検出システムとEmmenuソフトウェアを使用して、Philips CEM 200 FEG透過型電子顕微鏡に、自動的に記録した。このソフトウェアは、ティルティング、焦点調節、トラッキング及びデータ収集を制御する。上記加速電圧は200kVであり、倍率は26700倍であり、そして写真は、ラスタサイズ14μmの2048×2048画素のCCDチップに直接記録した。+60°から-60°までの間2°毎に、61枚の写真を記録した。完全なティルトシリーズに対する全線量は、30電子/cm²未満であった。これらの条件中、収縮は全く検出できなかった（Mirallésらの2000年の文献）。原位置でのクロモソームのティルトシリーズは画素サイズ7.8でデジタル化し、そして分離されたクロモソームのティルトシリーズは画素サイズ5.2でデジタル化した。切片にした核の中のクロモソームのティルトシリーズのデジタル化領域の全体の大きさは1.25μm×1.25μmであり、そして分離されたクロモソームの場合は1.07μm×1.07μmであった。

【0068】3D再構成

データは、ETソフトウェアパッケージバージョン3.4（Skoglundらの1996年の文献b）を使って処理した（整列させ、再構成し次いで改善した）。画像プロセッシングはすべて、Compaqワークステーション（500a）とGS60サーバーで行った。10nmのコロイド金マーカースを、異なる投影図を並べるために使用した。平均の配列誤差は5 未満であった。デジタル化された原位置の領域全体を、フィルターされたバックプロジェクションの原理（filtered back-projection principle）を使用して再構成した。個々の再構成物をCOMET（Skoglundらの1996年の文献a）を利用してさらに改善して、実験データに良好に適合させ、信号/雑音比を改善し、そして重要な密度だけを保持させた。最終的に、その再構成された密度は、低域フィルターされて、均一な分解能になった。

【0069】

約300×300×100nmの領域を第一に、7.5μmの分解能で分析した。選択された構造体をさらに再構成し次いで5nmで分析した。Bob (Ken Chin - Purcell, Minnesota Supercomputing Center Inc. フリーウェア) を容積レンダリングのために使用し、そして、XTV (Skoglundらの1996年の文献b) 及びAVS/Expressバージョン4.0 (Advanced Visual Systems, Inc) はともに表面レンダリングのために使用した。個々のNTS複合体の容積は、あつらえのエンベロープ内にボクセルを加えることによって測定した(対象の密度だけをXIVソフトウェアを使って切り離した)。密度のしきい値すなわち一般に平均密度+2標準偏差を超えたボクセルだけを加えた。原位置の切片に比べて埋包して分離したクロモソーム由来の遺伝子セグメントの線形伸長部分は、分離されたクロモソームの場合、約20%の収縮率を示したが、これは試料の処理が異なることが原因である可能性が最も高い。この線収縮率は、原位置の切片と比べて、約50%の容積の等方性収縮率に相当する。

10

従来技術の比較実施例

Mirallesらの2000年の文献: J. Cell Biol. 148巻271~282頁には、本発明の前に得られた情報の実施例が示されている。図1と6は、COMETを使用せずに達成された低分解能画像の典型的な実施例を示している。この実施例で使用した抗体は、画像を3D再構成する場合には使用されず、低分解能である。図2dには、画像を3D再構成する場合にCOMETを使用したとき達成された結果が示されている。図2dでは、エピトープを同定するのに抗体が全く使用されなかったので、物体の特定要素を同定することは不可能である。

20

【0070】

RNAポリメラーゼIICTD及びU2snRNPBタンパク質の免疫学的位置確認

RNAポリメラーゼIIのCTD及びBR3遺伝子セグメント中のU2snRNPB特異的Bタンパク質の位置を、免疫学的標識付けで決定した。

【0071】

これらの実験には、分離したクロモソームIVを使用した。というのは、そのクロモソームが唾液腺の切片と比べて、抗体反応が一層効率的だからである。活性BR3遺伝子セグメントの特異的な金による標識付けは、抗RNAポリメラーゼIICTD抗体と抗U2snRNPB抗体の両者の場合に達成された。金粒子の99%以上(抗U2snRNPB抗体の場合)及び97%以上(抗RNAポリメラーゼIICTD抗体の場合)が活性遺伝子セグメントと結合しており、非常に少数の粒子だけが他の領域に見られた(図1A参照)。セクション内に完全に位置している金粒子を3D再構成する場合、83%以上(RNAポリメラーゼIICTD抗体の場合)及び97%以上(抗U2snRNPB抗体の場合)がNTS複合体に特異的に接合していた(下記参照)。非特異的抗体を使用したところ(データは記載していない)、ごく少数の金粒子(抗U2snRNPB抗体と抗RNAポリメラーゼCTD抗体それぞれとともに見られる数は1%未満と3%未満)が見られ、しかも、これらの金粒子は、クロモソームの他の部分に対してランダムに分布していた。

30

【0072】

免疫金標識付けは、転写BR3遺伝子セグメントに対して明らかに特異的であった(図1A)が、二次元では、活性遺伝子セグメントのどの部分が標識付けされているのか正確に決定することは不可能であった(図1BとD)。免疫染色した活性BR3遺伝子を3D再構成することによって、その抗原のNTS複合体における位置決定を高い正確さでできるようになる。一般に、免疫染色及び3D再構成を組み合わせると、エピトープの地図をつくることができ、超分子構造中の個々の要素の位置を決定する可能性が有意に改善され、こうしてこのような構造の組成が細かく調べられる。

40

【0073】

大部分の金粒子からの明らかな細い高電子密度の接続部が3D再構成物中に見られた。この接続部は金粒子から10~20nm延び、そして、NTS複合体だけがU2snRNPB

50

B 抗体で標識付けされていることが観察された。この場合、大部分の接続部が、N T S 複合体の一部に接続しクロマチン軸に対し反対の方向に向いている(図1C)。さらに、抗RNAポリメラーゼI I C T D抗体による、前記遺伝子セグメントのN T S 複合体の標識付けだけが観察された。N T S 複合体間のクロマチン軸は標識付けされていなかった。このことは、各N T S 複合体が新生転写産物を含んでいるので、RNAポリメラーゼI I は各N T S 複合体中に存在していることになるという活性遺伝子セグメントの構造からの解釈を支持している。抗RNAポリメラーゼI I C T D抗体とN T S 複合体に結合されている金粒子間の大部分の接続部は、クロマチン軸に最も近いN T S 複合体の領域に観察された(図1E)。

【0074】

これらの免疫標識実験は、RNAポリメラーゼI Iの大きいサブユニットのC T D及びU 2 s n R N P B がともに、クロマチン軸にそってN T S 複合体に位置を確認できることを示している。さらに、本発明に関連するデータは、N T S 複体内の上記二つの要素の異なる位置、すなわちクロマチン軸に最も近いRNAポリメラーゼI I C T D及びN T S 複合体のさらに内部のU 2 s n R N Pを指摘するのに十分に高い分解能のデータである。

【参考文献】

【0075】

参考文献

Amero, S.A., Raychaudhuri, G, Cass, C.L., van Venrooij, W.J., Habets, W.J., Krainer, A.R., and Beyer, A.L. (1992) Independent deposition of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and small nuclear ribonucleoprotein particles at sites of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 8409-8413.

10

Auer, J. *Mol. Med.*, 78: 191-202, (2000)

Baurén, G., Jiang, W.-Q., Bernholm, K., Gu, F., and Wieslander, L. (1996) Demonstration of a dynamic, transcription dependent organization of pre-mRNA splicing factors in polytene nuclei. *J. Cell Biol.* 133, 929-941.

Bentley, D. (1999) Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 347-351.

20

Björkroth, B., Ericsson, C., Lamb, M.M., and Daneholt, B. (1988) Structure of the chromatin axis during transcription. *Chromosoma* 96, 333-340.

Clark, M.W., Goelz, S., and Abelson, J. (1988) Electron microscopic identification of the yeast spliceosome. *EMBO J.* 7, 3829-3836.

30

Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.-D., van Driel, R., and Fakan, S. (1999) Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell.* 10, 211-223.

Corden, J.L. and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem. Sci.* 22, 413-416.

40

Henderson, R., The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q Rev Biophys.*, (1995) May; 28(2): 171-93

Kiseleva, E., Wurtz, T., Visa, N., and Daneholt, B. (1994) Assembly and disassembly of spliceosomes along a specific pre-messenger RNP fiber. *EMBO J.* 13, 6052-6061. 10

Miralles, F., Öfverstedt, L.-Ö., Sabri, N., Aissouni, Y., Hellman, U., Skoglund, U. and Visa, N. (2000) Electron tomography reveals posttranscriptional binding of pre-mRNPs to specific fibers in the nucleoplasm. *J. Cell Biol.* 148, 271-282.

Neugebauer, K.M., and Roth, M.B. (1997a) Distribution of pre-mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes & Dev.* 11, 1148-1159. 20

Neugebauer, K.M., and Roth, M.B. (1997b) Transcription units as RNA processing units. *Genes & Dev.* 11: 3279-3285.

Paulsson, G., Lendahl, U., Galli, J., Ericsson, C., and Wieslander, L. (1990) The Balbiani Ring 3 gene in *Chironomus tentans* has a diverged repetitive structure split by many introns. *J. Mol. Biol.* 211, 331-349. 30

Puvion, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1996) Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: role of perichromatin fibrils and interchromatin granules. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.

Raab et al. Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nature Biotechnology*, (1999), Sept., 17: 902-905 40

Reed, R., Griffith, J., and Maniatis, T. (1988) Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell* 53, 949-961.

Shuman, S. (1997) Origins of mRNA identity: Capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12758-12760.

Skoglund, U., Öfverstedt, L.-G., Burnett, R., and Bricogne, G. (1996a) Maximum-entropy three-dimensional reconstruction with deconvolution of the contrast transfer function, a test application with adenovirus. *J. Struct. Biol.* 117, 173-188.

10

Skoglund, U., Öfverstedt, L.-G., and Daneholt, B. (1996b) Procedures for three-dimensional reconstruction from thin slices with electron tomography, In *RNP particles, Splicing and Immunodiseases*. Springer Lab Manual, J.Schenkel, ed. (Springer-Verlag, Heidelberg), pp. 72-94.

20

Steinmetz, E.J. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: The tail that wags the dog. *Cell* 89, 491-494.

Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A., Visa, N., Aissouni, Y., Zhao, J. and Daneholt, B. (1998) The hrp23 protein in the Balbiani ring pre-mRNP particles is released just before or at the binding of the particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 142, 1-13.

30

Valle et al. Selection of antibody probes to correlate protein sequence domains with their structural distribution. *Protein Science*, (1999) 8: 883-889

Wetterberg, I., Baurén, G., and Wieslander, L. (1996) The intranuclear site of excision of each intron in the Balbiani Ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA* 2, 641-651.

40

Wu, Z., Murphy, C., Callan, H.G. and Gall, J.G. (1993) Small nuclear ribonucleoproteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the amphibian germinal vesicle: Loops, spheres, and snurposomes. *J. Cell Biol.* 113, 465-483.

Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Green, M.R., (1994) Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】NTS複合体中のU2snRNPB とRNAポリメラーゼIICTDの免疫学 50

的位置確認法を示す。

【図2】比較実験で得た結果を示す。

【図3】比較実験で得た結果を示す。

【図4】比較実験で得た結果を示す。

【図1】

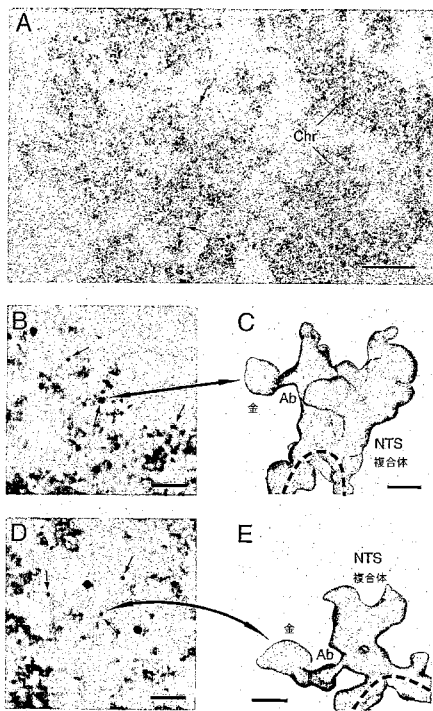


Figure 1

【図2】

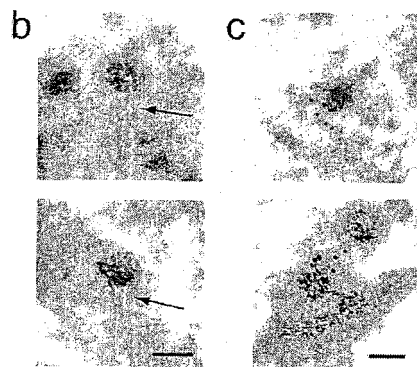


Figure 2

【 図 3 】

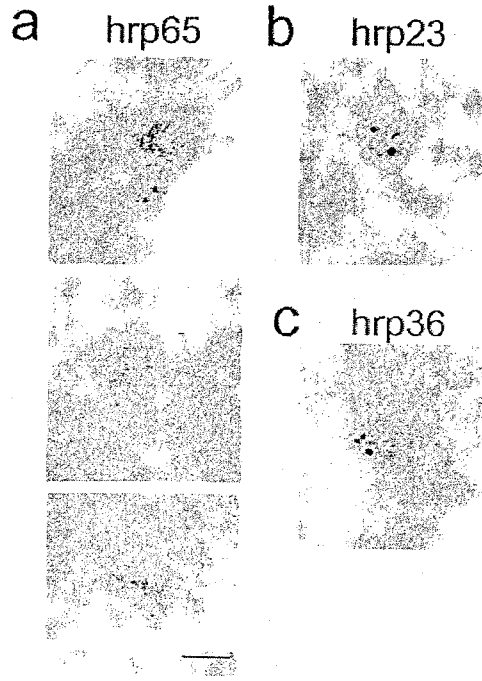


Figure 3

【 図 4 】

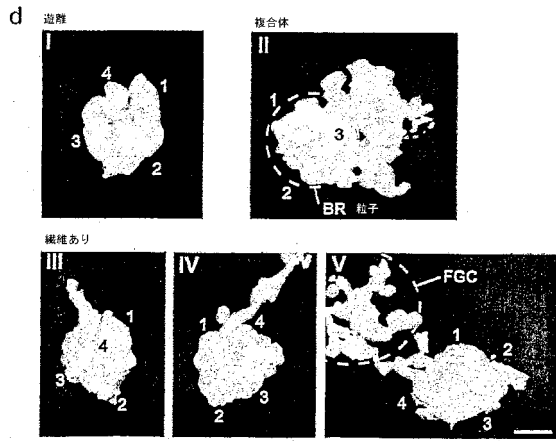


Figure 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/071336 A1

(51) International Patent Classification: G06T 11/00, (74) Agents: BERGSTRAND, Mikael et al.; Albhins Stockholm AB, Box 5581, S-114 85 Stockholm (SE).

(21) International Application Number: PCT/SE02/00354

(22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0100728-5 5 March 2001 (05.03.2001) SE

(71) Applicant (for all designated States except US): SIDEC TECHNOLOGIES AB [SE/SE]; Fogelvären 2 A, S-171 77 Stockholm (SE).

(72) Inventors; and

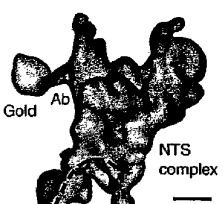
(75) Inventors/Applicants (for US only): SKOGLUND, Ulf [SE/SE]; Snäckvägen 34, S-141 39 Huddinge (SE). VISA, Neus [SE/SE]; Snäckvägen 34, S-141 39 Huddinge (SE).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

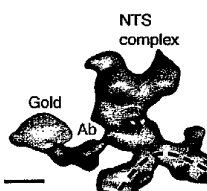
(54) Title: METHOD FOR LOCALIZING AND IDENTIFYING EPTIOPES



(57) Abstract: The present invention relates to a method for localizing and identifying specific epitopes on a molecule. The molecule of interest can be localized in a cell or in a test tube. The invention is based on the use of electron microscopy in combination with specific labeling of the epitopes by e.g. antibodies. The electron microscopy is performed using a very low electron dose, which allows the labeling molecules to remain bound to their epitopes. Furthermore, the method allows for studies of molecules in their biological context.



WO 02/071336 A1



WO 02/071336 A1 

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/071336

PCT/SE02/00354

Method for Localizing and Identifying Epitopes

TECHNICAL FIELD

5 This invention relates to a method for three-dimensional structural analyses of macromolecules and multi-molecular complexes *in vitro* and *in situ* and for analyzing the structure in its physiological context.

BACKGROUND

10

In order to understand the function of molecules from a mechanistic point of view, it is of great importance to gain knowledge about the structure. During the last 20 years, a number of structures of proteins and complexes of proteins and nucleic acids have been determined, mainly by NMR and X-ray crystallography. In general, when studying typical protein molecules, the data provided by these methods usually gives a resolution better than 3Å. When it comes to large-scale molecules and assemblies thereof, the resolution becomes much worse and in many cases it is not possible to study these large-scale structures. For structural studies using these methods, it is also necessary to bring the object under study out of its biological context (e.g. a cell).

20

By using transmission electron microscopy, it is possible to visualize, in two dimensions, supramolecular assemblies such as ribosomes or spliceosomes. A variant of electron microscopy, electron microscope tomography (Auer, J. Mol. Med., 78: 191-202, (2000)), can be used to generate a three dimensional image of an object. A detailed three dimensional reconstruction of the object has been practically impossible to accomplish due to the high electron radiation (typically ca 2000 e⁻/Å²/dataset) required.

25

Due to the low resolution achieved when making a 3D reconstruction, it is difficult to associate parts of the structure with a specific function.

30

WO 02/071336

2

PCT/SE02/00354

A transmission electron microscopy method is available for 2D and/or 3D reconstructions of single objects by averaging after classification. This method can give a resolution of about 1 nm. This type of approach has been applied by Valle et al. (1999) to map specific domains of the connector protein of bacteriophage $\phi 29$ in 2D at about 3 nm resolution. This approach has some limitations. First, the molecules analyzed are directly attached to a surface which might cause alterations in their structural properties. Second, the single particle reconstruction method cannot resolve objects smaller than 100 kDa (Henderson, 1995). Third, this method provides average structures and consequently is not useful for analyses of structures in situ, or analyses of individual supramolecular complexes.

An alternative method for imaging antibody recognition has been proposed by Raab et al. (1999). In this case, the specimen under study is also attached to a surface. According to Raab et al., it should be possible to accomplish epitope mapping at the nanometer scale by using dynamic force microscopy. However, the details of how such a result can be achieved are not presented.

Recently, an algorithm for dramatically increasing the signal-to-noise ratio in EM-experiments was described (SE C 511 737). The algorithm is applied in a computer program, COMET. This allows studies using low dose electron radiation and the sample is thereby much less affected by the radiation and therefore in a state that is less perturbed by the experiment. Still, the resolution obtained with this method is too low to allow for unambiguous identification of specific parts of the object.

SUMMARY OF THE INVENTION

An object of the invention is to provide a method to make a detailed three-dimensional reconstruction of a macromolecular object and to determine where specific epitopes are located on this object. The invention as described herein can be used for identification of epitopes in their physiological context by labeling the epitopes *in situ*, or the epitopes can be identified *in vitro*. Identification of the epitopes involves the use of affinity reagents, typically antibodies, specific for a part

WO 02/071336

3

PCT/SE02/00354

of the molecule of interest, which may or may not be conjugated with small electron dense markers, together with electron tomography and the COMET algorithm. The use of COMET allows for low electron doses when taking EMT images. Somewhat surprisingly, these low doses do not disturb the interaction between the affinity reagent and its epitope. The method according to the invention allows a precise localization and identification of the epitope in the 3D reconstruction of an individual molecule or supramolecular complex, thus satisfying a long felt need. The ability of the method to pinpoint the location of specific epitopes is exemplified in figure 1C.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for structural studies of macromolecular structures such as protein, nucleic acids or complexes or assemblies of one or more of these.

15

Four crucial aspects can be discerned:

- 1) Use of low dose electron radiation.
- 2) Labeling the object under study with affinity reagents.
- 20 3) Analysis of individual objects rather than averages of a multitude of images
- 4) Analysis of objects in situ.

The preparation of the object under study is based on either of the following procedures:

25

- 1) In the *in vitro* case, the object to be analyzed is a molecule or multimolecular complex in solution (e.g. in buffer). The affinity reagent (AR) is added to the solution and allowed to bind to the target molecule. The sample (in this case a solution containing the object under study plus the AR) is then applied onto a grid and frozen under conditions where no ice-crystals are formed (e.g. vitrification by plunging into liquid ethane). The frozen sample is then ready for data collection.

30

- 2) In the *in situ* case, the object under study is a molecule or multimolecular complex in a functionally relevant context (e.g. in a cell). The object under study has to be labeled with AR and sliced to obtain 25nm-1 μ m (preferably 70-90nm). Labeling and slicing can be envisioned to be performed in different order. In one case, the labeling is performed prior to the slicing. This enables the investigator to label objects in a living cell or unperturbed specimen prior to the slicing. In another case, the slicing is performed prior to the labeling. In this case, the slices are labeled with the AR.
- 5
- 10 In the case where labeling is performed prior to slicing (e.g. by injection of affinity reagents into a cell), the next step may be to fix and embed the specimen in a hydrophobic or, preferably, hydrophilic substance, or, alternatively, the specimen may be fixed and frozen.
- 15 The embedded or frozen cell is then sliced in a procedure termed ultra-microtomy, yielding so-called thin sections, with a thickness between typically 20 and 100 nm. In the case of frozen cells, the slicing procedure is termed cryo-microtomy, and the resulting section cryo-section. The cryo-microtomy is performed under conditions such as that the water in the sample is kept in amorphous form, not being allowed to form ice crystals. This can be achieved by freezing the specimen in the presence of a cryo protectant, typically sucrose.
- 20
- The sample is then subjected to an electron beam. During data collection, several images are recorded of the sample, each image from a slightly different angle. These images form a so-called tilt-series. In the *in vitro* case, data collection should be performed at low temperature to maintain the amorphous state of the sample. In the *in situ* case, data collection may be performed either at low temperature or at room temperature. The data collected in such a fashion is then processed, using standard software (Skoglund et al., 1996b). These procedures are well known to a person skilled in the art.
- 25
- 30

WO 02/071336

5

PCT/SE02/00354

In one embodiment of the present invention, a method for localizing and identifying specific epitopes located on a molecule in a specimen is provided, comprising the steps of;

- 5 (a) performing affinity labeling by binding an affinity reagent, or a complex of one or more such affinity reagents to said molecule in said specimen;
- (b) fixing the spatial relationships between said molecules and other components of the sample;
- (c) applying the sample on an electron microscopy grid;
- 10 (d) exposing the specimen to low-dose electron radiation in a transmission electron microscope;
- (e) collecting data from a tilt-series;
- (f) using the collected data to reconstruct, in three dimensions, the structures of individual molecules;
- 15 (g) refining said reconstructions using COMET to enable the visualization of the individual molecules in said specimen.

In a further embodiment, a method according to the above is provided, whereby said affinity reagents directed against two or more epitopes on said molecule are employed for affinity labeling.

20

In a further embodiment, a method according to the above is, whereby said affinity reagent is labeled with an electron-dense marker.

In a further embodiment, a method according to the above is, whereby a second affinity reagent is bound to said affinity reagent, which is bound to said molecule.

25

In a further embodiment, a method according to the above is, whereby said affinity reagents are injected into a cell or tissue in which said molecule is located.

WO 02/071336

6

PCT/SE02/00354

In a further embodiment, a method according to the above is, whereby said cell or tissue containing said affinity reagent is sliced into thin sections of a thickness in the range of 25nm-1 μ m.

- 5 In a further embodiment, a method according to the above is, whereby said specimen is sliced in sections of a thickness in the range of 25nm-1 μ m prior to affinity labeling.

- 10 In a further embodiment, a method according to the above is, in which the sample is frozen after affinity labeling and prior to exposing said sample to said low-dose electron radiation.

In a further embodiment, a method according to the above is provided, in which the sample is sliced before embedding.

15

In a further embodiment, a method according to the above is provided, in which the spatial relationships between components of the sample are fixed by chemical fixation prior to freezing and/or embedding.

- 20 In a further embodiment, a method according to the above is provided, in which the spatial relationships between components of the sample are fixed by embedding and/or freezing prior to slicing.

- 25 In a further embodiment, a method according to the above is provided, in which the sample is frozen after being placed on said electron microscopy grid and prior to exposing to said low-dose electron radiation

- 30 It should be noted that the procedure in the above mentioned embodiments allows for studying samples of molecules in solution or in their biological in vivo environment.

WO 02/071336

7

PCT/SE02/00354

In one embodiment of the invention, affinity reagents are bound to the object under study. These affinity reagents can be visualized using electron microscopy and the epitope against which the antibody is directed can be located.

5 The advantage of using low dose radiation is that even non-covalently bound affinity reagents can be visualized together with its epitope. The affinity reagents may be either directed directly against the epitope of interest, so called direct labeling, or they may be directed against a primary affinity reagent already bound to the epitope of interest, this be termed indirect labeling.

10 The nature of the affinity reagent can vary widely, ranging from small molecules such as drugs or drug-like molecules and carbohydrates, via peptides, nucleotides, polypeptides, and polynucleotides to proteins, hormones and antibodies, the only condition being that the affinity reagent will not be displaced from its epitope by the electron dose prior to or during data collection. However, in the case of the affinity
15 reagent being a small molecule, it may be needed to label it with e.g. an electron-dense marker or some other molecule that can be visualized in an electron microscope.

In another embodiment of the invention, an antibody labeled with an electron-dense
20 marker is used as an affinity reagent. The electron dense-marker can be readily visualized by the electron microscope.

In another embodiment, the size of the antibody may allow the detection of the antibody even in the absence of an electron-dense marker.

25 In yet another embodiment of the invention, a small molecule, such as a drug candidate (typically with a size of 200-600 Da) is labeled to an electron-dense marker. This may be used for localizing where on a macromolecule the small molecule may bind.

30

WO 02/071336

8

PCT/SE02/00354

In another embodiment of the invention, a nucleotide, polynucleotide, peptide, polypeptide or protein may be used as an affinity reagent to enable the investigator to localize and identify the site of interaction between the probe (affinity reagent) and the object under study.

5

In another embodiment of the invention, two or more probes directed against different epitopes on the object under study. This may allow the investigator to study the relative positions of separate epitopes in one experiment.

10

In one embodiment of the invention, it may be favorable to increase the contrast in the images. This may be done by staining the sample with heavy atoms prior to data collection.

EXAMPLE ON THE USE OF THE INVENTION

15

The following example is given for illustrating the results achieved by using the invention. It is not intended to limit the scope of the invention claimed herein. The example presents the methods used and contains references so that a person skilled in the art can repeat the experiment. This will exemplify the invention used in the case of studying tissue *in situ*.

20

Introduction

Splicing of pre-messenger RNA (pre-mRNA) is a complex process carried out by so called spliceosomes. Spliceosomes assembled *in vitro* have been investigated by electron microscopy in yeast (Clark et al., 1988) and in mammals (Reed et al., 1988). The spliceosome is assembled in an ordered and stepwise manner and is composed of a multitude of proteins and small nuclear RNAs (snRNAs).

25

The assembly process and the structure of spliceosomes *in vivo* are less well known. Splicing seems mainly to take place at, or close to, the active genes. Splicing components have been located to active genes, both by light microscopy (e.g., Amero et al., 1992; Wu et al., 1993; Zhang et al., 1994; Baurén et al., 1996;

30

WO 02/071336

9

PCT/SE02/00354

Neugebauer and Roth, 1997a) and by electron microscopy (Kiseleva et al., 1994; Puvion and Puvion-Dutilleul, 1996; Cmarko et al., 1999).

5 Several reports have established that the RNA polymerase II is involved in capping, splicing and polyadenylation (reviewed in Shuman, 1997; Corden and Patturajan, 1997; Steinmetz, 1997, Neugebauer and Roth, 1997b; Bentley, 1999). Combined, available data show that transcription and pre-mRNA processing are closely coupled in the cell nucleus and that the elongating RNA polymerase II should be present in a molecular complex that also contains the nascent transcript and
10 different RNA processing factors.

In the model of co-transcriptional RNA processing, processing components, including splicing factors, bind to the RNA polymerase II (see Neugebauer and Roth, 1997b; Bentley, 1999). Several aspects of this model are however unclear and
15 remain to be analyzed *in vivo*. It is unclear in the model where the RNA polymerase II picks up splicing factors and to what extent the elongating RNA polymerase carries splicing factors, particularly during transcription of multi-intron genes. To learn more about the structural basis of the coordinated transcription and splicing and answer the above questions, it is of great importance to study the *in*
20 *vivo* structure of active genes.

Here, the active Balbiani ring 3 (BR3) gene in salivary gland cells of *Chironomus tentans* has been visualized and structurally characterized. The BR3 gene is 10.9 kb long and encodes a secretory protein. 38 introns are approximately evenly spaced throughout the whole gene (Paulsson et al., 1990), and it is known that more than
25 half of these introns are co-transcriptionally excised (Wetterberg et al., 1996). In this system, it is possible to identify the actively transcribing BR3 gene, in a complex termed granules, in the morphologically intact cell nucleus. This has enabled the use of electron tomography for reconstructing the three-dimensional (3D) structure of the active BR3 gene. It was demonstrated that splicing occurs
30 within a defined, but dynamic, supramolecular complex.

WO 02/071336

10

PCT/SE02/00354

Additionally and more importantly in the context of the invention, it is possible to localize where on the spliceosome the RNA polymerase and the U2 snRNP are located.

5 These results clearly demonstrate that the invention enables the investigators to pinpoint, by electron-tomography, where on a molecule a specific epitope is located.

10 Structural and immunological data show that each granule is a growing pre-mRNA transcript with its associated transcription and splicing components. Each such granule will be referred to as a "nascent transcript and splicing complex", NTS complex.

The invention will be described with reference to the enclosed figures, in which:

15 Figure 1 demonstrates the immunolocalization of the U2 snRNP B" and the RNA polymerase II CTD in NTS complexes.

20 A), part of a section through the active BR3 gene locus. The 6 nm gold particles (arrows) show labeling with the anti-U2 snRNP B" antibody. Only actively transcribing BR3 gene segments are labeled. None or very few gold particles are seen over the inactive, compact, chromatin (Chr) in the right half of the picture. Four large gold particles are also seen. These are markers deposited on the preparation and used for alignment of the pictures in a tilt series, used for 3D reconstruction. Bar, 100 nm;

25 (B), projection of a 3D reconstruction of an area containing active BR3 gene segments, labeled with the anti-U2 snRNP B" antibody. The reconstruction has been made from low dose data with about 0.5 electrons/Å²/image. Arrows point out some of the 6 nm gold particles attached to the secondary antibody. One large gold particle, used for 3D reconstruction is also seen (top left). Bar, 50 nm;

30 (C), 3D reconstruction of the gold particle indicated in B (large arrow) and the labeled NTS complex, shown as surface rendering at 5 nm resolution. The

antibody connection between the gold particle (yellow) and the NTS complex (blue) is shown in red. The dashed line indicates the chromatin axis. The 6 nm gold particle appears somewhat larger after reconstruction because it is a non-transparent object. Bar, 10 nm;

5 (D), projection of a 3D reconstruction of an area containing active BR3 gene segments, labeled with anti-RNA polymerase II CTD antibodies. The reconstruction has been made from low dose data with about 0.5 electrons/Å²/image. The arrows point out the 6 nm gold particles attached to the secondary antibody. Two large gold particles, used for 3D
10 reconstruction, are also seen. Bar, 50 nm;

(E), 3D reconstruction of the gold particle indicated in D (large arrow) and the labeled NTS complex, shown as surface rendering at 5 nm resolution. The color-coding is as in C. The dashed line indicates the chromatin axis. Bar,
15 10 nm;

Figure 2 demonstrates results obtained in the comparative example. This figure is number 1 in the manuscript (Miralles et al, 2000).

In the figures are depicted fibers associated with BR particles in the nucleoplasm of the salivary gland cells. (b) Two examples of nucleoplasmic BR particles in a thin cryosection of a salivary gland stained with uranyl acetate and observed in the EM.
20 The BR particles appear as dense granules with a diameter of ca 50nm. The arrows point at fibers that seem to contact the BR particle and extend into the surrounding nucleoplasm. (c) Two examples of fibers immunolabeled with a monoclonal antibody against a protein located in the fibers and gold-conjugated secondary
25 antibody. The top panel shows a BR particle located in the nucleoplasm, far from both the BR gene and the nuclear envelope. Bars, 50 nm;

Figure 3 demonstrates results obtained in the comparative example. This figure is number 6 in the manuscript (Miralles et al, 2000). Localization of hrp65 in fibers.

30 (a) Immuno-EM localization of hrp65 on thin cryosections of salivary glands. The sections were incubated with antibodies against hrp65, and with a gold-conjugated

WO 02/071336

12

PCT/SE02/00354

secondary antibody. Three examples of fibers (b and c) Immuno-EM localization of hrp23 and hrp36, respectively on thin cryosections of salivary glands. Bar, 50 nm. It should be noted that these figures (2 and 3) are two-dimensional representations and that the antigen designated by the gold marker is present somewhere around the gold within a circle with a radius of approximately 15 nm, but it cannot be localized with higher precision.

Figure 4d demonstrates results obtained in the comparative example. This figure is number 2d in the manuscript (Miralles et al, 2000). In this figure, a three dimensional reconstruction has been made. The figures I-V show BR particles to a higher resolution. It should be noted however, that specific components of the particles cannot be pinpointed due to lack of identification criteria. Bar, 20 nm.

Definitions and abbreviations

15

AR- Affinity reagent

PVA - Polyvinyl alcohol

EM - Electron microscopy

TEM - Transmission electron microscopy

20

EMT - Electron microscope tomography

COMET - Constrained maximum entropy tomography

3D - Three dimensional

As disclosed herein, the term "specimen" relates to a biological or chemical sample, such as a cell, tissue, or sample located in a container or test tube of any kind.

As disclosed herein, the term "affinity reagent" relates to molecules that bind specifically to certain epitopes. Such affinity reagents typically include antibodies, peptides, polypeptides, nucleotides, polynucleotides, drugs, candidate drugs, carbohydrates, fatty acids, proteins, or hormones.

30

WO 02/071336

13

PCT/SE02/00354

As disclosed herein, the term "probe" can be used with the same meaning as "affinity reagent".

5 As disclosed herein, the term "direct labeling" relates to a method wherein the affinity reagent is labeled with a marker.

10 As disclosed herein, the term "electron dense" relates to a property of objects having a high density of electrons. Examples of such objects typically include iodine, ferritin, and heavy atoms such as gold, uranium or tungstate.

As disclosed herein, the term "epitope" relates to a specific binding site on a molecule recognized by an affinity reagent.

15 As disclosed herein, the term "indirect labeling" refers to a method where the marker is attached to a secondary affinity reagent that binds to the primary affinity reagent bound to the epitope of interest.

20 As disclosed herein, the term "low dose" relates to an electron dose not exceeding $35 \text{ e}^-/\text{\AA}^2/\text{dataset}$

As disclosed herein, the term "3D reconstruction" relates to a method wherein a three dimensional image is reconstructed from several two dimensional images.

25 As disclosed herein, the term "data collection" relates to a method wherein the sample is exposed to electrons and the image produced recorded.

30 As disclosed herein, the term "tilt series" relates to a set of data collected from an electron tomography experiment. A tilt-series is a number of consecutive images taken in sequence. For each image, the camera is positioned at different angles with respect to the object.

WO 02/071336

14

PCT/SE02/00354

As disclosed herein, the term "processing data" includes aligning, reconstructing and refining the collected data, as described in Skoglund et al., 1996b.

5 As disclosed herein, the term "chemical fixation" refers to a method wherein the sample is treated with compounds, typically glutaraldehyde or formaldehyde, that cross-link proteins and/or nucleic acids

10 As disclosed herein, the term "cryo" relates to low-temperature conditions where massive formation of ice crystals is prevented. This is well known to a person skilled in the art. An example of such a condition would be at a temperature below -170°C at a pressure of 1 atmosphere, or -100°C in the presence of 2.3M sucrose.

15 As disclosed herein, the terms "ultra-cryo-microtomy" or "cryo-microtomy" relates to a method wherein a sample is cut in thin (20-90nm) slices at cryo-conditions.

Material and methods

Isolation of salivary glands and chemical fixing

20 Salivary glands from fourth instar *C. tentans* larvae were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 0.05 M sucrose (pH 7.2) for 2 hours at 4°C and then washed 4x15 minutes in the same buffer, without glutaraldehyde.

Isolation of chromosomes and antibody labeling

25 Salivary glands were fixed for 2 minutes in 2% paraformaldehyde in TKM (10 mM triethanolamine-HCl, pH 7.0, 100 mM KCl, and 1 mM MgCl_2) at 4°C , before isolation of chromosome IV by pipetting up and down with small glass pipettes (Björkroth et al., 1988; Kiseleva et al., 1994). Chromosome IV was then transferred to a siliconized object glass and fixed for 30 minutes in TKM containing 4% paraformaldehyde at room temperature before the immunoreaction was carried out
30 as described by Sun et al., (1998). The chromosomes were postfixed in 2% glutaraldehyde in TKM for one hour. The non-immunolabeled chromosomes were

WO 02/071336

15

PCT/SE02/00354

directly fixed in glutaraldehyde in TKM after isolation. The RNA polymerase II CTD and all hnRNP and splicing factors that we have been able to test (two SR proteins, two hnRNP proteins, U1 snRNP and U2 snRNP) remain bound to the active BR3 gene segments during these conditions.

5

Goat anti-*Drosophila* RNA polymerase II α antibody (i.e. the hyperphosphorylated CTD of the large subunit of RNA polymerase II), "gAP α -PCTD", was a generous gift from Dr Arno L. Greenleaf (Duke University Medical Center, USA). Mouse anti-U2 snRNP B" antibody was purchased from ICN Pharmaceuticals, Inc. Both antibodies are specific in Western blots. Secondary IgG antibodies conjugated with 6 nm gold particles were purchased from Jackson ImmunoResearch Labs, Inc.

10

Embedding, staining and sectioning

Following glutaraldehyde fixation, all specimens (intact glands and isolated chromosomes) were dehydrated and embedded in the same way (Björkroth et al., 1988). The isolated chromosomes were embedded on top of a siliconized glass slide. The plastic with the isolated chromosomes was removed from the glass with a razor after cooling in liquid nitrogen. The area of interest was cut out, mounted and sectioned either into 60 nm or 100 nm sections. The sections were put onto EM grids (serial sections were ordered) and stained with 2% uranyl acetate in ethanol for 5 minutes. Colloidal 10 nm gold markers (Auroprobe EM GAD IgG G19, Amersham), used as markers in the alignment, were added on top of the sections. The gold markers were diluted 1:3 and incubated with the grids for 8-10 minutes. The grids were finally washed 3 times in water and air-dried.

15

20

25

Data collection

The tilt series (data set) of the chromosomes in sectioned nuclei were recorded manually on a Zeiss EM902 transmission electron microscope at 80 kV acceleration voltage using the inelastic scattering filter, after pre-irradiation of the preparations, resulting in an initial 20% shrinkage in the beam direction and prevention of any further shrinkage during the tilt series. A magnification of 32,000 times was used

30

and every 5-degree from $+60^\circ$ to -60° was recorded, giving a total of 25 projections. Two extra zero-degree tilts were recorded, before and after the tilt series, to control for specimen radiation damage. Only approved tilt series were processed further, and the negatives were scanned with an Optronics P-1000 drum scanner with a 25 μm raster size.

The isolated chromosome tilt series, including immunolabeled chromosomes, were recorded on a Philips CEM200 FEG transmission electron microscope automatically, using the TVIPS (TVIPS GmbH, Gauting, Germany) detection system and the Emmenu software. This software controls the tilting, focusing, tracking and data collection. The acceleration voltage was 200 kV, the magnification 26,700 times and the pictures recorded directly on a 2048x2048 pixel CCD chip with a raster size of 14 μm . 61 pictures were recorded, every 2-degrees between $+60^\circ$ to -60° . The total dose for a full tilt series was less than 30 electrons/ \AA^2 . No shrinkage can be detected during these conditions (Miralles et al., 2000).

The tilt series of chromosomes in situ were digitized at a pixel size of 7.8 \AA and the tilt series of isolated chromosomes were digitized at a pixel size of 5.2 \AA . The total size of the digitized area for the tilt series of chromosomes in sectioned nuclei was 1.25 μm x 1.25 μm and for the isolated chromosomes 1.07 μm x 1.07 μm .

3D Reconstruction

The data was processed (aligned, reconstructed and refined) using the ET software package version 3.4 (Skoglund et al., 1996b). All image processing was done on a Compaq workstation (500a) and a GS60 server.

10 nm colloidal gold markers were used for the alignment of the different projections. The average alignment error was less than 5 \AA . The entire digitized *in situ* area was reconstructed using the filtered back-projection principle. The individual reconstructions were further refined using COMET (Skoglund et al., 1996a) to give a better fit to the experimental data, improve signal/noise ratio and to keep only significant densities. Finally, the reconstructed densities were lowpass-filtered to a homogenous resolution.

WO 02/071336

17

PCT/SE02/00354

Areas of approximately 300 x 300 x 100 nm were first analyzed at 7.5-nm resolution. Selected structures were further reconstructed and analyzed at 5 nm. Bob (Ken Chin-Purcell, Minnesota Supercomputing Center Inc., freeware) was used for volume rendering and XTV (Skoglund et al, 1996b) and AVS/Express version

5 4.0 (Advanced Visual Systems, Inc) were both used for surface rendering. The volumes of individual NTS complexes were measured by adding the voxels within a tailor-made envelope (only the density of interest was cut out using the XTV software). Only the voxels above a threshold density value, usually 2 standard deviations above average density, were added. The linear extension of gene

10 segments from embedded isolated chromosomes compared to in situ sections, showed an approximately 20% shrinkage in the isolated chromosomes, most probably due to the different treatments of the specimens. The linear shrinkage corresponds to an isotropic shrinkage in volume of about 50% compared to the in situ sections.

15

COMPARATIVE EXAMPLE OF PRIOR ART

In Miralles et al.; (2000), *J. Cell Biol.* 148, 271-282, are shown examples of information obtained prior to this invention. Figure 1 and 6 show typical examples

20 of low-resolution images achieved without the use of COMET. The antibodies used in this example are not used in the context of a 3D reconstruction of the images and are of low resolution. In figure 2d is shown results achieved when COMET is used for 3D reconstruction of the images. In figure 2d, no antibody was used for identifying epitopes; therefore, it is impossible to identify specific components of

25 the object.

Immunological localization of the RNA polymerase II CTD and U2 snRNP B" protein

30 The locations of the CTD of RNA polymerase II and the U2 snRNP specific B" protein in the BR3 gene segments has been determined by immunological labeling.

WO 02/071336

18

PCT/SE02/00354

Isolated chromosome IV was used in these experiments, because compared to sections of gland cells, the antibody reaction was more efficient.

Specific gold labeling of the active BR3 gene segments was obtained both for the anti-RNA polymerase II CTD antibody and the anti-U2 snRNP B" antibody. More than 99% (anti-U2 snRNP B" antibody) and 97% (anti-RNA polymerase II CTD antibody) of the gold particles were associated with the active gene segments and only very few particles were found in other regions (see Fig. 1 A). In the 3D reconstruction of the gold particles completely located within the section, more than 83 % (for the RNA polymerase II CTD antibody) and 97 % (for the anti-U2 snRNP B" antibody) had a specific connection to NTS complexes (see below). Using an unspecific antibody (data not shown), very few gold particles (less than 1% and 3% of the number seen with the anti-U2 snRNP B" antibody and anti-RNA polymerase II CTD antibody, respectively) were seen, and these gold particles were randomly distributed in relation to other parts of the chromosome.

15

The immuno gold labeling was clearly specific for the transcribing BR3 gene segments (Fig 1 A), but in two dimensions it was not possible to decide precisely which parts of the active gene segments were labeled (Fig. 1 B and D). The 3D reconstruction of the immunostained active BR3 gene enabled a high degree of precision in locating the antigens in the NTS complexes. In general, the combination of immunostaining and 3D reconstruction allows epitopes to be mapped, giving significantly improved possibilities of locating individual components in supra-molecular structures and in this way dissecting the composition of such structures.

25

An unambiguous thin electron-dense connection from most gold particles was found in the 3D reconstruction. This connection extended 10-20 nm from a gold particle and, with the U2 snRNP B" antibody, only the NTS complex was observed being labeled. Most of the connections were in this case to the part of the complex facing away from the chromatin axis (Fig. 1C). In addition, with the anti-RNA polymerase II CTD antibody, only labeling of the NTS complexes in the gene

30

WO 02/071336

19

PCT/SE02/00354

segments was observed. The chromatin axis between the NTS complexes was not labeled. This supports the interpretation from the structure of the active gene segments, that each NTS complex contains a nascent transcript and it follows that an RNA polymerase II is present in each NTS complex. Most connections between the gold particles attached to the anti-RNA polymerase II CTD antibodies and the NTS complex were observed at the region of the NTS complex that is closest to the chromatin axis (Fig. 1E).

These immunolabeling experiments show that the CTD of the large subunit of RNA polymerase II and the U2 snRNP B" can both be localized to the NTS complexes along the chromatin axis. Furthermore, and of relevance to this invention, the data is of sufficiently high resolution to pinpoint the two components different locations within the complexes; the RNA polymerase II CTD closest to the chromatin axis and the U2 snRNP further inside the complex.

WO 02/071336

20

PCT/SE02/00354

References

- 5 Amero, S.A., Raychaudhuri, G, Cass, C.L., van Venrooij, W.J., Habets, W.J.,
Krainer, A.R., and Beyer, A.L. (1992) Independent deposition of heterogeneous
nuclear ribonucleoproteins and small nuclear ribonucleoprotein particles at sites of
transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89, 8409-8413.
- Auer, J. *Mol. Med.*, 78: 191-202, (2000)
- 10 Baurén, G., Jiang, W.-Q., Bernholm, K., Gu, F., and Wieslander, L. (1996)
Demonstration of a dynamic, transcription dependent organization of pre-mRNA
splicing factors in polytene nuclei. *J. Cell Biol.* 133, 929-941.
- Bentley, D. (1999) Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA
15 processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 347-351.
- Björkroth, B., Ericsson, C., Lamb, M.M., and Daneholt, B. (1988) Structure of the
chromatin axis during transcription. *Chromosoma* 96, 333-340.
- 20 Clark, M.W., Goelz, S., and Abelson, J. (1988) Electron microscopic identification
of the yeast spliceosome. *EMBO J.* 7, 3829-3836.
- Cmarko, D., Verschure, P.J., Martin, T.E., Dahmus, M.E., Krause, S., Fu, X.-D.,
van Driel, R., and Fakan, S. (1999) Ultrastructural analysis of transcription and
25 splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Mol. Biol. Cell.* 10,
211-223.
- Corden, J.L. and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to
splicing. *Trends Biochem. Sci.* 22, 413-416.

30

WO 02/071336

21

PCT/SE02/00354

- Henderson, R., The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q Rev Biophys.*, (1995) May; 28(2): 171-93
- 5 Kiseleva, E., Wurtz, T., Visa, N., and Daneholt, B. (1994) Assembly and disassembly of spliceosomes along a specific pre-messenger RNP fiber. *EMBO J.* 13, 6052-6061.
- Miralles, F., Öfverstedt, L.-Ö., Sabri, N., Aissouni, Y., Hellman, U., Skoglund, U.
10 and Visa, N. (2000) Electron tomography reveals posttranscriptional binding of pre-mRNPs to specific fibers in the nucleoplasm. *J. Cell Biol.* 148, 271-282.
- Neugebauer, K.M., and Roth, M.B. (1997a) Distribution of pre-mRNA splicing factors at sites of RNA polymerase II transcription. *Genes & Dev.* 11, 1148-1159.
- 15 Neugebauer, K.M., and Roth, M.B. (1997b) Transcription units as RNA processing units. *Genes & Dev.* 11: 3279-3285.
- Paulsson, G., Lendahl, U., Galli, J., Ericsson, C., and Wieslander, L. (1990) The
20 Balbiani Ring 3 gene in *Chironomus tentans* has a diverged repetitive structure split by many introns. *J. Mol. Biol.* 211, 331-349.
- Puvion, E., and Puvion-Dutilleul, F. (1996) Ultrastructure of the nucleus in relation to transcription and splicing: role of perichromatin fibrils and interchromatin
25 granules. *Exp. Cell Res.* 229, 217-225.
- Raab et al. Antibody recognition imaging by force microscopy. *Nature Biotechnology*, (1999), Sept., 17: 902-905
- 30 Reed, R., Griffith, J., and Maniatis, T. (1988) Purification and visualization of native spliceosomes. *Cell* 53, 949-961.

- Shuman, S. (1997) Origins of mRNA identity: Capping enzymes bind to the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12758-12760.
- 5
- Skoglund, U., Öfverstedt, L.-G., Burnett, R., and Bricogne, G. (1996a) Maximum-entropy three-dimensional reconstruction with deconvolution of the contrast transfer function, a test application with adenovirus. *J. Struct. Biol.* 117, 173-188.
- 10
- Skoglund, U., Öfverstedt, L.-G., and Daneholt, B. (1996b) Procedures for three-dimensional reconstruction from thin slices with electron tomography. In *RNP particles, Splicing and Immunodiseases*. Springer Lab Manual, J.Schenkel, ed. (Springer-Verlag, Heidelberg), pp. 72-94.
- 15
- Steinmetz, E.J. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymerase II: The tail that wags the dog. *Cell* 89, 491-494.
- Sun, X., Alzhanova-Ericsson, A., Visa, N., Aissouni, Y., Zhao, J. and Daneholt, B. (1998) The hrp23 protein in the Balbiani ring pre-mRNP particles is released just before or at the binding of the particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 142, 1-13.
- 20
- Valle et al. Selection of antibody probes to correlate protein sequence domains with their structural distribution. *Protein Science*, (1999) 8: 883-889
- 25
- Wetterberg, I., Baurén, G., and Wieslander, L. (1996) The intranuclear site of excision of each intron in the Balbiani Ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA* 2, 641-651.
- 30

- Wu, Z., Murphy, C., Callan, H.G. and Gall, J.G. (1993) Small nuclear ribonucleoproteins and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in the amphibian germinal vesicle: Loops, spheres, and snurposomes. *J. Cell Biol.* 113, 465-483.
- 5 Zhang, G., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Green, M.R., (1994) Localization of pre-mRNA splicing in mammalian nuclei. *Nature* 372, 809-812.

CLAIMS

- 1) Method for localizing and identifying specific epitopes located on a molecule in a specimen, comprising the steps of;
- 5 (a) performing affinity labeling by binding an affinity reagent, or a complex of one or more such affinity reagents to said molecule in said specimen;
- (b) fixing the spatial relationships between said molecules and other components of the sample;
- (c) applying the sample on an electron microscopy grid;
- 10 (d) exposing the specimen to low-dose electron radiation in a transmission electron microscope;
- (e) collecting data from a tilt-series;
- (f) using the collected data to reconstruct, in three dimensions, the structures of individual molecules;
- 15 (g) refining said reconstructions using COMET to enable the visualization of the individual molecules in said specimen.
- 2) Method according to claim 1, whereby said affinity reagents directed against two or more epitopes on said molecule are employed for affinity labeling.
- 20 3) Method according to any of the preceding claims, whereby said affinity reagent is labeled with an electron-dense marker.
- 4) Method according to any of the preceding claims, whereby a second affinity reagent is bound to said affinity reagent, which is bound to said molecule.
- 25 5) Method according to any of the preceding claims, whereby said affinity reagents are injected into a cell or tissue in which said molecule is located.
- 30 6) Method according to claim 5, whereby said cell or tissue containing said affinity reagent is sliced into thin sections of a thickness in the range of 25nm-1 μ m.

WO 02/071336

25

PCT/SE02/00354

- 7) Method according to claim 1, whereby said specimen is sliced in sections of a thickness in the range of 25nm-1 μ m prior to affinity labeling.
- 5 8) Method according to any of the preceding claims, in which the sample is frozen after affinity labeling and prior to exposing said sample to said low-dose electron radiation.
- 9) Method according to claim 8, in which the sample is sliced before embedding.
- 10 10) Method according to any of the preceding claims, in which the spatial relationships between components of the sample are fixed by chemical fixation prior to freezing and/or embedding.
- 15 11) Method according to any of the preceding claims, in which the spatial relationships between components of the sample are fixed by embedding and/or freezing prior to slicing.
- 12) Method according to any of the preceding claims, in which the sample is frozen after being placed on said electron microscopy grid and prior to exposing to said low-dose electron radiation.
- 20 13) Method according to any of the above claims in which the sample is stained with heavy atoms prior to data collection.

25

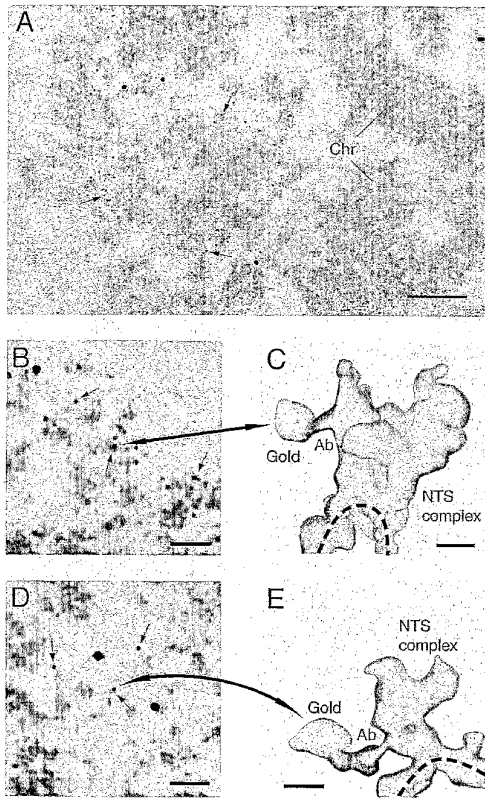


Figure 1

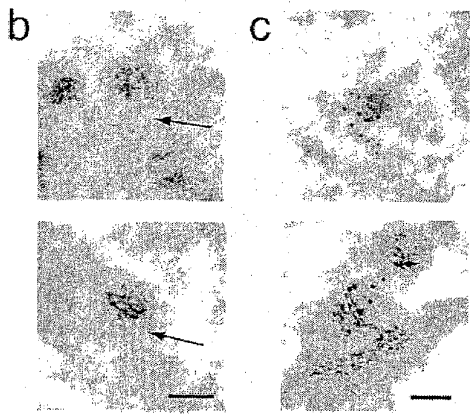


Figure 2

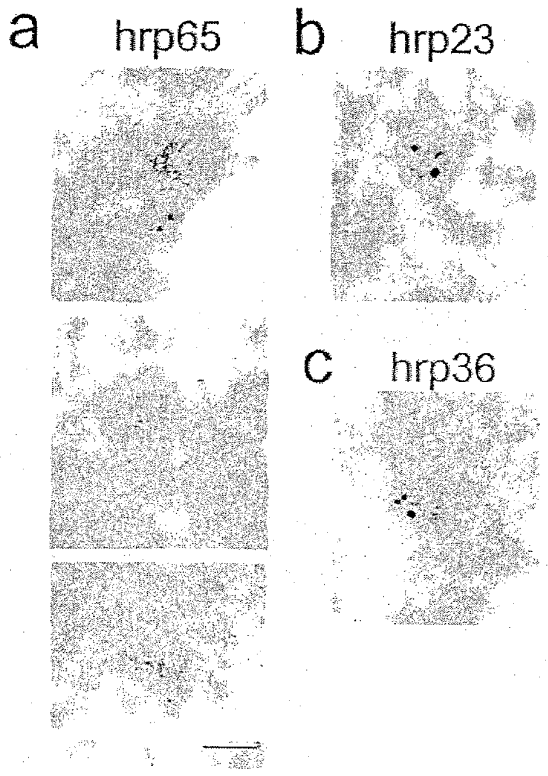


Figure 3

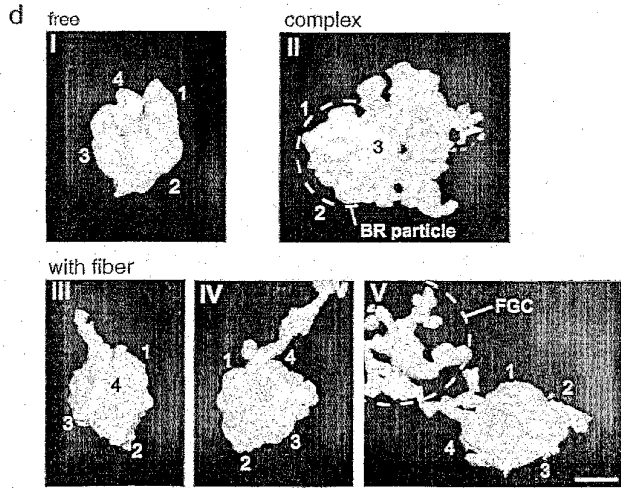


Figure 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 02/00354
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7: G06T 11/00, G01N 33/537, G01N 1/42 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G06T, G01N, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Protein Science, Volyme 8, 1999, Mikel Valle et al: "Selection of antibody probes to correlate protein sequence domains with their structural distribution", pages 883-889 --	1-13
Y	WO 9733255 A1 (SKOGLUND B. ULF), 12 Sept 1997 (12.09.97), claims 1-22 --	1-13
Y	Nature Biotechnology, Volyme 17, September 1999, Anneliese Raab et al: "Antibody recognition imaging by force microscopy", pages 902-905 --	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search:	Date of mailing of the international search report	
5 June 2002	17-06-2002	
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86	Authorized officer Fernando Farieta/Els Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 02/00354

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	The Journal of Cell Biology, Volume 148, No. 2, January 2000, Francesc Minalles et al: "Electron Tomography Reveals Posttranscriptional Binding of Pre-mRNPs to Specific Fibers in the Nucleoplasm", pages 271-282 --	1-13
A	US 5241471 A (Trousset et al), 31 August 1993 (31.08.93), claims 1-13 --	1-13
A	J Mol Med, Volume 78, 2000, Manfred Auer: "Three-dimensional electron cryo-microscopy as a powerful structural tool in molecular medicine", pages 191-202 --	1-13
A	US 5340749 A (Fujiwara et al), 23 August 1994 (23.08.94), claims 1-12 --	1-13
A	Patent Abstracts of Japan, Abstracts of JP 02-118431 A (NIPPON TELEGR & TELEPH CORP), 2 May 1990 (02.05.1990) --	1-13
A	Patent Abstracts of Japan, abstract of JP 2001-004631 A (SHOKUHIN SANGYO CENTER), 12 January 2001 (12.01.01) -- -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/05/02

International application No.

PCT/SE 02/00354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733255 A1	12/09/97	AT 206544 T	15/10/01
		AT 206938 T	15/11/01
		AU 1950897 A	22/09/97
		AU 6325896 A	05/02/97
		DE 69616073 D	00/00/00
		DE 69707110 D	00/00/00
		DK 841958 T	11/02/02
		EP 0841958 A,B	20/05/98
		SE 0841958 T3	
		EP 0885430 A,B	23/12/98
		JP 11508468 T	27/07/99
		JP 2000507007 T	06/06/00
		SE 511737 C	15/11/99
		SE 9600896 A	08/09/97
		SE 9601229 D	00/00/00
		US 6000567 A	14/12/99
		AU 7591596 A	11/08/97
		EP 0874969 A	04/11/98
		PL 180723 B	30/03/01
		PL 327575 A	21/12/98
SK 69398 A	11/02/99		
US 6006526 A	28/12/99		
US 5241471 A	31/08/93	DE 69018797 D,T	16/11/95
		EP 0434508 A,B	26/06/91
		FR 2656129 A,B	21/06/91
US 5340749 A	23/08/94	DE 68916843 D,T	02/02/95
		EP 0339980 A,B	02/11/89
		SE 0339980 T3	
		JP 1991310 C	22/11/95
		JP 2253551 A	12/10/90
		JP 7021442 B	08/03/95
		US 5498550 A	12/03/96
		JP 1273584 A	01/11/89
		JP 1321362 A	27/12/89
		JP 2118431 A	02/05/90
		JP 2567068 B	25/12/96
		JP 2151767 A	11/06/90

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
H 0 1 J 37/26	G 0 1 N 1/28	J
	G 0 1 N 1/28	K
	G 0 1 N 1/28	R

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヴィサ, ヌース

スウェーデン, エスイー - 1 4 1 3 9 フッディング, スネークヴェーゲン 3 4

F ターム(参考) 2G045 AA24 BA14 BB24 CB01 FA16

2G052 AA33 AD34 AD52 EB08 EB13 EC03 FA02 FA09 GA34 HB08

HB10

5C033 UU02 UU03