



Doctoral Thesis

The Structure of active chromatin an electron microscopic study

Author(s):

Labhart, Paul

Publication Date:

1981

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000238150> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No 6891

THE STRUCTURE OF ACTIVE CHROMATIN:
AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

LABHART PAUL

dipl. Natw. ETH

born 13. 1. 1955

citizen of Steckborn / Thurgau

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Th. Koller, referee

PD Dr. M. Lezzi, co-referee

1981

Th. Koller

KURZFASSUNG

Die Struktur von transkribierendem nukleolärem Chromatin wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Mögliche Präparationsartefakte wurden kontrolliert und weitgehend vermieden, indem biochemisch und elektronenmikroskopisch gut definiertes Rattenleberchromatin als Standard diente. Transkribierendes (aktives) nukleoläres Chromatin erscheint im Elektronenmikroskop als dünnes, glattes Filament, ununterscheidbar von reiner DNA. Während mitpräpariertes Rattenleberchromatin Nukleosomenketten zeigt, welche mit ansteigender Ionenstärke in 25 - 30 nm dicke Fasern kondensieren, zeigt das aktive Chromatin keine Salz-induzierte Veränderungen und behält sein DNA-artiges Aussehen.

Die Resultate deuten darauf hin, dass im aktiven nukleolären Chromatin Histone und Nukleosomen fehlen und dass ausser dem Transkriptionsapparat nur wenige oder keine Proteine mit der transkribierten DNA assoziiert sind.

A B S T R A C T

The structure of active nucleolar chromatin is studied by electron-microscopy using a modified Miller spreading technique. Possible preparation artifacts are controlled and avoided to a large extent by using biochemically and electron microscopically well-characterized rat liver chromatin as a standard. Active nucleolar chromatin of Xenopus laevis oocytes was found to be a smooth, thin filament, which is indistinguishable from pure DNA. Whereas co-prepared inactive rat liver chromatin shows nucleosome chains, which condense into 25 - 30 nm thick fibers with increasing ionic strength, the active nucleolar chromatin maintains its DNA-like shape.

The results suggest that in active nucleolar chromatin histones and nucleosomes are absent and that, except for the transcription apparatus, virtually no proteins are associated with the transcribed DNA.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Zellkern der Eukaryoten ist die DNA, Trägerin der Erbinformation, mit basischen Proteinen, den Histonen, assoziiert. Diese DNA-Histon-Komplexe bilden zusammen mit Nicht-Histonen, denen überwiegend regulatorische Funktionen zugeschrieben werden, das Chromatin.

Chromatin ist aus strukturellen Untereinheiten, den Nukleosomen, aufgebaut. In den Nukleosomen-Kernpartikeln bilden je 2 Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 ein Oktamer, um welches 146 Basenpaare von DNA in 1.75 linkshändigen Drehungen gewunden sind. Es wird angenommen, dass das fünfte Histon, H1, asymmetrisch an den Ort am Nukleosomen-Kernpartikel gebunden ist, wo die DNA ein- und austritt. Dadurch werden zusätzliche 20 Basenpaare DNA abgedeckt und 2 vollständige superhelikale Windungen von DNA (166 Basenpaare) "versiegelt". Im Chromatin sind die Nukleosomen durch verbindende DNA unterschiedlicher Länge (20 - 70 Basenpaare, je nach Zelltyp) linear aneinandergereiht. In tiefer Ionenstärke (ca. 1 mM monovalente Ionen) erscheint Chromatin im Elektronenmikroskop als Zickzack-artige Ketten von Nukleosomen, bei denen die DNA auf der gleichen Seite ein- und austritt. Mit ansteigender Ionenstärke kondensieren diese Nukleosomen-Ketten, und bei ungefähr physiologischer Ionenstärke liegen kompakte Fasern von 25 - 30 nm Durchmesser vor. Diese elektronenmikroskopischen Befunde werden bestätigt durch physikochemische Studien.

Die Kondensation ist abhängig von der Zusammensetzung des Chromatins. Nach Entfernung von Nicht-Histon-Komponenten wird die kompakte Faser nach wie vor gebildet, doch entfalten sich die Nukleosomen bei tiefer Ionenstärke teilweise, sodass die DNA auf entgegengesetzten Seiten ein- und austritt. Die Nukleosomen erscheinen dadurch perlschnurartig angeordnet. Erst bei Abwesenheit von Histon H1 werden keine kompakten Fasern mehr gebildet, was zeigt, dass H1 für die Bildung von höheren Strukturordnungen notwendig ist.

Die beschriebenen strukturellen Untersuchungen wurden an löslichem Chromatin gemacht, d.h. an Chromatinfragmenten, die mittels eines leichten Nuklease-Verdau von Kernen aus diesen herausgelöst wurden, und für

die elektronenmikroskopische Analyse wurden die bei verschiedener Ionenstärke fixierten Chromatinfragmente mit der BAC-Methode an Kohlefilme adsorbiert.

Es wird allgemein angenommen, dass das Chromatin welches in solche kompakte Fasern kondensiert ist, transkriptionell inaktiv ist. Wie wird diese Struktur verändert um Transkription zu ermöglichen? Insbesondere stellt sich die Frage, ob in transkribierendem Chromatin (aktives Chromatin) Histone und Nukleosomen auch vorhanden sind. Bis heute gibt es keine Methode für die Isolation und Reinigung von langen Fragmenten von aktivem Chromatin, welche es erlauben würde, eine Probe biochemisch, physikochemisch und elektronenmikroskopisch zu charakterisieren und die Resultate miteinander zu korrelieren, auf eine Weise, wie es für das inaktive Chromatin gemacht worden ist. Aktives Chromatin wurde deshalb unabhängig voneinander mit biochemischen Methoden und mit Elektronenmikroskopie untersucht.

Ein wichtiges Werkzeug für eine biochemische Analyse des Chromatins sind Nukleasen. Da die DNA im inaktiven Chromatin periodisch mit Histonen assoziiert ist, schneidet z.B. die Mikrokokkale Nuklease präferenziell im Histon-freien Bereich der DNA zwischen den Nukleosomen, was zu einem typischen DNA-Elektrophorese-Muster führt ("Repeat"). Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass aktive Gene im Vergleich zu inaktiven bevorzugt durch DNAase I oder Mikrokokkale Nuklease degradiert werden. Trotzdem wurde in den meisten Fällen im aktiven Chromatin eine ähnliche periodische Struktur gefunden wie im inaktiven, sodass die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNAase I mit einer geänderten Nukleosomen-Konformation erklärt wurde. Andererseits war das DNA-Elektrophorese-Muster ("Repeat"), welches bei der Nuklease-Behandlung von Kernen entsteht, verschmiert, wenn es in Hitzeschock-behandelten Drosophila-Zellen auf die aktivierten Gene hin untersucht wurde, was ein Verlust der periodischen Struktur anzeigen würde. Die Schwierigkeit in biochemischen Untersuchungen von aktiven Genen ist der unbekante Anteil der Zellen, in welchen das analysierte Gen exprimiert wird. Deshalb untersuchen viele Arbeitsgruppen aktive Gene mit dem Elektronenmikroskop mit der Miller-Spreitungsmethode, welche es erlaubt, ein transkribierendes Chromatinstück eindeutig zu erkennen. In dieser Technik wird die Probe durch ein Saccharose-Kissen, das ein Fixativ enthält, auf Elektronenmikroskopie-Trägerfilme zentrifugiert. Die

Resultate, die mit dieser Methode erzielt wurden, sind jedoch zum Teil widersprüchlich, und zwar sowohl was die Struktur von inaktivem Chromatin als auch was die Struktur von aktivem Chromatin anbelangt. Die gefundenen Strukturen des inaktiven Chromatins lassen sich nur schlecht mit denjenigen von biochemisch gut charakterisiertem löslichem Chromatin korrelieren. Für das aktive Chromatin wurden sowohl gekörnte als auch glatte Filamente gezeigt und ebenso mit ansteigender Ionenstärke sowohl eine Kondensation als auch keine. Bei ribosomalen Genen konnte mehrfach übereinstimmend gezeigt werden, dass bei tiefer Ionenstärke die Länge der Chromatinfaser derjenigen der entsprechenden deproteinisierten DNA entspricht, was auf ein Fehlen von nukleosomaler Verpackung schliessen lässt.

Dennoch ist die Miller-Spreitungsmethode die Methode der Wahl für eine elektronenmikroskopische Analyse von aktivem Chromatin. Mein Vorgehen war deshalb, diese Methode dahingehend zu modifizieren, dass inaktives Chromatin, sei es als Chromatin-Fragmente oder als Chromatin, welches aus lysierten Kernen quillt, die gleichen Ionenstärke-abhängigen Strukturen zeigt, wie das biochemisch gut charakterisierte lösliche Chromatin, präpariert mit der BAC-Adsorptions-Methode. Werden mit einer so modifizierten Technik Kerne mit vorwiegend inaktivem (Rattenleberkerne) und Nukleolen mit vorwiegend aktivem Chromatin (aus Oozyten von Xenopus laevis) zusammenpräpariert, so wäre ein strikter Vergleich des Verhaltens beider Chromatintypen gegenüber ansteigender Ionenstärke möglich, welcher unter Umständen Rückschlüsse auf den molekularen Aufbau des aktiven Chromatins erlauben würde.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die Adsorption der Chromatinfasern an die Kohle-Trägerfilme dadurch verbessert, dass diese mit Alcianblau behandelt wurden. Streckungs- und Trocknungsartefakte konnten so weitgehend vermieden werden. Ferner wurden die Puffer- und Fixationsbedingungen denjenigen angepasst, die bei der Analyse des löslichen Chromatins verwendet wurden. Unter diesen Bedingungen zeigten Chromatinfasern, die aus lysierten Kernen quillen, die gleiche Ionenstärke-abhängige Kondensation, wie sie für das lösliche Chromatin beschrieben worden waren.

Wird aktives Chromatin mit der Miller-Methode präpariert, wird meistens pH 9 verwendet, da das Material bei diesem pH am besten gespreitet

wird. Es zeigte sich aber, dass, wird inaktives Chromatin bei pH 9 präpariert, die Strukturen von denen bei pH 7 verschieden sind. Deshalb wurde an löslichem Chromatin der Einfluss einer Verschiebung des pH-Wertes von 7 auf 9 auf die Dissoziation der chromosomalen Proteine und auf die elektronenmikroskopische Strukturen untersucht. Im H1-enthaltenden Chromatin wurden die folgenden strukturellen Veränderungen festgestellt: Bei tiefer Ionenstärke ist anstelle der bei pH 7 zu findenden Zickzack-Struktur eine perlschnurartige Anordnung der Nukleosomen festzustellen. Mit ansteigender Ionenstärke findet zwar eine Kondensation statt, doch erscheinen die Fasern weniger kompakt und weniger geordnet als bei pH 7. Diese Effekte sind völlig reversibel. Histon H1 dissoziiert bei gleicher Ionenstärke vom Chromatin wie bei pH 7. Chromatin ohne H1 zeigt keinen Unterschied im Aussehen bei pH 7 und bei pH 9. Die Ergebnisse lassen eine pH-induzierte Veränderung in der Wirkungsweise von H1 in der Bildung der Nukleosomen und der höheren Strukturordnungen vermuten.

Nachdem das Verhalten von biochemisch charakterisiertem, inaktivem Chromatin - meiner Referenz - unter den Bedingungen der modifizierten Miller-Spreitungsmethode untersucht worden war, konnte es nun mit dem Verhalten des biochemisch vorläufig nicht analysierbaren aktiven Chromatins unter gleichen Bedingungen verglichen werden. Für die Präparation von aktivem nukleolärem Chromatin aus Xenopus laevis-Oozyten waren jedoch noch weitere Modifikationen der Methode notwendig, da gefunden wurde, dass unter den Tiefsalzbedingungen der Nukleolen-Lyse Proteine oder andere Komponenten das nukleoläre Chromatin kontaminieren und sein Aussehen und Verhalten ändern. In einem Stufengradient werden deshalb solche unspezifisch bindende Komponenten vom Chromatin abgetrennt. Unter diesen Bedingungen erscheint das aktive nukleoläre Chromatin als dünnes, glattes Filament, welches sein Aussehen auch bei ansteigender Ionenstärke nicht ändert. Mitpräparierte Rattenleberkerne zeigen jedoch die beschriebenen Nukleosomen-Ketten, welche mit ansteigender Ionenstärke in die kompakten Fasern kondensieren. Da das aktive nukleoläre Chromatin elektronenmikroskopisch von reiner DNA ununterscheidbar ist, hingegen deutlich verschieden von DNA, welche mit einem Histon-Oktamer pro 200 Basenpaare bedeckt ist, und da auch sein Verhalten gegenüber steigender Ionenstärke und gegenüber den kontaminierenden Komponenten demjenigen von reiner DNA entspricht, wird ein Modell des aktiven nukleolären Chromatins vorgeschla-

gen, in dem Histone und Nukleosomen fehlen und die DNA während der Transkription ausser mit dem Transkriptions-Apparat nur mit wenigen oder keinen makromolekularen Komponenten assoziiert ist.

S U M M A R Y

An electron-microscopic study of active chromatin is presented. Possible preparation artifacts are controlled and avoided to a large extent by using biochemically well-characterized rat liver chromatin (Thoma *et al.*, 1979) as a standard. The spreading method of Miller and Bakken (1972) is the most suitable technique for the analysis of active chromatin by electron microscopy. I first describe a modification of the method for a structurally reliable preparation of inactive chromatin. Prior to mounting the samples, the carbon support films are coated with Alcianblue. By this means the chromatin fibres stick firmly to the supporting film such that the fibre morphology is independent of the washing and drying procedures used during specimen preparation. Using this technique, I show an ionic strength-dependent condensation of inactive rat liver chromatin protruding from lysed nuclei which is fully compatible with that reported by Thoma *et al.* (1979) for soluble chromatin.

Since pH 9 is necessary for satisfactory dispersion of active chromatin prepared by the Miller technique, the influence of a shift in pH from 7 to 9 upon my standard, the soluble rat liver chromatin, was investigated. In order to remove selectively non-histone components or non-histone-components and histone H1, fractionation of chromatin was performed at pH 7 and pH 9 at different ionic strengths. The salt-dependent condensation of the fractionated chromatin was analyzed in the electron microscope. There is no difference between the appearance of H1-depleted chromatin at pH 7 and at pH 9. In H1-containing chromatin the shift from pH 7 to pH 9 leads to the following morphological changes: a) at very low ionic strength the nucleosomes unravel partially or totally and the zig-zag-shaped fibers disappear in favour of beads-on-a-string; b) with increasing ionic strength the filaments condense into fibers, however, these fibers appear distorted and clearly less ordered than at pH 7. There is no indication of a release or displacement of histone H1. The pH-effect is completely reversible. The data suggest a pH-induced change in the mode of action of histone H1 in the formation of nucleosome beads

and higher order chromatin structures.

Understanding the behaviour of inactive chromatin prepared by the modified Miller technique towards different ionic strength and pH conditions, active nucleolar chromatin from Xenopus laevis oocytes was prepared for electron microscopy using a further modified Miller technique, called step gradient adsorption method, which separates the chromatin from proteins and other constituents which might unspecifically bind at low ionic strength. Between putative RNA polymerases and within the non-transcribed spacer region, the chromatin appears as smooth, thin filaments. For the first time it is shown here that these filaments are indistinguishable from pure DNA adsorbed to the same specimen, even when the ionic strength is raised up to 100 mM NaCl. On the other hand, bulk rat liver chromatin, which was co-prepared as a biochemically well-characterized standard with the active nucleolar chromatin, shows nucleosomes containing fibers, which condense into supra-nucleosomal structures with increasing ionic strength. Since the appearance and the behaviour of active nucleolar chromatin at different ionic strengths and pH's resembles that of pure DNA, but not that of any known type of chromatin, it is suggested that, except for the transcription apparatus, very few macromolecular constituents are associated with ribosomal DNA during transcription. These observations explain most of the published and partly conflicting results obtained by electron microscopy of nucleolar chromatin.