



Doctoral Thesis

## Crystallographic studies on nucleosome core particles containing defined sequence DNA

**Author(s):**

Struck-Donatz, Martina

**Publication Date:**

1992

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000638196> →

**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](#).

**CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES ON NUCLEOSOME CORE PARTICLES**

**CONTAINING DEFINED SEQUENCE DNA**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
MARTINA STRUCK - DONATZ

Dipl. natw. ETH  
born 25th October 1962  
citizen of Sils i.D. GR

accepted on the recommendation of  
Prof. T.J. Richmond, examiner  
PD Dr. M.G. Grütter, co-examiner  
Zurich, 1992



CatE

**Crystallographic studies on nucleosome core particles  
containing defined sequence DNA**

The nucleosome core particle is the basic repeating unit of eukaryotic chromatin. It consists of histone proteins, namely two molecules each of H2A, H2B, H3 and H4, and 146 bp of DNA. The B-DNA is wound in 1.8 turns of a left-handed superhelix around the histone octamer. Previously, the structure of the nucleosome core particle containing a mixed population of DNA has been solved at 7 Å resolution by X-ray crystallography using multiple isomorphous replacement (Richmond et al., 1984). Crystals grown of reconstituted nucleosome core particles containing a DNA fragment of defined length of 146 bp and specific sequence (Richmond et al., 1988) diffract X-rays to higher resolution of about 4.0 Å. The DNA fragment originated from a segment of the 5S RNA gene of *Lytechinus variegatus*, which had been shown to form a stable nucleosome core particle at a single position (Simpson & Stafford, 1983). The thesis presented here describes crystallographic studies on these defined sequence nucleosome core particle crystals. The crystals were found to be of monoclinic space group P2<sub>1</sub>, unique axis c, as opposed to the mixed sequence nucleosome core particle crystals, which were of orthorhombic space group P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>. It was demonstrated by Patterson and difference Fourier syntheses that the two crystal forms are closely related, and that a shift in the arrangement of the molecules in the two crystal forms of the order of 2 to 3 Å may exist. Two multiple heavy-atom compounds (TGG and PIP) were used to solve the structure of the defined sequence nucleosome core particle by the method of multiple isomorphous replacement. However, the phases obtained were of low quality and not reliable for a correct structure determination. In molecular replacement studies using the electron density of a mixed sequence nucleosome core particle determined at 7 Å resolution as the known model, a solution to the rotational orientation of the molecules could be found. Difficulties were encountered in the translation search and no solution was found. Difference Fourier syntheses of the derivative and native defined sequence nucleosome core particle crystals phased by phases of the mixed sequence nucleosome core particle crystals showed peaks at positions that corresponded to the heavy-atom sites found in difference Patterson maps. The sites were closely related to the heavy-atom sites determined in the mixed sequence nucleosome core particle crystals. An initial electron density map from the observed structure factor amplitudes of the defined sequence nucleosome core particle crystals and the phases of the mixed sequence nucleosome core particle crystals could be computed, but the question of how to refine this model and overcome the bias inherited from the mixed sequence nucleosome core particle structure remains.

**Kristallographische Studien an Nukleosomen,  
mit spezifischer DNS - Sequenz**

Die Chromosomen höherer Lebewesen bestehen aus regelmässig angeordneten Untereinheiten, den Nukleosomen. Das Nukleosom besteht aus Histon-Proteinen, je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4, und einem 146 bp langen DNS Stück, das sich in einer linksgängigen Helix in 1.8 Windungen um das Histon-Oktamer legt. Die Struktur dieses Nukleosom-Partikels wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 7 Å aufgeklärt (Richmond et al., 1984). Die Nukleosomen enthielten DNS Stücke, die in ihrer Basen-Sequenz variierten. Kristalle konnten von Nukleosomen gezüchtet werden, die ein kloniertes DNS Fragment enthielten (Richmond et al., 1988). Das Fragment stammt von einem Teilstück des 5S RNS Genes der Spezies *Lytechinus variegatus* und bindet in definierter Weise an Histon-Oktamere (Simpson & Stafford, 1983). Diese Kristalle streuen Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von ungefähr 4.0 Å. In der vorgelegten Doktorarbeit werden kristallographische Studien an diesen Kristallen vorgestellt. Die Kristalle weisen eine monokline Raumgruppe ( $P2_1$ ) auf im Gegensatz zu den früheren Kristallen, die zur orthorhombischen Raumgruppe gehören ( $P2_12_12_1$ ). Anhand von Patterson- und Differenz-Fourier Synthesen wurde gezeigt, dass die zwei Kristallformen aber trotz ihrer unterschiedlichen Kristallsymmetrie sehr ähnlich aufgebaut sind. Eine Verschiebung der Moleküle in den beiden Kristallformen in der Grössenordnung von 2-3 Å konnte nachgewiesen werden. Zwei Schweratomderivate (TGG und PIP) wurden zur Lösung des Phasenproblems der Nukleosom-Kristalle verwendet. Die Phasen liessen sich dadurch aber nicht mit genügender Genauigkeit bestimmen. Daraufhin wurden andere Methoden zur Lösung des Phasenproblems angewandt. Die Elektronendichte der 7 Å Struktur des Nukleosomes wurde als Modell-Molekül in 'Molecular replacement'-Studien verwendet. Die Rotationsfunktion liess sich lösen, doch die Translationsfunktion blieb ungelöst. Eine Differenz-Fourier Synthese, die aus den Amplituden der Derivat- und Nativkristalle und den Phasen der 7 Å Struktur berechnet wurde, zeigte Schwermetalle an denselben Stellen, die auch schon in einer Differenz-Patterson Synthese gefunden worden waren. Eine rudimentäre Elektronendichte-Karte der Nukleosomen, die definierte DNS Sequenz enthielten, konnte aus dessen gemessenen Amplituden und den Phasen der 7 Å Struktur berechnet werden. Es bleibt aber ungeklärt, wie dieses erste Modell verfeinert werden kann, da keine Atompositionen bei einer Auflösung von 7 Å ausgemacht werden können.