



Doctoral Thesis

Characterisation of functional macromolecules by scanning electron microscopy tenascin, contactin/F11, and mitochondrial DNA

Author(s):

Yaffee, Marc

Publication Date:

1993

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000937747> →

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](#).

**Characterisation of Functional Macromolecules by
Scanning Electron Microscopy: Tenascin, Contactin/F11,
and Mitochondrial DNA**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by:

Marc Yaffee

B.Sc., University of New Mexico, USA
dipl. Natw. ETH

Born:

August 3, 1955

Citizen of:

U.S.A.

Accepted on the recommendation of



Prof. Dr. H. Moor, examiner

Dr. M. Müller, co-examiner

Dr. Lloyd Vaughan, co-examiner

Project and Direction

Dr. M. Müller

Dr. Lloyd Vaughan

Conducted in the Laboratory for EM I, Institute of Cellbiology, ETH

1993

Abstract

High resolution scanning electron microscopy (HRSEM) is capable of depicting topographic information down to the macromolecular level. One can then integrate biochemical and physical data, from X-ray diffraction, NMR, and biochemical studies, into the HRSEM framework to better understand the complex behavior within a biological system. This thesis characterises macromolecular substructures through HRSEM visualisation of proteins and DNA. The present study embraces two different structural themes; the first entails direct imaging of a sequence specific structural motif of the extra cellular matrix (ECM) protein tenascin with parallel immunocytochemical mapping of internal sub-domains and study of its neuronal receptor, contactin/F11; the second study depicts conformational changes in mitochondrial DNA induced by Fe(III):gluconate.

A zig-zag arrangement of the co-linear fibronectin type III (FN type III) domains of tenascin has been predicted by crystallographic and energetic considerations. This staggered structural design was visualized by HRSEM of double-axis rotary shadowed (DARS) tenascin. Given the close structural similarities between FN type III domains and immunoglobulin (Ig C2) domains, it is worth noting that immunoglobulin-like domains also form colinear zigzag arrays, a structural element necessary for the side-by-side interactions of Ig-like domains. This may lead us to a better understanding of the interactions between tenascin and contactin/F11, its neuronal receptor. Contactin/F11, a member of the immunoglobulin superfamily, binds via a site within its immunoglobulin-like domains to the FN type III domains of tenascin.

Imaging iron induced DNA damage with HRSEM can provide a new way to assess the toxicological effects of substances on the environment. The conformational form of mitochondrial DNA is altered, leading to unwinding, in dose dependent experiments when Fe(III):gluconate is taken up by mitochondria during incubations *in vitro*. Dose dependent biochemical assays of mitochondrial DNA conformation were monitored in concert by gel electrophoresis, HPLC and HRSEM. A quantitative and qualitative assessment of conformational change can be made following the degree of unwinding. If mitochondria are exposed *in vitro* to doses of Fe(III):gluconate (60 μ M to 500 μ M), within 15 minutes they accumulate

Abstract

up to 30 nmoles/mg of mitochondrial protein with a $t_{1/2}$ of 5 minutes. The supercoiled form of mitochondrial DNA (mtDNA; form I) is the predominant form *in vivo*. Gel electrophoresis of extracted control mtDNA not exposed to ferric salts shows 60% \pm 6% (standard deviation, n=2) type I mtDNA, 36% \pm 6% type II mtDNA (relaxed open circular), and 4% \pm 2% type III mtDNA (linear). The mtDNA isolated from mitochondria incubated with Fe(III):gluconate at 60 μ M shows a decrease in the amount of the type I mtDNA to 32% \pm 10%, and an increase in the type II mtDNA to 64% \pm 10%. The type III mtDNA shows no change. When the Fe(III):gluconate of the mitochondrial incubation is increased to 500 μ M the type I mtDNA decreases to 10% \pm 3%, and the type II mtDNA increases to 86% \pm 3%, while there is no change to the type III mtDNA. High resolution scanning electron microscopy (HRSEM) of the isolated mtDNA shows very detailed images of all forms of mtDNA. These images correspond to the conformational forms of mtDNA found by gel electrophoresis and Southern blotting.

Abstract

Zusammenfassung

Die hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie (HREM) ermöglicht die Abbildung topographischer Details bis in den makromolekularen Bereich. Zum besseren Verständnis der komplexen Wechselwirkungen innerhalb eines biologischen Systems können zusätzlich biochemische und physikalische Daten (z.B. röntgendiffraktometrische Messungen und NMR) mit den Daten der HREM kombiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die makromolekulare Feinstruktur von Proteinen und DNS durch ihre Abbildung im HREM charakterisiert. Die Studie befasst sich mit zwei unterschiedlichen Themen, beide auf struktureller Basis. Im ersten Themenkomplex geht es um die direkte Abbildung des sequenzspezifischen Strukturelementes Tenascin, das in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist. Desweiteren erfolgt die immunzytochemische Kartierung interner Untereinheiten des Tenascins und eine Studie seines neuronalen Rezeptors, des Contactin/F11.

Die zweite Studie untersucht Veränderung in der Konformation mitochondrialer DNS (mtDNA), die durch Fe(III):gluconate induziert wird.

Die Abbildung der durch Eisen verursachten Schäden an DNS mit Hilfe des HREM soll neue Wege aufzeigen, toxikologisch relevante Effekte von Substanzen auf die Umwelt nachzuweisen.

Eine Zickzack-Anordnung der linearen Fibronectin-Typ III-Domänen des Tenascins (FN type III) wurde aufgrund kristallographischer Daten und energetischer Betrachtungen angenommen. Diese Faltstruktur der Tenascin- FN type III-Domänen wurde im HREM nach Doppelachsenrotationsbedampfung abgebildet. Betrachtet man die strukturelle Ähnlichkeit zwischen FN type III-Domänen und Immunglobulin (Ig C2)-Domänen, so muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass immunglobulin-ähnliche Domänen ebenfalls Zickzacklinien bilden. Diese Anordnung der Strukturelemente ist notwendig, um eine Interaktion Ig C2-ähnlicher Domänen zu ermöglichen. So kann diese Modellvorstellung zu einem besserem Verständnis der Interaktion zwischen Tenascin und Contactin/F11 führen, denn Contactin/F11, das der Immunglobulin Superfamily zugeordnet wird, bindet über ein Epitop

Abstract

innerhalb seiner immunglobulin-ähnlichen Domänen an die FN type III Domänen Tenascins.

Die Konformation von mitochondrialer DNS wird verändert, wenn Fe(III):gluconate von Mitochondrien während einer *in vitro* Inkubation aufgenommen wird; und zwar erfolgt ein "Unwinding" der DNS. Dosisabhängige Assays der Konformation mitochondrialer DNS wurden in Kombination mit Gel-Elektrophorese, HPLC, und HREM angefertigt. Quantitative Messungen und die qualitative Beurteilung der Konformationsänderung der DNS konnten anhand des "degree of unwinding" gemacht werden. Wenn unter *in vivo* - Bedingungen Mitochondrien Fe(III):gluconate-Dosen in der Größenordnung von 60 μ M bis 500 μ M ausgesetzt werden, akkumulieren innerhalb von 15 Minuten 30 nmol/mg mitochondriales Protein mit einer Halbwertszeit von 5 Minuten. Die "supercoiled" Form der mtDNA ist die häufigste Form *in vivo*.

Mittels Gel-Elektrophorese extrahierte Kontroll mtDNA, die nicht den Eisensalz ausgesetzt war, zeigt 60% \pm 6% (Standardabweichung, n=2) supercoiled, Typ I mtDNA, 36% \pm 6% open circular relaxed, Typ II mtDNA, und 4% \pm 2% linear, Typ III mtDNA.

Die aus Mitochondrien isolierte mtDNA, welche vorher mit 60 μ M Fe(III):gluconate inkubiert wurde, zeigt eine Verringerung der Menge von Typ I mtDNA auf 32% \pm 10% und eine Vermehrung auf Typ II mtDNA auf 64% \pm 10%. Die Typ II mtDNA zeigt keine Veränderung. Wenn die Fe(III):gluconate Konzentration auf 500 μ M erhöht wird verringert sich die Typ I mtDNA auf 10% \pm 3% und die Typ II mtDNA erhöht sich auf 86% \pm 3%, während die Typ III mtDNA unverändert bleibt.

HREM der isolierten mtDNA zeigt detaillierte Bilder aller verschiedenen Formen der mtDNA. Diese Bilder korrespondieren mit den Konformationsformen der mtDNA, die durch Gelelektrophorese und Southern blotting gefunden wurden.