



Doctoral Thesis

Molecular and cytological studies of the BR6 gene in *Chironomus tentans* polytene chromosomes

Author(s):

Gilligan, Deirdre

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001402089> →

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](#).

**MOLECULAR AND CYTOLOGICAL STUDIES OF
THE BR6 GENE IN *CHIRONOMUS TENTANS*
POLYTENE CHROMOSOMES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

DEIRDRE GILLIGAN
B.A. (Mod.) Nat. Sci.
born September 24, 1963
citizen of Ireland



accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M. Lezzi, examiner
PD Dr. F. Thoma, co-examiner
Prof. Dr. H. Zuber, co-examiner

Summary

A polytene chromosome band is generally thought to consist of compact chromatin and to be transcriptionally inactive, whereas at the other extreme, a puff is believed to consist of highly decondensed chromatin and to be highly transcriptionally active. However, there are still many controversies surrounding both the chromatin structure and the function of the different morphological features associated with polytene chromosomes. This thesis focuses on the structure /function relationship of a polytene chromosome locus, and attempts to relate the cytological appearance of that locus to its higher order chromatin conformation, by applying both cytological and biochemical techniques.

The locus chosen for investigation is Balbiani ring 6 (BR6) of the Dipteran *Chironomus tentans* since its expression and cytological decondensation can be induced. This induction can be achieved by culturing the larvae in the presence of glycerol. This inducer effect has been found to be inhibited by the addition of phosphate to the culture medium. The BR6 locus was therefore examined in glycerol treated larvae, phosphate treated larvae and in a control group of larvae (untreated), over a six day treatment period.

By light microscopy, the BR6 locus was observed to decondense in glycerol treated larvae, reaching Balbiani ring proportions towards the end of the experimental period. In phosphate treated larvae, the locus always appeared compact, whilst in the control group it underwent an apparently intermediate degree of decondensation.

The biochemical approach taken for the study of chromatin is a DNase I digestion assay in which accessibility of a restriction fragment to DNase I digestion is monitored over increasing enzyme concentration by Southern blot hybridization and quantitation of the resulting signals. The large size of salivary gland polytene nuclei prohibits suspending and aliquoting them which necessitated the separate isolation and preparation of each sample of nuclei for digestion with DNase I. This led to a rather large variation between sample amounts and the resulting hybridization signals which made interpretation of the data difficult and hindered a temporal monitoring of alterations in accessibility of *BR6* chromatin to DNase I digestion. However, by pooling and averaging the data, the *BR6* fragment appeared to be more accessible to DNase I digestion in glycerol treated larvae, than in the other two groups of larvae. In phosphate treated larvae, the *BR6* fragment appeared to be slightly less accessible to digestion than in untreated larvae. Although these observations require verification, they are consistent with the cytological findings and therefore would support the view that a locus, which appears dense by light

microscopy, consists of relatively compact chromatin, whereas one which appears less dense has a more accessible or open chromatin structure.

Both RNA blot hybridization and the induced endogenous hybrid (IEH) technique, which reveals the presence of RNA *in situ*, demonstrated that transcription of the *BR6* gene is induced to high levels in glycerol treated larvae. In the phosphate treated and untreated larvae, only a very low amount of *BR6* gene transcription was detected by the IEH method; steady state levels of *BR6* RNA were not detected in these larvae. The results of these transcription studies are compatible with the *BR6* structural findings in that *BR6* chromatin which is in a relatively open conformation is more accessible to RNA polymerase and the appropriate transcription factors.

In order to determine whether such chromatin structural changes occur prior to or concomitant with the transcription process, further experiments in which the sampling time interval is shorter than that used here is needed.

Zusammenfassung

Es wird allgemein angenommen, daß ein Polytänchromosomenband aus kompaktem Chromatin besteht und in Bezug auf Transcription inaktiv ist; die Struktur eines Puffs hingegen besteht aus dekodensiertem Chromatin und wird als transcriptionell aktiv bezeichnet. Die Chromatinstruktur ist jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen, ebenso wie die Bedeutung von morphologischen Charakteristika, die bei diesen Chromosomen beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Funktion und Struktur eines Polytänchromosomenlocus und die Beziehung zwischen dem zytologischen Erscheinungsbild des Locus und seiner Chromatinkonformation untersucht. Dabei kommen sowohl zytologische als auch biochemische Techniken zur Anwendung.

Gegenstand der Untersuchungen ist Balbiani-Ring 6 (BR6) bei *Chironomus tentans*, dessen Expression und zytologische Dekondensation induziert werden kann. Durch die Kultivierung der Larven in Gegenwart von Glycerin kann eine Induktion erreicht werden. Dieser induzierende Effekt kann mittels der Zugabe von Phosphat zum Kulturmedium inhibiert werden. Deshalb wurde der BR6-Locus an Gruppen von Larven studiert, die mit Glycerin und Phosphat behandelt wurden. Als Kontrollgruppe für die sich über eine Experimentierperiode von sechs Tagen erstreckenden Versuche dienten Larven ohne Zusatz zum Medium.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten bei mit Glycerin behandelten Larven Dekondensation, die gegen Ende der Experimentierperiode den Umfang von Balbiani-Ringen erreichten. In der Phosphatgruppe wurde ein kompakter Locus beobachtet, die Kontrollgruppe zeigte Zwischenstufe der Dekondensation.

Als biochemische Methode diente ein DNase I-Verdauungsansatz. Dabei wurde die Verdauung eines Restriktionsfragments durch DNase I als Funktion der Enzymkonzentration mittels einer Southern-Blot-Hybridisierung und nachfolgender Quantifizierung der Signale ermittelt. Aufgrund ihrer Größe in Speicheldrüsen, ist das Ansetzen einer gleichmäßig durchmischten Suspension der polytänen Zellkerne nicht möglich, so daß das genetische Material für jede einzelne Probe separat isoliert und aufbereitet werden mußte. Dies verursachte Schwankungen in der Menge des Materials einer jeden Probe und damit auch in den Hybridisierungssignalen. Eine Interpretation der Daten wurde dadurch erschwert und die Analyse der Ergebnisse als Funktion der Experimentierperiode eingeschränkt. Eine Mittelwertbildung der Daten über die ganze Versuchsdauer zeigte jedoch, daß das *BR6*-Fragment der Glyceringruppe einer

Verdauung durch DNase I eher zugänglich ist als dasjenige in den beiden anderen Gruppen. In der Phosphatgruppe erschien das *BR6*-Fragment einer Verdauung etwas weniger zugänglich als in der Kontrollgruppe. Obwohl diese Beobachtungen einer Bestätigung bedürfen, sind sie konsistent mit den zytologischen Ergebnissen und unterstützen daher die These, daß lichtmikroskopisch dicht erscheinende Bänder aus kompaktem Chromatin bestehen, wo hingegen dekondensierte Regionen eine eher zugängliche oder offenere Chromatinstruktur aufweisen.

Sowohl mit RNA Hybridisierung als auch mit induzierter endogener Hybridtechnik (IEH), welche die Anwesenheit von RNA *in situ* nachweist, zeigt sich, daß die Transcription des *BR6*-Genes in der Gegenwart von Glycerin erheblich induziert wird. Bei der Zugabe von Phosphat und in der Kontrollgruppe wurde in den IEH-Experimenten nur ein geringes Niveau von *BR6*-Transcription gemessen; Anreicherung von *BR6*-RNA wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse dieser Transcriptionsuntersuchungen sind kompatibel mit den Beobachtungen der *BR6*-Struktur insofern, als *BR6*-Chromatin, welches sich in einer relativ offenen Konformation befindet, für RNA-Polymerase und die entsprechenden Transcriptionfaktoren eher zugänglich ist.

Um die Frage zu beantworten, ob solche Änderungen der Chromatinstruktur vor der Transcription oder als Konsequenz der Transcriptionsprozesses stattfinden, sind weitere Experimente mit einem kürzeren Intervall der Probenentnahme notwendig.