



Doctoral Thesis

## The replication of SV40 chromatin nucleosome segregation and termination

**Author(s):**

Wu, Jiarui

**Publication Date:**

1994

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001435981> →

**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](#).

# **The Replication of SV40 Chromatin: Nucleosome Segregation and Termination**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by

**JARUI WU**

M. S. of Academia Sinica, China

born 14. 12, 1956

Chinese citizen



accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Th. Koller, examiner

Prof. Dr. U. Suter, co-examiner

Dr. J. M. Sogo, co-examiner

## Zusammenfassung

Das Muster der Nukleosomenverlagerung während der Replikation des SV40-Chromatins wurde "in vivo" untersucht. SV40-infizierte TC7-Zellen wurden mit Proteinsynthese-Inhibitoren behandelt (Emetin und Cycloheximid). Nach der Behandlung wurden Kerne von infizierten Zellen isoliert und das gesamte Chromatin mit Psoralen "in situ" quervernetzt. Die vernetzte SV40-DNS wurde gereinigt und unter denaturierenden Bedingungen im Elektronenmikroskop analysiert. Es wurde bereits früher gezeigt, dass einsträngige DNS-Blasen (ss-bubbles) von ungefähr 160 Nukleotiden Länge aus nukleosomaler DNS bestehen, die durch Histone gegen Psoralen-Quervernetzung geschützt ist. Diese einsträngigen Blasen sind auf beiden Tochtersträngen von Psoralen-behandelten replizierenden SV40-Molekülen zufällig verteilt. Dieses Ergebnis unterstützt das Streuungsmodell der Nukleosomenverlagerung. Ausserdem liess die elektronenmikroskopische Analyse dieser unter nicht-denaturierenden Bedingungen replizierenden SV40-Moleküle erkennen, dass lange einsträngige DNS-Regionen (~250 Nukleotide) auf einem der Arme (höchstwahrscheinlich dem Folgestrang) der Replikationsgabel vorhanden sind. Wenn bei der Protein-Synthese kein Inhibitor verwendet wurde, wurden keine solchen einsträngigen DNS-Lücken in replizierenden SV40-Molekülen gefunden. Dieses lässt den Schluss zu, dass Emetin und Cycloheximid bevorzugt die Synthese von Okazaki-Fragmenten auf den Folgesträngen der Gabeln hemmen und damit eine "unausgewogene DNS-Synthese" verursachen.

Die statistische Analyse der Grössenverteilung einsträngiger Blasen in Psoralen-behandeltem SV40-Chromatin zeigte in neu replizierter DNS zwei unterschiedliche Populationen von einsträngigen Blasen. Eine entspricht der Grösse nukleosomaler DNS, und die andere ist ungefähr halb so gross. Die kleinen Blasen sind ein Zeichen für die Entstehung von subnukleosomalen Partikeln auf den Tochtersträngen während der Nukleosomenverteilung, wenn keine Proteinsynthese stattfindet. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden native und mit Salz behandelte SV40-Minichromosomen, welche von infizierten TC7-Zellen isoliert worden waren, als Substrate für "in vitro"-Replikation in einem cytosolischen S100-Extrakt (histonfrei) verwendet. "In vitro"-replizierende Moleküle wurden mit Psoralen quervernetzt, und die Chromatinstruktur der frisch synthetisierten Tochterstränge wurde im Elektronenmikroskop analysiert. Die Ergebnisse bestätigten erneut, dass beim Fehlen von freien Histonen zwei Populationen von einsträngigen Blasen auf den Tochtersträngen von replizierenden SV40-Molekülen vorhanden sind. Replizierende SV40-Minichromosomen wurden auch mit Micrococcus-Nuclease behandelt. Nach langer Verdauungszeit erscheinen zwei starke Banden mit ca. 80 und 190 bp, was gut mit den elektronenmikroskopischen Ergebnissen übereinstimmt. Da ein Experiment von "in vitro" rekonstituiertem Chromatin mit gereinigten H3/H4-Tetrameren zeigte, dass nur ein DNA-Teilstück von ~80 bp Länge gegen Psoralen-Quervernetzung oder Nukleaseverdau geschützt

ist, nehme ich an, dass es sich bei diesen subnukleosomalen Partikeln auf den Tochtersträngen, welche bei Abwesenheit von freien oder frisch synthetisierten Histonen gefunden wurden, höchstwahrscheinlich um H3/H4-Tetramerkomplexe handelt. "In vitro"-Chromatinreplikation in Gegenwart eines H2A/H2B-Überschusses ergibt hauptsächlich einsträngige Blasen mit nukleosomaler Grösse. Die Analyse mit Micrococcus-Nuclease zeigte, dass unter diesen Bedingungen ein grosser Teil der kürzeren 80 bp-Bande zur längeren 180 bp-Bande gewandert war. Wenn ein 5- und 10-facher Überschuss von "competitor" DNS während der "in vitro"-Chromatinreplikation vorhanden war, wurden die replizierenden Moleküle durch Micrococcus-Nuclease beträchtlich abgebaut, und die Zahl der einsträngigen Blasen auf den Tochtersträngen wurde auf ein vernachlässigbares Niveau verringert. Die Resultate zeigen, dass die "competitor"-DNS die dissoziierten Histone abfängt. Im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Daten weist dies darauf hin, dass in der Replikationsgabel die "Eltern"-Histone nur locker oder überhaupt nicht auf der DNS sitzen. Die Replikation bei Abwesenheit freier Histone zeigt, dass ein subnukleosomales Partikel auf den Tochtersträngen zufällig zusammengesetzt wird. Die Daten stimmen mit der Bildung eines H3/H4-Tetramerkomplexes unter diesen Bedingungen überein, und unterstützen die Meinung, dass der "in vitro"-Aufbau von Nukleosomenkernen auf den neu synthetisierten Tochtersträngen durch Bindung von H2A/H2B-Dimeren an einen H3/H4-Tetramerkomplex stattfindet.

Die "Termination" der SV40-Chromatinreplikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und Elektronenmikroskopie untersucht. Aus infizierten TC7-Zellen gewonnene gereinigte SV40-DNA wurde an eine BND-Zellulose-Säule gebunden, und die replizierenden Moleküle wurden mit Koffein eluiert. Das Koffein-Eluat wurde mit BamHI verdaut und mittels 2-dimensionaler "neutral/neutral" Agarose-Gelelektrophorese (2-D Gel) analysiert. Die Gelbereiche, die mögliche Terminations-Zwischenprodukte enthielten, wurden ausgeschnitten, die DNS wurde eluiert und unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Elektronenmikroskop untersucht. Es wurde eine neuartige Struktur beobachtet, die aus einem zirkulären Teil, entsprechend dem ganzen SV40-Genom, mit einem langen linearen Schwanz von fast gleicher Länge wie das SV40-Genom besteht (sogenannte "δ"-Moleküle). Diese "δ"-Moleküle wurden mit einer neuartigen 3-dimensionalen Agarose Gel Elektrophorese (3-D gel) analysiert, d. h., dass man mit einem "neutral/neutral"-2-D Gel Replikations-Zwischenprodukte auftrennt, dann Gelstücke aus dem Bereich mit "δ"-Molekülen ausschneidet, und mit ihnen ein weiteres neutrales oder alkalisches Agarosegel laufen lässt. Die Ergebnisse des 3-D Gels lassen schliessen, dass diese "δ"-Moleküle höchstwahrscheinlich sehr späte Replikations-Zwischenprodukte sind, welche teilweise BamHI-resistent sind. Bei diesen Molekülen besteht der Leitstrang aus doppelsträngiger DNS, die eine BamHI-Erkennungssequenz besitzt und von BamHI geschnitten werden kann, jedoch der Folgestrang im Bereich dieser Sequenz einsträngige DNS aufweist und von BamHI nicht geschnitten werden kann. Hinzu kommt noch, dass das Verhältnis von "δ"-

Molekülen zu späten Replikations-Zwischenprodukten anstieg, wenn die Topoisomerase II-Aktivität entweder durch hypertonisches Medium oder durch den Inhibitor VP-16 blockiert wird. Das bedeutet, dass Topoisomerase II bei der Herstellung (production) und Trennung (separation) dieser späten Replikations-Zwischenprodukte eine Rolle spielen könnte.

## Abstract

The pattern of nucleosome segregation during SV40 chromatin replication was studied *in vivo*. TC7 cells were infected with SV40 virus and then treated with inhibitors of protein synthesis (emetine and cycloheximide). After the treatment, nuclei of infected cells were collected and chromosomes were crosslinked with psoralen *in situ*. The crosslinked SV40 DNA was purified and analysed by electron microscopy under denaturing conditions. It was shown previously that under these conditions single-stranded DNA bubbles (ss-bubble) of size of about 160 nucleotides are nucleosomal DNA which is protected by the histones against psoralen crosslinking. These ss-bubbles are randomly distributed on both daughter strands of drug-treated SV40 replicative intermediates. This finding supports the dispersive model of nucleosome segregation. Moreover, the electron microscopical analysis of these SV40 replicative intermediates under non-denaturing conditions revealed that long single-stranded DNA regions (~ 250 nucleotides) are present on one of the arms (most probably the retrograde arms) of the replication forks. In the absence inhibitor of protein synthesis no such ssDNA gaps were found in SV40 replicating molecules. This suggests that emetine and cycloheximide preferentially inhibit Okazaki fragment synthesis on retrograde arms of forks to produce an "imbalanced DNA synthesis".

The statistical analysis of the size distribution of the ss-bubbles from drug-treated and psoralen-crosslinked SV40 chromatin showed two populations of the ss-bubbles on the newly replicated DNA. One of them corresponds to the size of nucleosomal DNA and the other is about half of that size. The small bubbles suggest the formation of subnucleosomal particles on the daughter strands during the nucleosome segregation in the absence of histone synthesis. To confirm this suggestion, native and salt-treated SV40 minichromosomes collected from infected TC7 cells were used as the substrates for *in vitro* replication in a cytosolic S100 extract in the putative absence of free histones. *In vitro* replicating molecules were crosslinked with psoralen and the chromatin structure of the newly synthesized daughter strands was analysed by electron microscopy. The data showed again that two populations of ss-bubbles are present on the daughter strands of replicating SV40 molecules in the absence of free histones. Replicative intermediates were also treated with micrococcal nuclease. After long digestion two dominant bands of around 80 bp and 190 bp appear, which is in good agreement with the electron microscopical images. Since an experiment of *in vitro* reconstituted chromatin with purified H3/H4 tetramers showed that only one size class of ~80 bp of DNA are protected against psoralen crosslinking or nuclease digestion, I propose that these subnucleosomal particles on daughter strands found in the absence of free or newly synthesized histones are most probably H3/H4-tetramer complexes. *In vitro* chromatin replication in the presence of excess of H2A/H2B produces mainly ss-bubbles of nucleosomal size. Micrococcal nuclease analysis showed that a large proportion of the small band of 80 bp was shifted to a larger band of 180 bp under these conditions. When a 5 and 10

fold excess of protein-free competitor DNA was present during the *in vitro* chromatin replication, the replicating molecules were degraded considerably by micrococcal nuclease and the amount of ss-bubbles on the daughter strands was decreased to background level. The results indicate that competitor DNA traps the segregating histones. Opposite to published data this suggests that the parental histones remain only loosely or not attached to the DNA in the region of the replication fork. Replication in the putative absence of free histones shows that a subnucleosomal particle is randomly assembled on the daughter strands. The data are compatible with the formation of a H3/H4 tetramer complex under these conditions, supporting the notion that *in vivo* nucleosome core assembly on the newly synthesized daughter strands occurs by the binding of H2A/H2B dimers to a H3/H4 tetramer complex.

Termination of SV40 chromatin replication was analysed by agarose gel electrophoresis and electron microscopy. SV40 DNA purified from infected TC7 cells was allowed to adsorb to a BND-cellulose column and the replicating molecules were eluted with caffeine. The caffeine wash was digested with BamHI and analysed by neutral/neutral two-dimensional agarose gel (2-D gel) electrophoresis. The area of the gel containing putative termination intermediates was cut out, and the DNA was eluted and analysed by electron microscopy under non-denaturing conditions. We observed a new kind of structure which consists of one circle corresponding to the whole SV40 genome with one long tail nearly equal to the length of the SV40 genome (so-called "δ" molecules). These "δ" molecules were analysed with a novel three-dimensional agarose gel (3-D gel) electrophoresis, which involves running a neutral/neutral 2-D gel to separate replicative intermediates, then cutting out gel slices from the area containing "δ" molecules and running another neutral or alkaline agarose gel for these gel slices. The results from the 3-D gel suggest that these "δ" molecules most probably originate from the BamHI cleavage of very late replicative intermediates. In these molecules the leading strand is duplex DNA containing BamHI recognition sequence and can be cut by BamHI, however, the lagging strand contains single-stranded DNA region at these sequence and is resistant to the BamHI cleavage. In addition, when the activity of topoisomerase II is inhibited either by hypertonic medium or by inhibitor VP-16, the proportion of "δ" molecules increased with respect to the late replicative intermediates, indicating topoisomerase II might be involved in the production and separation of these very late replicative intermediates.