

# The 30-nm chromatin fiber

## In vitro reconstitution and structural analysis

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Schalch, Thomas

**Publication date:**

2004

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004845137>

**Rights / license:**

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

DISS. ETH NO. 15766

**The 30-nm Chromatin Fiber:  
*in vitro* Reconstitution  
and  
Structural Analysis**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
THOMAS SCHALCH  
Dipl. Natw. ETH

born April 4, 1975

citizen of  
Schaffhausen SH

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. T. J. Richmond, examiner  
Prof. Dr. K. Wüthrich, coexaminer

Zurich, 2004

# Summary

Chromatin is a complex of DNA and proteins that organizes the genetic material in the eukaryotic nucleus. The dynamics and structure of chromatin are directly involved in control of gene expression and many other nuclear processes.

The nucleosomes, consisting of approximately 147 bp of DNA wound around a histone octamer and an additional 10-90 bp of linker DNA complexed with linker histone H1, are the fundamental structural repeating unit of chromatin. Nucleosomes in a eukaryotic genome are spaced quite regularly and form fibers of 30 nm in diameter, referred to as the 30-nm chromatin fiber or chromatin higher order structure.

While the nucleosome core particle is structurally well characterized, the folding of nucleosomes into the chromatin fiber has remained a controversial issue due to the heterogeneity and flexibility of the native material. Two main classes of helical models have been proposed: the one-start solenoid models with nucleosomes arranged side by side, coiling into a helix, and the two-start models, with the nucleosomes zigzagging back and forth to form a two-stranded, helical arrangement.

In order to gain the information necessary for a detailed description of the 30-nm chromatin fiber, a new, completely recombinant approach was chosen, based on the existing recombinant histone technology. For the DNA template, the exceptionally strong nucleosome positioning sequence 601 was found to provide the homogeneity and positional stability needed to perform high resolution studies.

Characterization of the salt-dependent compaction of nucleosome arrays by analytical ultracentrifugation was important to define the conditions where the maximally compacted arrays are obtained. The comparison of arrays with different nucleosomal repeat lengths reveals a 10 bp periodicity for the degree of compaction with maxima at 157, 167 and 177 bp. Subsequent studies of crosslinked arrays using electron microscopy showed that a two-start structure is inherent to the compact fiber structure.

Based on the previous results, short oligonucleosome constructs were designed and set up for crystallization. Crystals could be obtained for tetranucleosomes with 157 and 167 bp repeat length, and the two crystal structures were determined at 7.5 and 8.0 Å resolution, respectively. A fiber model generated from the 167 bp tetranucleosome displays a helically twisted chromatin higher-order-structure arrangement with essentially straight linker DNA.

# Zusammenfassung

Chromatin ist ein Komplex aus DNA und Proteinen, der das genetische Material in einem eukaryotischen Zellkern organisiert. Die Chromatinstruktur und -dynamik beeinflussen die Transkription von Genen und viele andere Prozesse des Zellkerns.

Das Nukleosom, die Grundeinheit des Chromatins, besteht aus 147 Basenpaaren (bp) DNA, die um ein Histon Oktamer gewunden sind, und zusätzlichen 10-90 bp DNA zwischen den Nukleosomen, die vom Histon H1 gebunden werden. Das gesamte eukaryotische Genom ist von Nukleosomen bedeckt, die sich in eine Faser mit ca. 30 nm Durchmesser falten. Diese Struktur wird als 30-nm Chromatin Faser oder "Chromatin Higher Order Structure" bezeichnet.

Im Gegensatz zum Nukleosom, das strukturell ausgezeichnet untersucht wurde, ist der Aufbau der 30-nm Chromatin Faser, wegen ihrer Heterogenität and Fragilität experimentell schlecht zugänglich, immer noch ein umstrittener Gegenstand aktueller Forschung. Die zwei wichtigsten Klassen von Modellen sind die "Solenoid" Modelle, wo sich eine Reihe Nukleosome in eine Helix windet, und die Klasse der "two-start" Modelle, in welchem sich die Nukleosome im Zickzack anordnen und so zwei Reihen bilden, die sich helixartig aufwinden.

Um die erforderlichen Informationen zur detaillierten Beschreibung der 30-nm Chromatin Faser zugänglich zu machen, wurde ein neuer, gänzlich auf rekombinanter Technologie basierender Ansatz gewählt. Dazu wurden rekombinante Histone verwendet, zusammen mit der ausserordentlich starken Nukleosom-positionierenden 601 DNA Sequenz.

Die Charakterisierung der salzabhängigen Kompaktion von Nukleosomfasern mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation war wichtig für die Definition maximal kompatierender Bedingungen. Vergleiche von Fasern mit unterschiedlicher nukleosomaler DNA Länge zeigten, dass der Grad der Kompaktion von einer 10 bp Periodizität abhängt, mit Maxima bei 157, 167 und 177 bp.

In darauffolgenden elektronenmikroskopischen Studien mit kompaktierten und stabilisierten Fasern wurde festgestellt, dass die Nukleosomfasern auf einer "two-start" zweireihen-Architektur basieren. Motiviert durch diese Resultate wurden kurze Oligonukleosome für die Kristallisation angesetzt. Tetranukleosom Kristalle mit Einheitslängen von 157 und 167 bp konnten gezüchtet werden und die zwei Strukturen wurden bei 7.5 und 8.0 Å Auflösung bestimmt. Das Chromatin Faser Model, das aus der 167 bp Struktur resultiert, entspricht einer zweireihigen Helix mit gerader Linker DNA.