

Quasielastische Lichtstreuung von isoliertem Chromatin

Quasielastic Light Scattering of Isolated Chromatin

Bernd Meuel*, Holger Notbohm

Institut für Medizinische Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Lüneburg,
Ratzeburger Allee 160, D-2400 Lüneburg 1

Z. Naturforsch. **38 c**, 126–134 (1983); received July 23/November 22, 1982

Chromatin, Quasielastic Light Scattering

Chromatin undergoes structural changes in dependence on the ionic strength of monovalent cations. At low ionic strength an extended chain of nucleosomes is apparent while with increasing ionic strength more compact structures are formed. Soluble chromatin was prepared from rat liver and fractionated by gel chromatography. Quasielastic light scattering experiments on chromatin were done with monovalent salt concentrations ranging from 3–150 mM.

Using this method translational diffusion coefficients have been derived. These appeared to be nearly independent of monovalent salt concentrations, indicating that the hydrodynamic radius of chromatin molecules did not change. On the other hand, sedimentation coefficients were increasing according to an exponential relation. Taken together, both findings reveal a rising of the molar mass with increasing ionic strength. On the contrary, chromatin prepared in physiological salt apparently disintegrates by lowering the ionic strength. Furthermore, it could be demonstrated by earlier small angle X-ray scattering studies that the diameter of the higher order chromatin fiber remained constant at approximately 32 nm even if these structures had been reconstituted from smaller pieces starting at low ionic strength. Thus, isolated chromatin fibers are capable of self-assembling to regular quaternary structures, even if the DNA does not form a continuous strand.

Einleitung

Die genetische Information der Eukaryontenzellen ist im Zellkern als Chromatin enthalten, das sich aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteinen zusammensetzt. Isoliertes Chromatin liegt praktisch immer in Form von Makromolekülen vor, welche nur Bruchstücke der ursprünglichen Strukturen darstellen. Die Proteine sind zu 80% die Histone, von denen jeweils vier als Oktamer einen etwa globulären Komplex bilden, um den die DNA helixförmig gewunden ist. Diese sog. Nukleosomen bilden aneinandergereiht die Tertiärstruktur des Chromatins (Chromatinfibrille mit einem Durchmesser von ≈ 11 nm). Ein weiteres Histon (H1) gehört ebenfalls zu diesem Komplex; es ist vor allem von Bedeutung für die Ausbildung höherer Strukturen. Unter etwa physiologischen Salzbedingungen liegt isoliertes Chromatin – das gleiche gilt für die Verhältnisse im Interphasezellkern – überwiegend in der Quartärstruktur vor [1, 2]. Von dieser Struktur gibt es vor

allem zwei Modellvorstellungen, die Organisation als Solenoid oder als sog. "Superbeads" [3, 4]. Bei der Transkription muß sich die Quartärstruktur so ändern, daß die RNA-Polymerasen die Information ungestört nutzen können. Dazu ist ein Übergang mindestens zur Tertiärstruktur notwendig; *in vitro* kann bei isoliertem Chromatin ein solcher Übergang durch Erniedrigung der Salzkonzentration erreicht werden. Um in diesen strukturellen Übergang Einblicke zu gewinnen, wurde in eigenen Untersuchungen das Verhalten von Chromatin bei unterschiedlichen Ionenstärken verfolgt und dabei das Phänomen der quasielastischen Lichtstreuung als Meßverfahren eingesetzt.

Bei dieser Meßmethode läßt sich aus der Laserlichtstreuung an den untersuchten Makromolekülen in sehr kurzer Zeit der Diffusionskoeffizient ableiten und damit – bei bekanntem Sedimentationskoeffizienten – die Molmasse. Vor allem bei der Untersuchung von sehr großen Molekülen (Molmasse $> 10^6$) ist dies Verfahren den klassischen Methoden zur Bestimmung der Molmasse und des Diffusionskoeffizienten überlegen. Bei der Untersuchung biologischer Proben hat man es meist mit polydispersem Material zu tun, das hinsichtlich der Molmasse, gegebenenfalls aber auch hinsichtlich der Molekülformen, ein unbekanntes Verteilungsbild

* Diese Arbeit ist Teil einer Dissertation von B. M. in der Mathem. Naturw. Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Sonderdruckanforderungen an Dr. B. Meuel.

0341-0382/83/0100-0126 \$ 01.30/0

aufweist. Bei nichtsphärischen Körpern, wie z.B. Chromatin und DNA, treten neben der Translationsbewegung noch Rotation und – bei sehr langen Molekülen – auch innere Bewegungen auf. Ferner können chemische Reaktionen, z.B. in Form von intermolekularen Ladungswechselwirkungen, in weiterer Folge zu Änderungen des Diffusionskoeffizienten führen [5]. Diese unterschiedlichen Bewegungsvorgänge eines Moleküls erzeugen verschiedene zeitabhängige Fluktuationen der quasielastischen Lichtstreuung, über die man dann mit geeigneten theoretischen Ansätzen Diffusionskoeffizienten bestimmen kann.

Die Ermittlung der Gesamtintensität des Streulichtes, die bei der Messung der quasielastischen Lichtstreuung gleichzeitig mitregistriert wird, ermöglicht zudem eine direkte Berechnung der Molmasse ohne parallel durchzuführende Untersuchung des Sedimentationsverhaltens. Mit den hier angewandten Methoden sollte es also möglich sein, die hydrodynamischen Eigenschaften des Chromatins zu untersuchen, um damit strukturelle Veränderungen beschreiben zu können.

Material und Methoden

Chromatinpräparation

Chromatin wurde nach Isolierung von Rattenleberzellkernen (Pogo *et al.* [6]) und anschließender

Lyse der Zellkerne präpariert (modifiziert nach Muyldermans *et al.* [7]) und durch Gelchromatographie fraktioniert (Brust und Harbers [8]). Für die Gelchromatographie wurde das Chromatin dann gegen einen Puffer (0.1 M KCl, 0.02 M Tris/HCl, 0.005 M Zitronensäure, pH 7.4) dialysiert, so daß sich das Chromatin in einem Lösungsmittel mit etwa physiologischer Ionenstärke befand. Ferner wurde nach der Methode von Noll [9] präpariert, wobei Chromatin in 0.2 mM EDTA gelöst wird. Um Chromatin in Lösungsmitteln unterschiedlicher Ionenstärke zu untersuchen, wurden Fraktionen einer gelchromatographisch gereinigten Chromatinpräparation so zusammengefaßt, daß für eine Meßreihe eine ausreichende Konzentration ($E_{260} = 1-5$) bei einer Menge von jeweils etwa 15 ml vorlag. Die Proben wurden dann gleichzeitig dialysiert und anschließend gemessen. Um die Dichte der Meßpunkte in Bezug auf die Ionenstärkenabhängigkeit zu vergrößern, wurden die gleichen Proben noch einmal mit Lösungsmitteln dazwischenliegender Werte für die Ionenstärken dialysiert. Über Kontrollmessungen, bei denen die Ionenstärke nicht verändert wurde, konnte sichergestellt werden, daß während des zweiten Dialyseschlittes das Chromatin nicht abgebaut worden war. In physiologischer Ionenstärke präpariertes Chromatin wurde in ein Lösungsmittel niedriger Ionenstärke überführt und dann über Dialyse wie oben beschrieben bei Ionenstärken von 1–150 mM untersucht. In den betreffen-

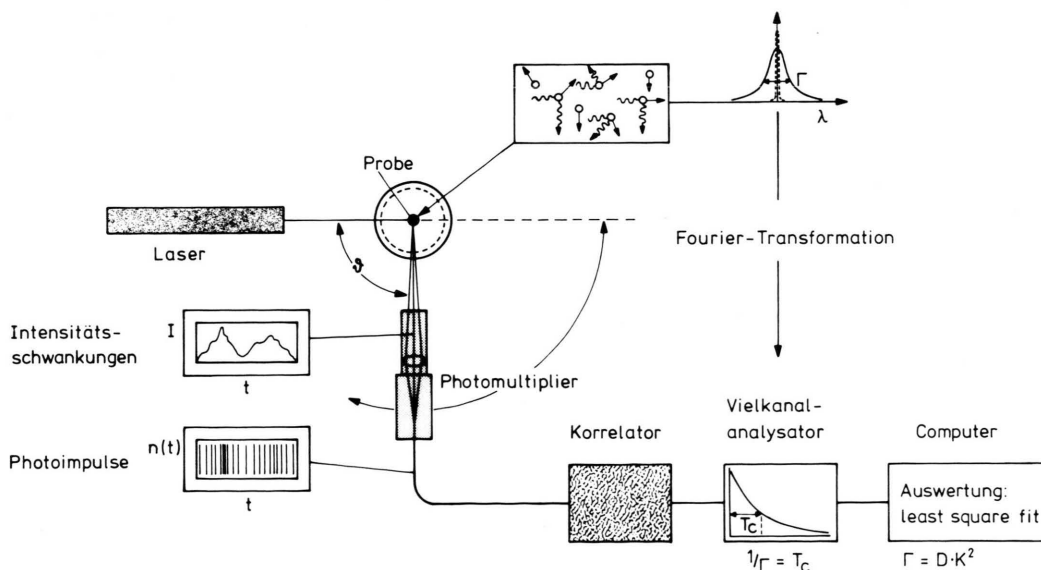


Abb. 1. Schematische Darstellung einer Meßapparatur zur Erfassung der quasielastischen Lichtstreuung.

den Meßreihen wurden immer alle Komponenten des Ausgangslösungsmittels einschließlich Puffer verdünnt. Ähnlich wurde mit Chromatin, das nach der Präparationsmethode von Noll gewonnen wurde, verfahren. In diesem Falle wurden jedoch der Ausgangslösung ansteigende Mengen NaCl zugegeben.

Quasielastische Lichtstreuung

Das Meßverfahren und der Aufbau der Apparatur zur Erfassung der quasielastischen Lichtstreuung sind im Schema der Abb. 1 vereinfacht dargestellt. Strahlungsquelle ist ein 15 mW He/Ne Laser (Spectra Physics, Darmstadt) mit einer Wellenlänge von 632,8 nm. Die 100 Meßkanäle des Korrelators (K7023, Malvern Instruments, UK) werden in einen PDP 11/34 Rechner (Digital Equipment, USA) eingelesen und für eine spätere Verarbeitung abgespeichert.

Die Lichtstreuung kommt durch eine Verschiebung der Moleküle in der Größenordnung der Lichtwellenlänge zustande, deren Zeitabhängigkeit die thermische Bewegung der gelösten Teilchen widerspiegelt. Trifft Licht auf diese bewegten Teilchen, kommt es dadurch zu einem Doppler-Effekt, der zu einer Verbreiterung der Spektrallinie des Laser-Lichtes führt. Diese Frequenzverbreiterung ist dem Diffusionskoeffizienten direkt proportional. Das verbreiterte Spektrum der gestreuten Strahlung entspricht der Fourier-transformierten Autokorrelationsfunktion der Intensitätsschwankungen. Die Autokorrelationsfunktion korreliert die gleiche Funktion $g(t)$ zu den Zeitpunkten t und $t + \tau$, sie stellt also den Zeitmittelwert des Produktes $g(t) \cdot g(t + \tau)$ dar. Ihre Analyse ermöglicht eine Berechnung des Diffusionskoeffizienten. Bei bekannter Verteilung des Sedimentationskoeffizienten läßt sich nach Ermittlung des Diffusionskoeffizienten über die Svedberg-Gleichung die Molmasse bestimmen:

$$M_r = \frac{s}{D} \cdot \frac{R \cdot T}{1 - \bar{v} \cdot \rho} \quad (1)$$

s = Sedimentationskoeffizient

D = Diffusionskoeffizient

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

$\bar{v}$ = partielles spezifisches Volumen des zu bestimmenden Stoffes

ρ = Dichte des Lösungsmittels

Im Falle monodisperser sphärischer Streukörper wird durch die logarithmierten Autokorrelationswerte eine Ausgleichsgerade gelegt, aus deren Steigung sich der Diffusionskoeffizient ergibt.

Biologisches Material ist fast immer polydispers. Daher wurde eine Reihe von computer-unterstützten Verfahren entwickelt, die den Grad der Polydispersität oder sogar Verteilungsfunktionen der Diffusionskoeffizienten zu erfassen in der Lage sein sollen [10]. Die hier angewandte Auswertungsmethode verwendet zwei Exponentialfunktionen; damit lassen sich die mittleren Diffusionskoeffizienten von zwei hinreichend getrennten Verteilungen berechnen. Dies wird hier angewandt, um neben der Korrelationsfunktion der zu untersuchenden Makromoleküle die des Untergrundes abtrennen zu können. Obwohl fast alle Präparationsschritte mit filtrierten Lösungen in einem Laminar Flow-Gerät vorgenommen wurden, blieb ein Staubuntergrund bestehen, welcher während einer Präparation von hochempfindlichem biologischen Material nur unvollständig eliminiert werden kann (z. B. bei der Gravitationsfiltration würden Scherkräfte Strukturveränderungen hervorrufen). Zur Erniedrigung des Staubanteils wurde die Probe schonend 30 min bei $3500 \times g$ zentrifugiert. Dies sind Bedingungen, bei denen Chromatin noch nicht sedimentiert, jedoch der Anteil der Komponente mit geringem Diffusionskoeffizienten (Staub) von 50% auf 10% verringert wird. Dennoch wirkt sich der Staubanteil auf die Korrelationsfunktion aus, was durch eine nicht-lineare Form der Funktion im semilogarithmischen Maßstab deutlich wird (Abb. 2a). Die zweite Komponente hat stets einen Diffusionskoeffizienten von etwa $0,01$ bis $0,001 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ (gemessen bei Kanalzeiten von $0,05 - 0,5 \text{ msec}$), unabhängig vom biologischen Material, das untersucht wurde. Die Bestimmung der Autokorrelationsfunktion erfolgte hier mit einem „Exponentialfunktionenansatz“ (EFA) über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate, angewandt auf die experimentell ermittelten Werte. Die Autokorrelationsfunktion $g(r \cdot T)$ für die hier angewandte sog. „homodyne“ Technik ist also [11]:

$$g(r \cdot T) = A_0 + [A_1 \cdot e^{-\Gamma_1 \cdot r \cdot T} + A_2 \cdot e^{-\Gamma_2 \cdot r \cdot T}]^2. \quad (2)$$

Der Kehrwert der Größe Γ_1 bzw. Γ_2 ist die charakteristische Korrelationszeit, innerhalb derer ein Teilchen die Strecke $1/K$ diffundiert.

Messung der Gesamtintensität des Streulichts

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Molmasse von Makromolekülen in Lösung beruht auf einer Auswertung der Gesamtstreuintensität. Aus Beziehung 3 ergibt sich – ohne Berücksichtigung von konzentrations- und winkelabhängigen Effekten – die relative Molmasse M_r aus der Streuintensität:

$$I - I_B = \xi \cdot M_r \cdot C \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (3)$$

$$\text{mit } \xi = \alpha \cdot I_d \quad \text{und} \quad w = \xi \cdot \left(\frac{dn}{dC} \right)^2.$$

I bezeichnet die Intensität des Streulichtes, I_d die einer Eichlösung. C ist die Gewichtskonzentration des Streumediums; dn/dC gibt das Inkrement des Brechungsindex an (für Chromatin ist $dn/dC = 0,20 \text{ ml/g}$), welches normalerweise – so auch in unserem Falle – konstant ist, und I_B bezeichnet die Intensität des Streulichtes des Lösungsmittels. Die apparaturspezifischen Parameter sind durch Eichmessungen mit Proteinen bekannter Molmasse bestimmt worden (Bovinalbumin, Ovalbumin), einer Anleitung von Pletcher [12] folgend. Diese Größen bleiben jedoch bei allen Versuchen unverändert, so daß $1/w$ nur einmal für jeden Meßwinkel zu bestimmen ist und als Konstante eingesetzt werden kann. Die hier verglichenen Streumeßwerte von Chromatin bei unterschiedlichen Ionenstärken wurden bei konstantem Winkel und bei gleicher Konzentration bestimmt. Daher konnten über die Größe der Molmassen nur qualitative Aussagen gemacht werden, wobei die Werte untereinander jedoch vergleichbar sind.

Eine ausreichende Statistik für die Auswertung der Korrelationsfunktion ergibt sich, wenn in den ersten Kanälen des Autokorrelators mehr als 10^7 Impulse registriert werden. Da die Messungen hauptsächlich mit Chromatin durchgeführt wurden, sei kurz auf die Meßzeiten bei diesem Material eingegangen:

Eine Extinktion von $E_{260} = 5$ (entsprechend $0,5 \text{ mg/ml}$) reichte bei Chromatin mit s -Werten größer als 100 S unter physiologischen Salzbedingungen aus, um in wenigen Minuten eine ausreichende Anzahl von Impulsen im Korrelator zu erreichen. Bei längerer Meßzeit ist es möglich, Chromatinproben mit einer Extinktion unter $E_{260} \approx 1$ (entsprechend $0,1 \text{ mg/ml}$) zu messen, wenn die Molmasse relativ (mehrere Millionen) groß ist.

Allgemein ist der Anteil der Rotationsdiffusion an der Gesamtstreu­kurve bei großen Winkeln relativ am größten, der der Translation dagegen läßt sich am besten bei kleinen Winkeln messen. Aus Gründen, die später eingehend diskutiert werden, wurde ausschließlich die Translation untersucht. Es zeigte sich, daß für Chromatin Meßwinkel zwischen 50 und 70 Grad am geeignetsten sind, da dort die Intensität hoch genug ist, um die Meßzeiten gering zu halten und die Intensität der Staubanteile abgesunken ist. Als Gütekriterium für die Übereinstimmung von theoretischer und gemessener Kurve wird vom Rechenprogramm die Quadratwurzel aus dem Quotienten der Summe der Differenzwerte zwischen Meß- und theoretischer Kurve und der Anzahl der Meßwerte gebildet. Dieser Wert wird mit Konsistenz bezeichnet. An Hand von Korrelationsfunktionen mit bekannten Diffusionskoeffizienten läßt sich eine Abschätzung des Fehlers der berechneten Werte durchführen. Hierzu wurden Korrelationsfunktionen von monodispersen Latexsuspensionen aufgenommen.

Ergebnisse*Chromatin-Korrelationsfunktionen*

In Abb. 2a sind eine Korrelationsfunktion von Chromatin, sowie die berechnete Streukurve nach dem „EFA“ mit zwei Komponenten dargestellt. Abb. 2b zeigt die Abweichungen zwischen den gemessenen und theoretisch berechneten Werten derselben Chromatinprobe; die Konsistenz dieser Auswertung beträgt $0,17\%$. Dieser Wert ist, verglichen mit Ergebnissen einer Latex-Korrelationsfunktion (Konsistenz $0,13\%$), charakteristisch für eine gute Anpassung theoretisch berechneter Kurven an die gemessenen Werte.

Die untersuchten Chromatinproben zeigten Sedimentationskoeffizienten zwischen 30 und 200 S . Für die Quartärstruktur wurden s -Werte zwischen 50 und 200 S gemessen (entsprechend Nukleosomenzahlen von 15 bis 135), für die Tertiärstruktur lagen die s -Werte zwischen 30 bis 50 S (entsprechend Nukleosomenzahlen von 6 bis 70). Die vorliegenden Chromatinmoleküle gleichen in der Quartärstruktur näherungsweise Zylindern mit einer Länge bis zu 250 nm bei einem Durchmesser von ca. 32 nm . In der Tertiärstruktur werden bei einem Durchmesser von 11 nm Längen bis zu 770 nm erreicht. Daher soll

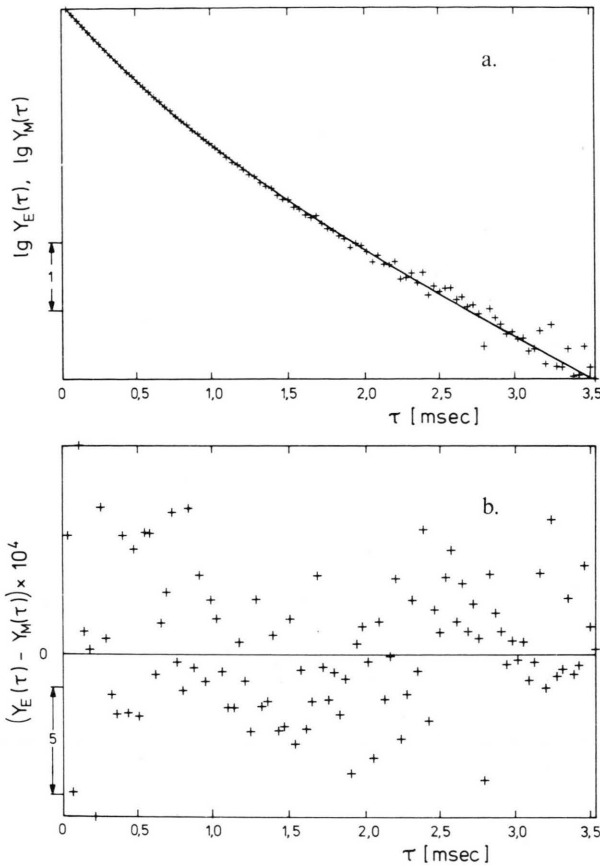


Abb. 2. a. Darstellung einer Chromatin-Korrelationsfunktion (++) und der durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechneten Ausgleichsfunktion unter Anwendung des „EFA“ mit zwei Komponenten (—). b. Graphische Darstellung der Abweichungen zwischen gemessenen und angepaßten Werten einer Chromatin-Korrelationsfunktion; Maßstab der Ordinate 1/1000 der von Abbildung 2a.

an dieser Stelle eingehend geprüft werden, ob bei derartigen Moleküllängen das Rotationsverhalten meßtechnisch erfaßbar ist, und wie die Intensitätsverhältnisse von Rotations- und Translationsdiffusion sich zueinander verhalten. Für starre Zylinder lassen sich die einzelnen Intensitätsanteile von Rotation und Translation der normierten Korrelationsfunktionen R wie folgt darstellen [13–15]:

$$R_{\text{ROT}}(K \cdot L) = 5 \cdot \left[(K \cdot L)^{-1} \cdot \left(-3j_1 \cdot \left(\frac{1}{2} K \cdot L \right) + \int_0^{K \cdot L/2} \frac{\sin z}{z} dz \right) \right]^2, \quad (4a)$$

$$R_{\text{T}}(K \cdot L) = \left(\frac{2}{K \cdot L} \cdot \int_0^{K \cdot L/2} \frac{\sin z}{z} dz \right)^2. \quad (4b)$$

Hierbei bedeutet L die Länge des Teilchens. Für j_1 sind die sphärischen Bessel-Funktionen erster Ordnung einzusetzen.

Es zeigte sich, daß bei den Modellvorstellungen, die hier insbesondere für die Tertiärstruktur zur Anwendung kommen, die berechneten Intensitätsanteile der Rotation in der Korrelationsfunktion gering bleiben. Für Chromatin in Quartärstruktur sind die Intensitätsanteile sogar noch geringer.

$$\Gamma_1 = D_T \cdot K^2 \quad \text{mit} \quad K = \frac{4\pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin(\theta/2), \quad (5a)$$

$$\Gamma_2 = D_{\text{ROT}} + D_T \cdot K^2. \quad (5b)$$

Aus Gleichung (5b) geht hervor, daß die gemessene Korrelationsfunktion im wesentlichen nur durch den Translationsanteil bestimmt wird, wenn die Auftragung $D \cdot K^2$ linear ist und durch den Nullpunkt verläuft. Dies ist in Abb. 3 dargestellt. Nach Lee *et al.* [16] zeigt schon die geringe optische Anisotropie der Chromatinpartikel, die sich in dem kleinen Dichroismus äußert, daß Fluktuationen der Streuintensität, die von der Rotation des Teilchens herrühren, vernachlässigbar klein sind. Der Rotationsdiffusionskoeffizient ist daher für die hier untersuchten Chromatinbruchstücke nicht bestimmbar.

Untersuchungen in Lösungsmitteln verschiedener Ionenstärken

Die Zusammenhänge zwischen Sedimentationskoeffizient und der Nukleosomenzahl sowie der Ionenstärke des Lösungsmittels wurden von Butler und Thomas [17, 18] diskutiert; die Autoren leiten

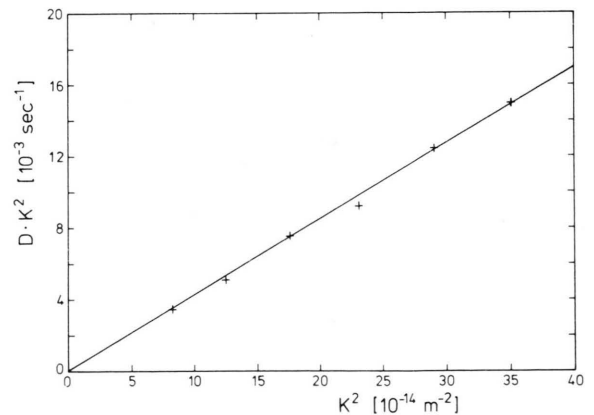


Abb. 3. Winkelabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten.

einen formalen Zusammenhang zwischen s -Wert und Nukleosomenzahl aus einer doppeltlogarithmischen Darstellung dieser Größen ab.

$$s = 10,8 \cdot n^a \quad (6)$$

Für hohe Ionenstärken ist bei Marion *et al.* [19] für a ein Wert von 0,60 angegeben, für geringe 0,49. Daraus ergibt sich über die Svedberg-Gleichung (1) für den Diffusionskoeffizienten:

$$D = 3,12 \cdot 10^{-7} \cdot n^b \quad (7)$$

In dieser Beziehung nimmt der Exponent b für geringe Salzkonzentrationen den Wert $-0,51$ und für hohe $-0,42$ an [19]. Um bei den eigenen Untersuchungen Zusammenhänge zwischen Molmasse

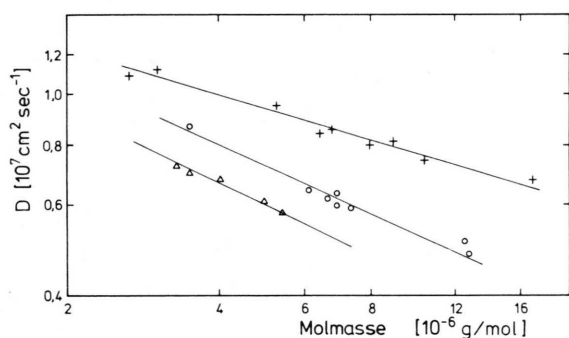


Abb. 4. Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Molmasse bei Chromatin in Lösungsmitteln verschiedener Ionenstärken: $+$ = 150 mM, $\circ$ = 15 mM, $\triangle$ = 5 mM. Die unterschiedlichen Molmassen des Chromatins entsprechen Fraktionen von gel-chromatographisch aufgetrenntem Chromatin.

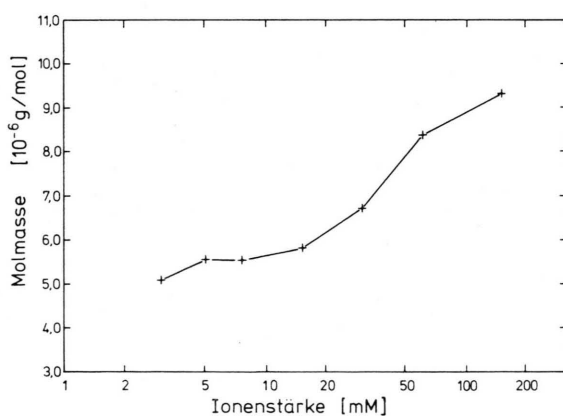


Abb. 5. Darstellung der Molmasse in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Lösungsmittels von Chromatin; die Meßpunkte sind Mittelwerte von jeweils mehreren einheitlichen Chromatinfraktionen.

und Diffusionskoeffizienten erfassen zu können, wurden mehrere Meßreihen durchgeführt, bei denen das Chromatin in verschiedenen Ionenstärken des Lösungsmittels untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Die Ionenstärken wurden so gewählt, daß sowohl eine sehr geringe (5 mM) als auch eine sehr hohe Salzkonzentration (150 mM) als Lösungsmittel für das Chromatin vorliegt.

Wie Tab. I zu entnehmen ist, stimmen die so gewonnenen Werte mit denen der Literatur sehr gut überein; für einige Ionenstärken fehlen vergleichbare Literaturwerte. Trägt man die Molmasse in Abhängigkeit von der Ionenstärke in ein Diagramm ein, ergibt sich ein Verlauf, der in Abb. 5 dargestellt ist. Ein Beispiel zur Verdeutlichung der recht guten Übereinstimmung der mit den Faktoren $1/w$ multiplizierten Gesamtintensitäten und den entsprechenden Molmassen in Abhängigkeit von der Ionenstärke ist in Tab. II wiedergegeben.

Die Abweichung der Molmasse in Abhängigkeit vom Winkel im Bereich von 30° – 130° beträgt nach Fulmer *et al.* [20] bei Chromatin mit einer Molmasse von 5×10^6 bis zu 20%. Die in der Tabelle aufgeführten Molmassen sind daher innerhalb dieses

Tab. I. Gegenüberstellung von Literaturwerten und eigenen Ergebnissen nach Berechnung der Steigungen der Ausgleichsgeraden in Abb. 4 gemäß Gl. (7).

Ionenstärke [mM]	Exponent b	
	Literaturwerte	eigene Werte
150	–	–0,30
65	–0,42 [19]	–
15	–	–0,49
5	–0,51 [19]	–0,52

Tab. II. Molmassen berechnet aus der Gesamtintensität entsprechend Gl. (3) (ohne Berücksichtigung von Winkel- und Konzentrationsabhängigkeit) verglichen mit Molmassen, die aus der Svedberg-Gleichung ermittelt wurden. $1/w$ = empirisch ermittelter Eichfaktor bei Meßwinkeln von 50° und 70° .

Ionenstärke [mM]	Molmasse [$10^{-6} \cdot \text{g/mol}$]		
	$I \cdot (1/w)_{70^\circ}$	$I \cdot (1/w)_{50^\circ}$	nach Svedberg
150	11,0	11,6	12,8
60	8,9	9,8	8,4
30	7,2	8,1	6,2
15	7,2	8,4	7,0
6	5,7	7,0	6,2
3	5,2	5,4	5,3

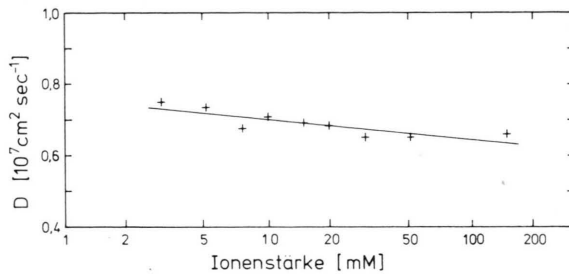


Abb. 6. Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Ionenstärke des Lösungsmittels bei Chromatin; die Meßpunkte sind Mittelwerte von jeweils mehreren einheitlichen Chromatinfractionen.

Fehlerbereiches zu betrachten. Die Werte für die Gesamtintensität, die in wenigen Sekunden Meßzeit erhalten werden können, haben sich als geeignetes Hilfsmittel für eine rasche Bestimmung der Größenordnung der Molmasse der Chromatinmoleküle bewährt, zumal es für ihre Ermittlung keines zusätzlichen apparativen Aufwandes bedarf. Die Werte für die Molmasse sind jedoch nur unter den oben gemachten Einschränkungen zu betrachten. Der Abb. 5 ist zu entnehmen, daß mit zunehmender Ionenstärke die sichtbare Molmasse ansteigt. Trägt man die Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Ionenstärke auf, so erkennt man, daß entgegen dem zu erwartenden Verhalten die Werte für den Diffusionskoeffizienten kleiner werden (Abb. 6).

Diskussion

Eine Erklärungsmöglichkeit dafür, daß die Diffusionskoeffizienten bei einem Übergang von einer ausgedehnten zu einer kompakten Struktur nicht ansteigen, wäre die Annahme, daß Chromatin mit gleicher räumlicher Ausdehnung, aber mit verschiedenen Molmassen, in den unterschiedlichen Strukturen vorläge. Unter diesen Umständen müßte allerdings eine Dichteänderung der Moleküle stattgefunden haben. Mit der Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung durchgeführte Messungen haben jedoch gezeigt, daß sich mit dem Übergang in eine andere Struktur der Querschnitt der Chromatinmoleküle ändert [8]. Somit ist eine Stauchung der Zylinder bei konstantem Durchmesser, und damit eine Fluktuation der Dichte, die in der Svedberg-Gleichung durch $\bar{v}$ – als Kehrwert der Dichte – charakterisiert ist, unwahrscheinlich und bei biologischem Material in solchem Ausmaß auch nicht zu

erwarten. Vielmehr verkürzt sich die Konturlänge des Chromatins, indem die Fibrille sich beim Übergang von der Tertiär- in die Quartärstruktur ohne faßbare Änderung des partiellen spezifischen Volumens helixförmig verdrillt. Daher bedeutet ein konstanter oder leicht geringer werdender Diffusionskoeffizient bei Zunahme der Ionenstärke, daß der hydrodynamische Radius beider Strukturen in etwa gleich sein muß. Damit ergibt sich aus den ansteigenden Sedimentationskoeffizienten und dem Sedimentationsverhalten über die Svedberg-Gleichung eindeutig eine Zunahme der Molmasse um etwa den Faktor Zwei. Andererseits zerfällt Chromatin, das bei hohen Ionenstärken präpariert wurde, bei geringeren Ionenstärken in Bruchstücke, die etwa um den Faktor Zwei kleiner sind als das Ausgangsmaterial. Messungen mit der Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung ergeben bei der Rekonstitution, d.i. die Wiederherstellung der Überstruktur durch höhere Ionenstärken, wieder Durchmesser von 30–32 nm entsprechend der „nativen“ Quartärstruktur des Chromatins. Somit liegt bei höheren Ionenstärken stets eine geordnete Struktur vor, die sich offenbar spontan und reversibel ausbilden kann (Abb. 7). Das Ansteigen der Gesamtintensität parallel zu den aus der Svedberg-Gleichung berechneten Molmassen führt zum gleichen Befund (Tab. II). Das kontinuierliche Ansteigen der Gesamtintensität läßt außerdem noch eine weitere Interpretationsform zu, die aus der Gleichung 8 abgeleitet werden kann. Dort ist nämlich der zweite Summand

$$1/M_{\text{app}} = 1/M_r + 2AC \quad (8)$$

ein Maß für die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Chromatinpartikeln. (M_{app} = scheinbare Molmasse, A = zweiter Virialkoeffizient, C = Konzentration). Somit kommt es mit ansteigender Ionenstärke zu immer stärkeren Wechselwirkungen zwischen den Partikeln, da die abstoßenden Kräfte – resultierend aus der Überschußladung im „DNA-backbone“ – neutralisiert werden, und somit anziehende Kräfte die Oberhand gewinnen. Weitergehende Untersuchungen, um die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Konzentration festzustellen, wurden begonnen. Erste Ergebnisse zeigen, daß der Diffusionskoeffizient mit abnehmender Chromatinkonzentration leicht zunimmt und somit M_{app} geringer wird. Weiterhin spricht die Tatsache, daß die Steigung der Ausgleichsgeraden in der

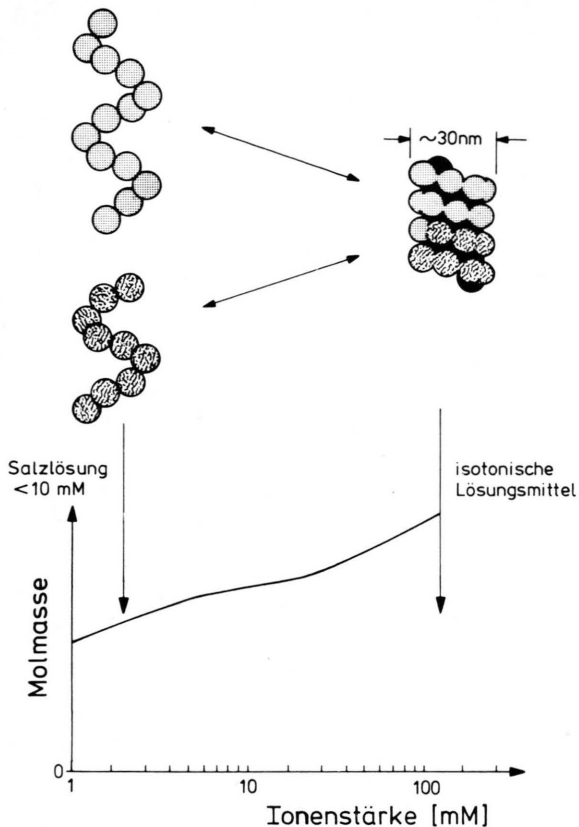


Abb. 7. Schematische Darstellung der Assoziation von Chromatinbruchstücken mit zunehmender Ionenstärke bzw. der Dissoziation bei abnehmender Ionenstärke.

Abb. 4 mit wachsender Ionenstärke abnimmt, nach Schmitz [21] ebenfalls für die Ausbildung einer Überstruktur. Die hydrodynamischen Radien wurden aus den experimentell ermittelten Diffusionskoeffizienten berechnet und theoretischen Werten gegenübergestellt. Die so gewonnenen Werte (nach Garcia de la Torre und Bloomfield [22]) stimmen sehr gut mit einer Helix mit den folgenden Parametern überein: Radius = 30 nm, Steigungshöhe (pitch) = 25,3 nm. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit Fulmer und Bloomfield [20] für Chromatin in Lösungsmitteln hoher Ionenstärke. Auch langgestreckte Ellipsoide mit entsprechender Länge und Volumen führen zu vergleichbaren Daten (Theorie von Perrin [23]).

Die Strukturen werden also kompakter, die Diffusionskoeffizienten bleiben jedoch unverändert,

wenn die Ionenstärke des Lösungsmittels ansteigt. Dies läßt sich nur damit erklären, daß Wechselwirkungen zwischen den Chromatinpartikeln die Beweglichkeit hemmen, oder daß es zu Aneinanderlagerungen kommt, entsprechend einer höheren Molmasse, und so der Diffusionskoeffizient erniedrigt wird. Über den aus beiden Vorgängen resultierenden Kompensationseffekt wird das Konstantbleiben bzw. das leichte Abnehmen des Diffusionskoeffizienten verständlich. Dieses Geschehen konnte sowohl bei Chromatin beobachtet werden, das, bei nahezu physiologischen Ionenstärken präpariert, in niedrige Ionenstärken überführt und dann wieder gegen Lösungsmittel mit höheren Ionenstärken dialysiert wurde, als auch für Chromatin, das in 0,2 mM EDTA gewonnen wurde. Butler und Thomas [17] haben bei ihren Untersuchungen über die Abhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten von der Ionenstärke die Molmasse nur indirekt über die DNA-Länge bestimmt; dabei lassen sich die von uns beobachteten Aneinanderlagerungen nicht erfassen, da bei der Isolierung der DNA in der Überstruktur enthaltene DNA-Brüche eine geringere Molmasse vortäuschen können. Andererseits beobachteten Fulmer und Bloomfield [20] konstante Molmassen des Chromatins und dementsprechend ansteigende Diffusionskoeffizienten mit zunehmender Ionenstärke. Für dieses unterschiedliche Verhalten von isoliertem Chromatin scheint die Wahl des verwendeten Puffers mit eine Rolle zu spielen. Fulmer *et al.* benutzen EDTA und reduzieren damit den Einfluß von Mg^{2+} , so daß abstoßende Kräfte wahrscheinlich der Tendenz zur Aggregation stärker entgegenwirken können. Renz *et al.* [24] und Strätling [25] bestätigen die Fähigkeit des Chromatins, in geordnete Strukturen zu aggregieren. Dabei wird eine Zusammenlagerung isolierter „Superbeads“ zu kettenartigen Strukturen angenommen. Entscheidendes Phänomen ist bei diesen Untersuchungen, wie auch wir es beobachten konnten, die Fähigkeit des Chromatins, eine geordnete Überstruktur auszubilden, ohne daß innerhalb dieser Gesamtstruktur eine durchgehende DNA vorliegen muß. Allerdings führt bei unseren Versuchen die Auflösung der Überstrukturen im allgemeinen nicht zu „Superbeads“ entsprechenden Strukturen.

Die hier im Zusammenhang mit anderen Meßtechniken angewandte Methode der quasielastischen Lichtstreuung hat sich, wie die dargestellten Ergebnisse und Anwendungen demonstrieren, bei der

Bestimmung der Diffusionskoeffizienten großer biologischer Makromoleküle sehr bewährt. Mit Hilfe dieser Methode konnten erstmals größere Meßreihen mit Proben empfindlichen biologischen Materials durchgeführt und damit Zusammenhänge erfaßt werden, wie sie bei Anwendung der „klassischen“ Verfahren zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten nicht möglich waren.

Danksagung

Für hilfreiche und kritische Diskussion danken wir Herrn Prof. Harbers und Herrn Prof. Schulz-DuBois; weiterhin haben wir Herrn Dr. R. Brust für Bereitstellung von isoliertem Chromatin sowie Frl. B. Konopka, Frau K. Kraft und Frau G. Wegener für technische Hilfe zu danken.

- [1] J. T. Finch u. A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1897–1901 (1976).
- [2] K. Ibel, *J. Mol. Biol.* **160**, 77–85 (1982).
- [3] M. Renz, *Nucl. Acids Res.* **6**, 2761–2767 (1979).
- [4] W. H. Strätling u. R. Klingholz, *Biochemistry* **20**, 1386–1392 (1981).
- [5] A. W. Fulmer, J. A. Benbasat u. V. A. Bloomfield, *Biopolymers* **20**, 1147–1159 (1981).
- [6] A. O. Pogo, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 550–557 (1966).
- [7] S. Muyldermans, I. Lasters u. L. Wyns, *Nucl. Acids Res.* **8**, 731–739 (1980).
- [8] R. Brust u. E. Harbers, *Eur. J. Biochem.* **117**, 609–615 (1981).
- [9] M. Noll, J. O. Thomas u. R. D. Kornberg, *Science* **187**, 1203–1206 (1975).
- [10] S. W. Provencher, *Makromol. Chem.* **180**, 201–209 (1979).
- [11] F. C. Chen, A. Yeh u. B. Chu, *J. Chem. Phys.* **66**, 1290–1304 (1977).
- [12] C. H. Pletcher, R. M. Resnick, G. J. Wei, V. A. Bloomfield u. G. L. Nelsestuen, *J. Biol. Chem.* **255**, 7433–7438 (1980).
- [13] R. Pecora, *J. Chem. Phys.* **40**, 1604–1614 (1964).
- [14] B. Chu, *Laser Light Scattering* Academic Press, New York, San Francisco und London 1974.
- [15] E. Loh, E. Ralston u. V. N. Schumaker, *Biopolymers* **18**, 2549–2567 (1979).
- [16] K. S. Lee, M. Mandelkern u. D. M. Crothers, *Biochemistry* **20**, 1438–1445 (1981).
- [17] P. J. G. Butler u. J. O. Thomas, *J. Mol. Biol.* **140**, 505–529 (1980).
- [18] J. O. Thomas u. P. J. G. Butler, *J. Mol. Biol.* **144**, 89–93 (1980).
- [19] C. Marion, P. Bezot, C. Hesse-Bezot, B. Roux u. J.-C. Bernengo, *Eur. J. Biochem.* **120**, 169–176 (1981).
- [20] A. W. Fulmer u. V. A. Bloomfield, *Biochemistry* **21**, 985–992 (1982).
- [21] K. S. Schmitz u. B. Ramanathan, *J. Theor. Biol.* **83**, 297–311 (1980).
- [22] J. Garcia de la Torre u. V. A. Bloomfield, *Biopolymers* **16**, 1747–1763 (1977).
- [23] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **7**, (1936).
- [24] M. Renz, P. Nehls u. J. Hozier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1879–1883 (1977).
- [25] W. H. Strätling, *Biochemistry* **18**, 596–603 (1979).