领域前沿・中国



朱平、中国科学院生物物理研究所、生物大分子国家重点实验室研究员。 1990年本科毕业于浙江大学、1993年于西安交通大学获硕士学位、1997年 于清华大学获博士学位、后留校任教。1999年赴美国佛罗里达州立大学 生物系从事博士后研究、历任博士后研究助理、助理研究员、副研究员。 2008年起回国、进入中国科学院生物物理研究所工作、任研究组长、"百人 计划"研究员、博士生导师。2014年获国家"杰出青年科学基金"资助,同 年入选国家"万人计划-中青年科技创新领军人才"。朱平研究员以冷冻电 镜(Cryo-EM)技术为主要手段进行病毒、染色质等生物大分子及其复合物 的结构和功能研究。研究工作主要集中于以下两个方向:(1)病毒的组装、 感染与复制机制;(2)染色质的高级结构与表观遗传调控的分子机制。朱平 研究组和李国红研究组合作,利用冷冻电镜单颗粒分析技术解析了30 nm 染色质的高分辨率结构(Science 2014), 揭示了30 nm染色质纤维的左手双 螺旋高级结构模型、在染色质的高级结构组装及调控机制研究上取得了 较为重要的进展。近年来,朱平研究员在包括Nature、Science、Proc Natl Acad Sci USA、elife、PLoS Pathog等知名期刊上发表论文30余篇,其中, 以通讯作者或共同通讯作者在Science、Proc Natl Acad Sci USA、elife、J Virol、Virology等期刊上发表论文10余篇,在本领域内产生了较大影响。

冷冻电镜技术的发展推动染色质高级结构的研究

朱 平*

(中国科学院生物物理研究所,生物大分子国家重点实验室,北京100101)

摘要 染色质的结构及动态变化在基因转录及表观遗传调控中起了关键作用,但对于30 nm染 色质纤维(通常认为是基因组DNA的二级结构)的高级结构组成以及细胞体内是否存在30 nm染色质 的组织形式一直存在较大争议。近年来,冷冻电镜三维重构技术发展迅速,为研究30 nm染色质纤维 高级结构提供了一个良好的工具,并起了较大的推动作用。该文介绍了本领域相关的一些研究进展。 关键词 染色质高级结构;冷冻电镜;表观遗传调控

The Development of Cryo-EM Technology Accelerates the Higher-order Structural Study of Chromatin Fiber

Zhu Ping*

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The dynamics of chromatin fiber play a critical role in gene expression and epigenetic regulation.

*通讯作者。Tel: 010-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

网络出版时间: 2015-11-06 18:24:12 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151106.1824.010.html

Nevertheless, the higher order structure of 30 nm chromatin fiber, typically regarded as the secondary structure of DNA, and its existence in nucleus have been remained controversial for decades. Recently, tremendous advances have been made in the cryo-electron microscopy (cryo-EM) 3-D reconstruction technology, which provides an indispensible tool for the higher order structural study of 30 nm chromatin fiber and accelerates this process. Here we reviewed some progresses made in this field.

Keywords higher order structure of chromatin fiber; cryo-electron microscopy; epigenetic regulation

DNA是遗传信息的载体, DNA双螺旋结构模 型印的建立确立了生命体遗传信息传递的分子机 制,并开创了现代分子生物学的时代。但是,任何 有关DNA的生命活动(包括基因转录及DNA复制、 修复、重组等)都是在由DNA与其所缠绕的组蛋白 组装形成的核小体及染色质这个结构平台上进行 的。人类基因组计划完成后的一个重要生物学问 题是:人体内200多种具有相同基因组,但形态和功 能各异的细胞的命运是如何决定和分化的? 这其 中,由染色体的基本单元——核小体经多次折叠后 形成的染色质起了重要的作用。在高等生物个体 的发育和分化过程中,生命体通过各种表观遗传机 制调控染色质高级结构(特别是30 nm染色质纤维) 的动态变化,进而调控基因的开放、关闭和转录水 平,从而决定细胞的组织特异性和细胞命运。因此, 染色质的高级结构、动态变化及其调控机制对于 理解生命过程的本质具有重要的意义,也是现代分 子生物学的基本问题之一。

染色质的结构、动态变化以及它们如何受各 种因子的调控一直是表观遗传学研究者极为关注 的内容,但目前应用最为广泛的结构生物学研究 方法——X射线晶体学, 在解析这种典型的超大分 子复合体结构方面却遇到了很大的瓶颈和挑战。 近年来, 冷冻电镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)技术在结构生物学领域引起了研究者的极大 关注。由于使用电子束聚焦,电子显微镜拥有远高 于光学显微镜的分辨能力;同时,电镜三维重构技 术不需要样品结晶,对样品数量及纯度要求也相 对较低,因此其结构解析的样品门槛要远低于X射 线晶体学技术。虽然目前处理生物学样品时还存 在低信噪比等劣势,但是随着直接电子探测器的 应用以及更好的图象处理方法和重构算法的开发, 冷冻电镜已经进入原子分辨率时代[2],为研究表观 遗传相关的染色质结构及调控提供了一个极好的 工具。

1 冷冻电镜三维重构技术的发展

冷冻电镜三维重构技术和X射线晶体学技术、 核磁波谱共振技术一起被称为结构生物学三大主要 研究手段。利用冷冻电镜技术进行三维结构解析的 主要方法有:单颗粒分析方法、电子断层成像方法 和电子晶体学方法。虽然电镜三维重构的方法和 技术体系在三十多年前即已基本建立,但长期以来 冷冻电镜三维重构分辨率都只局限在纳米级范围或 更低,虽然可以看到病毒、核糖体等生物大分子机 器的总体构象,但是看不清分子之间组装和相互作 用的细节。因此,电镜三维重构技术也常常被称为 "Blob-ology"。

但是,这种情况正在改变。近年来,随着电子显 微镜设备硬件的提升及软件的发展,特别是直接电 子探测器在低温透射电镜上的应用,冷冻电镜三维 重构技术在生物大分子及其复合物的结构解析中发 展迅速,正在向近原子分辨率取得重要突破,也引起 了研究者的极大关注^[2]。其中,一个标志性的工作是 利用冷冻电镜单颗粒方法解析了在疼痛和热知觉感 知中起重要作用的离子通道膜蛋白TRPV1(transient receptor potential cation channel subfamily V member 1)的3.4 Å分辨率结构^[3];对于其他一些超大分子复 合体,如核糖体等的冷冻电镜三维重构分辨率也在 迅速提高,局部分辨率达到了3.2 Å^[4]。在这种分辨 率下,研究者可以完全依赖于重构的电镜三维密度 图独立构建这些生物大分子复合体的空间结构原子 模型。

以这些标志性工作为代表的高分辨率冷冻电 镜三维重构研究绕过了目前在结构生物学领域占主 导地位的X射线晶体学中蛋白结晶这个瓶颈,开启了 直接利用冷冻电镜技术解析膜蛋白、超大分子复合 体等精细结构的大门。在此基础上,很多研究者期 盼已久,但却难以利用传统的X射线晶体学方法获得 的重要生物大分子及复合物的结构得以解析,从较 小分子量(170 kDa)的阿尔茨海默症相关膜蛋白γ分 泌酶复合物(γ-secretase)^[5-6],到由23个亚基组成的动力肌动蛋白(dynactin)复合体^[7]以及37个亚基组成的酵母剪切体(spliceosome)等超大分子复合体^[8]等。

目前,冷冻电镜单颗粒三维重构分辨率的最高 重构精度达到了2.2 Å^[9],从分辨率上已经具备了和X 射线晶体学竞争的能力。同时,由于冷冻电镜三维重 构技术不需要结晶,所用的样品量相对较少,为研究 在生命过程中起重要作用但又难以获得晶体的染色 质等超大分子复合物的结构提供了一种极好的工具。

2 DNA基因组的逐级折叠

DNA分子呈双螺旋结构^[1]。有意思的是,人体 内一个细胞的DNA长度加起来约有2m,这么长的基 因组DNA分子是如何组装、紧密压缩到10~20 μm的 细胞核空间内去的呢? 一般认为, 这个过程是通过 基因组DNA的逐级折叠方式分四步完成的。这些折 叠过程分别对应着基因组的四级结构: 第一级结构 是核小体,它是DNA双螺旋"绳子"缠绕在组蛋白上 而形成的; 第二级结构是核小体进一步折叠形成直 径在30 nm左右的纤维,即30 nm染色质纤维;第三级 结构是由30 nm染色质纤维再进一步折叠成为直径 为0.4 μm的筒状体,也称为超螺旋体;第四级结构就 是可以在光学显微镜下看到的染色体, 它是由超螺 旋体进一步折叠盘绕成的。通过以上四步, DNA的 长度被凝缩了8400倍左右。这种逐级折叠的方式 对于遗传信息的表达及调控非常关键。DNA是遗传 信息的载体,然而某一种基因是否表达或者在哪些 细胞中表达,染色质的空间结构及动态变化则起到 了非常重要的作用。

3 核小体与染色质

核小体是染色质结构的基本单元,由147 bp DNA缠绕组蛋白八聚体(由4种组蛋白H2A、H2B、 H3和H4各2个分子组成的扁球状八聚体)1.75圈组 成,其高精度精细结构于1997年被Richmond研究组 解析^[10]。

虽然染色质的概念早在1879年就被提出,但是 直到一百年后的1974年,研究者才利用生物化学和电 镜成像技术发现染色质的一级结构,即由DNA串联 的11 nm核小体串珠结构^[11]。在此基础上,染色质一 级结构在连接组蛋白的帮助下折叠形成直径约30 nm 的染色质二级结构,即"30 nm染色质纤维"^[12-13]。染 色质二级结构再进一步折叠形成更为复杂的染色质高级结构,从而实现将长达2m的基因序列有规律的归集在微米级的细胞核中。在这些折叠形式中,染色质的一级及二级结构,即核小体和30nm染色质纤维的动态变化在基因的转录及表观遗传调控中起了关键作用。

在过去的三十多年里,人们一直试图获得由核 小体在连接组蛋白帮助下折叠形成的染色质二级结 构的高分辨率信息。但是,由于缺乏合适的手段和 体系,30 nm染色质纤维的精细结构一直没有被解 析。利用电子显微镜、X射线及中子散射法、沉降 分析法和X射线晶体学等研究手段,研究者提出了 一系列关于30 nm染色质纤维结构的模型,其中有两 种最具代表性^[14-15]:单螺旋的solenoid模型和双螺旋 的Zig-Zag模型,目前教科书上普遍采用的30 nm染 色质纤维模型是核小体串珠结构在连接组蛋白的帮 助下经螺旋化形成每一周包含6个核小体的螺旋管 线状体。但是,由于30 nm染色质纤维的精细结构一 直没有被解析,30 nm染色质的高级结构仍存在重大 争议,没有形成共识。

长期以来,对多个核小体以何种方式装配形成 30 nm染色质高级结构以及该结构受什么因素调控 一直是研究者十分关注,对生命信息的传承和调控 至关重要的信息。这个问题一直困扰了研究者30余 年,其困难性主要来源于两个方面:第一,细胞核内 的染色质结构高度变化, 受多种因素的影响, 难以获 得适合高分辨率结构研究、具有高度均一性的染色 质样品; 第二, 30 nm染色质是一个典型的超大分子 复合体,对这种超大分子复合体的高分辨率研究缺 乏一个系统性的、合适的研究手段和体系,具有很 大的技术难度和挑战性。对于第一个方面的困难, 研究者通过多年的努力,发现利用体外表达一种具 有特殊性质的601 DNA^[16]和组蛋白八聚体,可以获 得适合高分辨率研究的核小体和染色质; 对于第二 方面的困难,近年来在结构生物学领域蓬勃发展,在 近原子分辨率三维结构重构等多方面取得重要突破 的冷冻电镜三维重构方法^[2]为研究30 nm染色质的 高级结构提供了一个最为合适的工具。

4 体外重组30 nm染色质结构研究

由于DNA序列、组蛋白成分、组蛋白翻译后 修饰的不同以及核小体之间相对取向的不规则性, 使得天然染色质具有高度的异质性和可变性,从而 导致利用三维电镜等结构生物学手段无法获得高 分辨率的二级结构模型。为了获得尽量均一的研 究材料,人们建立了一套体外重构组装的体系,即 将体外表达的组蛋白八聚体与一种人工设计的601 DNA(含有wisdom 601 nucleosome positioning序列, 对组蛋白八聚体有很强的亲和力)¹⁶¹按一定比例混 合,经过透析形成串珠状结构,之后加入二价阳离子 (一般是Mg²⁺)或连接组蛋白H1/H5,形成染色质纤维 二级结构。同时,在组装过程中,可以通过改变不同 的组蛋白修饰、组蛋白变体、不同的连接DNA长度 等多种条件获得不同状态的纤维结构,对各种影响 染色质结构及动态变化的表观遗传调控因素在体外 进行相关研究,探究表观遗传调控过程中染色质的 动态变化机制。

通过体外组装和电镜观察,研究者提出了30 nm 染色质的不同模型。Richmond团队^[17]在电镜下观察 发现,体外组装的48×177 bp DNA染色质纤维宽度 大多数都在25~30 nm之间,呈现等长的双排平行结

构,看上去与two-start模型相符。之后,他们在染色 质样品的组装过程中按照核小体与连接组蛋白1:1 的比例加入H1,结果在电镜下也看到平行的双排核 小体。由此他们认为,连接组蛋白的结合不会影响 染色质纤维二级结构是one-start还是two-start。与此 对照, Rhodes团队^[18]为了研究连接DNA长度对纤维 的影响,在体外构建了一系列不同DNA长度的染色 质纤维,并在染色质折叠过程中加入连接组蛋白H5 和1.6 mmol/L的MgCl₂,利用电子显微镜观察并测量 纤维直径后发现,染色质纤维的直径没有随着连接 DNA长度的增加而呈线性增长,与two-start模型相 悖。他们提出了一种左手one-start交叉螺线管模型, 并推测连接组蛋白会通过改变连接DNA的轨迹从 而决定相邻核小体之间的相对位置以及相互作用模 式,最终决定核小体串珠结构折叠成染色质时形成 的形状。

冷冻电镜三维重构技术的迅速发展为研究 30 nm染色质的精细高级结构及其调控机制带来了 契机。中国科学院生物物理研究所几个具有不同研



A: 体外组装由12个核小体形成的30 nm染色质纤维冷冻电镜图像; B: 12个核小体的冷冻电镜三维重构结果及示意图, 其中4个核小体为一个基本结构单元, 以不同颜色表示; C: 24个核小体的冷冻电镜三维重构结果, 左手双螺旋结构特征明显; D: 30 nm染色质纤维的左手双螺旋高级结构模型。

A: cryo-EM micrograph of 30 nm chromatin fiber reconstituted *in vitro* with 12 nucleosomes; B: cryo-EM reconstruction and diagram of the reconstituted 30 nm chromatin with 12 nucleosomes, which is composed of 3 tetra-nucleosome units shown in different colors; C: cryo-EM reconstruction of chromatin fiber with 24 nucleosomes with obvious shape of left-handed double helix; D: the higher-order left-handed double helical structure model of 30 nm chromatin fiber.

图1 30 nm染色质冷冻电镜三维重构及左手双螺旋高级结构模型(根据参考文献[15,19]修改)

Fig.1 The 3-D cryo-EM reconstruction and left-handed double helical model of 30 nm chromatin

fiber (modified from references [15,19])

究特长的研究组发挥各自优势,对30 nm染色质高级 结构这一问题进行了长期的合作研究并于近期获得 了较为重要的进展(图1)^[19]。李国红研究组依据多年 来在30 nm染色质和表观遗传学研究方面的积累,建 立了一套染色质体外重建和结构分析平台,获得了 适合高分辨率研究的高度均一的30 nm染色质样品; 朱平研究组依靠在冷冻电镜高分辨率结构解析方面 的长期积累,利用冷冻电镜单颗粒三维重构方法(图 1A)获得了由12个和24个核小体组成的30 nm染色质 纤维的高分辨率三维重构结果(图1B和图1C)。我们 解析的结构显示, 30 nm染色质纤维以四个核小体为 基本结构单元(图1B); 结构单元的形成和单元之间 的扭转由不同方式的作用力介导;结构单元之间通 过相互扭曲折叠形成一个左手双螺旋高级结构(图 1C和图1D); 四聚核小体结构单元之间的空隙可能 是组蛋白修饰、染色质重塑等重要表观遗传现象发 生的调控控制区域。同时,我们的研究还发现,连接 组蛋白H1在单个核小体内部及核小体单元之间的 不对称分布及相互作用促成30 nm高级结构的形成, 首次明确了连接组蛋白H1在30 nm染色质纤维形成 过程中的重要作用。

5 体内的30 nm染色质结构研究

30 nm染色质纤维在体内结构如何,甚至体内是 否存在30 nm染色质一直是一个有争论的问题^[20-21]。 近年来,随着电镜技术的应用,尤其冷冻电子断层成 像三维重构技术的应用,对于体内30 nm染色质纤维 的结构模型研究也有了一些更深入的研究进展。

体内的30 nm染色质纤维研究可以大致分为以 下两类: (1)从细胞核提取的染色质纤维研究; (2)细 胞核内染色质的原位观察。

早期,人们借助电子显微镜从各种不同的生物体细胞(如海参细胞、鸡血红细胞、美洲蝾螈血红细胞、鼠肝细胞等)中提取出染色质纤维进行观察研究。1976年,Finch等^[12]从鼠肝细胞核中提取出天然11 nm核小体串珠状结构,并向其中加入连接组蛋白H1或Mg²⁺,在电镜下观察到了30 nm染色质纤维结构,这也是最早观察到的30 nm染色质纤维。根据电镜结果,他们提出了one-start的螺线管模型。Woodcock等^[22]从鸡血红细胞中提取出染色质纤维,分别在不同的盐浓度下透析,利用透射电镜和扫描电镜进行观察分析,发现染色质随着盐离子浓度的

提高,凝聚程度变大,结构也变得更加紧密。通过对 电镜数据进行整理分析,他们认为,染色质纤维符合 two-start的螺旋桨(helical-ribbon)模型。之后,他们进 一步提出染色质纤维是不规则的3D zig-zag模型^[23]。 Langmore等^[24]用海参精子细胞和蝾螈红细胞作为实 验材料提取染色质,在冷冻状态下观察,提出染色质 呈现two-start的交叉连接(crossed-linker)模型, 双螺 旋纤维组成的核小体呈现"face to face"的排列方式, 两列核小体相互平行且平行于染色质纤维螺旋轴。 他们还发现,随着离子浓度的升高,zig-zag结构会变 得更加紧密,这与Woodcock等的结论相同。最近, Frangakis团队^[25]利用冷冻电子断层成像技术,对从 鸡血红细胞中提取的染色质纤维进行冷冻观察,发 现在紧实的染色质纤维中, 核小体主要是以"face to face"的方式堆叠排布,他们推测核小体的堆积叠加 是体内染色质高级结构形成的重要机制。

而对于细胞体内染色质的原位研究, 一般是利 用超薄切片方法制备样品并进行细胞不同周期染色 质的形态结构观察。早期,研究者利用电子显微镜 观察不同时期的鸡血红细胞切片,实现了对细胞内 完整染色质的初步观察^[26-27]。Langmore等^[24]利用电 镜观察鸡血红细胞核普通包埋切片,发现存在"sideby-side"排列的直径在20~30 nm之间的纤维,确认了 鸡血红细胞中30 nm染色质纤维的存在。Woodcock 团队[28-29]对海星精子细胞、鸡血红细胞核、海蝙蝠 精子细胞、海参精子细胞等多个生物物种细胞内的 染色质进行电镜观察发现,含有不同长度连接DNA 的染色质均能看到明显的规律性存在的染色质高级 结构。他们还利用电子断层成像技术对海星精子头 部细胞进行了详细地分析,发现其体内的染色质呈 现不对称的zig-zag排列, 三维构象呈现无序的弯曲 和扭转^[29]。最近, Frangakis团队^[21]对鸡血红细胞核 冷冻切片进行分析并利用冷冻电子断层成像三维重 构后,发现鸡血红细胞体内染色质呈现一种two-start 左手螺旋的构象,沿着螺旋轴方向每11 nm的距离约 6.5个核小体,核小体呈"face to face"并列排布,和我 们解析的[19]在体外组装的染色质纤维结构类似。

但是, 在以上这些精子细胞及鸡血红细胞等以 外的其他细胞中, 30 nm染色质却并没有被广泛观察 到。Dubochet团队^[20,30]对中国仓鼠卵巢细胞和Hela 细胞冷冻切片进行观察, 发现细胞核内染色质呈现 出均一, 有颗粒状的纹理, 但是并没有观察到高级的 规律性结构。他们发现,在有丝分裂染色体中,染 色质纤维处在高度无序,相间错杂的状态,并且随 着溶液中镁离子的减少,染色质会发生膨胀,从而 抑制30 nm染色质纤维紧密结构的形成^[20]。由此,他 们认为,有丝分裂染色体中没有发现30 nm染色质纤 维存在。之后, Maeshima等^[31]也提出在有丝分裂期 染色体中可能并不存在30 nm染色质结构,并提出一 种熔融模型(melting model)的假说,即体内的染色体 是处于一种高度无序、相间交错的状态,类似于多 聚体熔融的动态移动。

6 染色质结构与表观遗传调控

编码某一种蛋白的遗传信息,是由DNA中碱基 排列序列所决定的。然而,某一种基因是否表达或 者在那些细胞中表达,表观遗传(epigenetics)因素主 导的染色质空间结构变化则起到了非常重要的作 用。

表观遗传调控机制是生命现象中的一种普遍 存在的调控方式,涉及生命现象的方方面面。表观 遗传及其调控机制的研究主要集中在染色质DNA 甲基化和组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化等修饰以 及核小体和染色质重塑等方面。表观遗传信息建立 后,通常认为是通过影响染色质高级结构或者在效 应蛋白的帮助下影响染色质高级结构的动态变化, 来实现对基因表达的调控。由于染色质本身的高级 结构并未得以解析,表观遗传信息究竟怎样影响染 色质的高级结构,长期以来却知之甚少,以至于在众 多文献中研究者们常常把不能解释的一些事件归咎 为"该因子以某种方式改变了染色质的高级结构", 因而染色质的高级结构变化也就成了科学界的一个 "黑箱"。我们解析的在体外组装的30 nm染色质纤 维的左手双螺旋高级结构模型[19],为继续研究表观 遗传信息对30 nm染色质结构的影响提供了较好的 基础,使得研究者有望回答染色质修饰(包括DNA甲 基化和组蛋白修饰)、染色质变体组成等一系列表 观遗传信息对30 nm染色质纤维的结构影响,明确其 结构动态变化在基因转录调控中的作用机理。

细胞核中染色质的整体组织形式除了受到细胞周期调控以外,其局部结构也是高度动态变化的,会受到各种表观遗传因素(如组蛋白变体、DNA和组蛋白化学修饰等)的调控,需要进行进一步的深入研究。尽管如此,我们在体外、低盐条件、依

赖于连接组蛋白H1组装形成的30 nm染色质左手 双螺旋高级结构主要是由于DNA和组蛋白的内 在物理和化学性质决定的,其基本原则对体内染 色质也可能适用。随着冷冻电镜及电子断层成像 (electron tomography, ET)三维重构、冷冻电镜-高 分辨率光学显微镜关联成像(correlative light electron microscopy, CLEM)等技术的快速发展和应用,可以 预计细胞体内的染色质高级结构研究也将有一个大 的发展,对于细胞核内的染色质结构及调控机制会 有更明确的结论。

参考文献 (References)

- Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Nature 1953; 171(4356): 737-8.
- 2 Zhu HT, Zhu P. No longer 'blob-ology': Cryo-EM is getting into molecular details. Sci China Life Sci 2015; doi: 10.1007/s11427-015-4942-0.
- 3 Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature 2013; 504(7478): 107-12.
- 4 Amunts A, Brown A, Bai X, Llácer JL, Hussain T, Emsley P, et al. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. Science 2014; 343(6178): 1485-9.
- 5 Lu P, Bai X, Ma D, Xie T, Yan C, Sun L, *et al.* Three-dimensional structure of human γ-secretase. Nature 2014; 512(7513): 166-70.
- 6 Bai X, Yan C, Yang G, Lu P, Ma D, Sun L, *et al*. An atomic structure of human γ-secretase. Nature 2015; 525(7568): 212-7.
- Urnavicius L, Zhang K, Diamant AG, Motz C, Schlager MA, Yu M, *et al.* The structure of the dynactin complex and its interaction with dynein. Science 2015; 347(6229): 1441-6.
- 8 Yan C, Hang J, Wan R, Huang M, Wong CC, Shi Y. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. Science 2015; 349(6253): 1182-91.
- 9 Bartesaghi A, Merk A, Banerjee S, Matthies D, Wu X, Milne JL, et al. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. Science 2015; 348(6239): 1147-51.
- 10 Luger K, M\u00e4der AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 \u00e5 resolution. Nature 1997; 389(6648): 251-60.
- 11 Kornberg RD. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Science 1974; 184(4139): 868-71.
- 12 Finch J T, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73(6): 1897-901.
- Travers A. The 30-nm Fiber Redux. Science 2014; 344(6182): 370-2.
- 14 Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. Curr Opin in Gene Dev 2011; 21(2):175-86.
- 15 Li G, Zhu P. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. FEBS Lett 2015; doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.023.
- 16 Lowary PT, Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. J Mol Biol 1998; 276(1): 19-42.

- 17 Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. Science 2004; 306(5701): 1571-3.
- 18 Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(17): 6506-11.
- 19 Song F, Chen P, Sun D, Wang M, Dong L, Liang D, et al. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. Science 2014; 344(6182): 376-80.
- 20 Eltsov M, MacLellan KM, Maeshima K, Frangakis AS, Dubochet J. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ*. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(50): 19732-7.
- 21 Scheffer MP, Eltsov M, Frangakis AS. Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(41): 16992-7.
- 22 Woodcock CL, Frado LL, Rattner J B. The higher-order structure of chromatin: Evidence for a helical ribbon arrangement. J Cell Biol 1984; 99(1 Pt 1): 42-52.
- 23 Horowitz R A, Koster A J, Walz J, Wookcock CL. Automated electron microscope tomography of frozen-hydrated chromatin: the irregular three-dimensional zigzag architecture persists in compact, isolated fibers. J Struct Biol 1997; 120(3): 353-62.
- 24 Langmore JP, Paulson JR. Low angle x-ray diffraction studies of

chromatin structure *in vivo* and in isolated nuclei and metaphase chromosomes. J Cell Biol 1983; 96(4): 1120-31.

- 25 Scheffer MP, Eltsov M, Bednar J, Frangakis AS. Nucleosomes stacked with aligned dyad axes are found in native compact chromatin *in vitro*. J Struct Biol 2012; 178(2): 207-14.
- 26 Everid AC, Small JV, Davies HG. Electron-microscope observations on the structure of condensed chromatin: Evidence for orderly arrays of unit threads on the surface of chicken erythrocyte nuclei. J Cell Sci 1970; 7(1): 35-48.
- 27 Davies HG, Murray AB, Walmsley ME. Electron-microscope observations on the organization of the nucleus in chicken erythrocytes and a superunit thread hypothesis for chromosome structure. J Cell Sci 1974; 16(2): 261-99.
- 28 Woodcock CL. Chromatin fibers observed *in situ* in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. J Cell Biol 1994; 125(1): 11-9.
- 29 Horowitz RA, Agard DA, Sedat JW, Woodcock CL. The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: Electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. J Cell Biol 1994; 125(1): 1-10.
- 30 Mcdowall AW, Smith JM, Dubochet J. Cryo-electron microscopy of vitrified chromosomes *in situ*. EMBO J 1986; 5(6): 1395-402.
- 31 Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. Chromatin structure: Does the 30-nm fibre exist *in vivo*? Curr Opin Cell Biol 2010; 22(3): 291-7.