

Die Struktur des Chromatins und Regulation der Genaktivität

von
Christian Krüger⁺

INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGIE UND BIOCHEMIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

Die Entwicklung und Differenzierung zum erwachsenen Organismus aus der befruchteten Eizelle hat die Phantasie der Biologen seit vielen Generationen beschäftigt. Jedoch konnte erst in den letzten 30 Jahren herausgefunden werden, daß die Gene, die die Erbinformation von einer Generation auf die andere übertragen und die Funktion jeder lebenden Zelle bestimmen, aus Desoxyribonukleinsäure (DNS) bestehen, und daß die Zusammensetzung der DNS in jeder Zelle gleich ist.

Die genetische Information einer Zelle ist kodiert in der Sequenz der Nukleotide. Wird eine genetische Information abgerufen, so transkribiert die Zelle zunächst die entsprechenden Nukleotidsequenzen in ein komplementäres RNS-Molekül. Dieses Messenger-RNS-Molekül enthält die Information für den Aufbau eines Proteins und wird am Ribosom in ein Protein translatiert.

In den Zellen höherer Organismen sind die Gene auf den Chromosomen aneinandergereiht, und die Chromosomen bestehen aus Nukleinsäure und chromosomalen Proteinen. Die Regulation der Genaktivität wird den chromosomalen Proteinen zugeordnet. Die Zahl der Gene von Eukaryonten ist von Muller (9) zwischen 5.000 und 50.000 geschätzt worden. Bei einem Molekulargewicht der DNS von beispielsweise 2×10^{12} Dalton (Rind) kann nur ein kleiner Teil des Gesamtgenoms aus proteinkodierenden Sequenzen bestehen. Ein großer Teil der DNS hat regulatorische Funktion.

⁺ Lehrbeauftragter an der Pädagogischen Hochschule Berlin
vom SS 1972 bis WS 1974/75.

Während der Entwicklung höherer Organismen wird eine große Zahl verschiedener Zelltypen mit unterschiedlichen chemisch-physikalischen Eigenschaften gebildet. Die Probleme der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Zellen des malignen Wachstums, der genetisch bedingten Stoffwechselkrankheiten, des Wirkungsmechanismus mancher Hormone werden auf molekularbiologischer Ebene transformiert auf die Fragestellung: In welcher zeitlich-räumlichen Reihenfolge geschieht die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Gesamtgenoms von höherentwickelten Organismen?

Während der embryonalen Entwicklung einer befruchteten, sich teilenden Eizelle, die ja bekanntlich alle Gene von dem gesamten Organismus enthält, entsteht eine Vielzahl verschiedenartiger Zellen mit spezialisierten Funktionen. Im Laufe dieser Entwicklung werden tausende von Genen an- und abgeschaltet. Die spezialisierten Zelltypen in den verschiedenen Geweben enthalten immer noch alle Gene des entsprechenden Organismus, jedoch sind nur die Gene in einem Gewebe angeschaltet, die den spezifischen Funktionen und damit den spezifischen Syntheseleistungen des differenzierten Zelltyps entsprechen. In der Augenlinsenzelle ist z.B. das Gen angeschaltet, das die Aminosäuresequenz für das Augenlinsenprotein kodiert, in der laktierenden Brustdrüse sind die Laktalbumin- und Casein-Gene angeschaltet, in der Muskelzelle ist es das Myoglobing-Gen, und in der Hautfibroblastenzelle ist es das Kollagen-Gen.

Die Zellen von höheren Pflanzen und Tieren enthalten eine außerordentlich große Menge an DNS. Der Kern einer menschlichen Zelle enthält $6 - 7 \times 10^{-12}$ g, und die Länge solcher DNS liegt in der Größenordnung von mehreren Metern. Im Zellkern ist der Nukleoproteinfaden in einem Knäuel mit einem Durchmesser von $2 - 10 \mu$ verpackt. Welche räumliche Struktur hat die DNS im Chromosom, und wodurch wird die DNS so stark eingeknäult?

Unter physiologischen Bedingungen ist die DNS immer mit einer Vielzahl von chromosomalen Proteinen assoziiert, die eine mehr als tausendfache Verkürzung des DNS-Moleküls im Chromosom hervorrufen.

Aber welche chromosomalen Proteine sind es?

Die biochemische Aufarbeitung des gesamten Chromosomenmaterials nennt man Chromatin, das aus DNS, wenig RNS und den chromosomalen Proteinen besteht. Historisch sind die chromosomalen Proteine in zwei Gruppen unterteilt worden: die 5 stark basischen Histone und die Nichthiston-Proteine. Ob die Histone eine strukturerhaltende Funktion im Chromatin haben, wurde in den letzten Jahren mit enzymatischen Methoden untersucht.

DNAsen sind Enzyme, die den DNS-Strang überall dort abbauen, wo er nicht durch Proteine geschützt ist. Lässt man Chromatin durch DNase abbauen, so bleiben DNS-Histonkomplexe übrig, die sich unter dem Elektronenmikroskop als sphärische Partikel (Nukleosomen) mit einem Durchmesser von ca. 100 Å darstellen. Diese Nukleosomen sind perlschnurartig im Chromatin aneinandergereiht und enthalten jeweils zwei Moleküle von dem Histon H 2 A, H 2 B, H 3 und H 4 und ein DNS-Molekül von 200 Basenpaaren (3). Mit Hilfe von Neutronenstreuungsanalysen konnte die Nukleosomenstruktur näher untersucht werden. Danach sind die Histone von der DNS umhüllt (4). Die Chromatinsubstruktur ist bei Pflanzen und bei Tieren gleich (5).

Das Histon H 1 ist nicht involviert in die globuläre Substruktur (Nukleosom) des Chromatins. Es verbindet die Nukleosomen untereinander und spielt eine Rolle bei dem Aufbau von übergeordneten Strukturen im Chromatin und ist verantwortlich für die Chromosomenkondensation in der späten G 2 Phase (6).

Obwohl Pflanzen und Tiere phylogenetisch vor ca. 10^9 Jahren divergierten, ist die Histonzusammensetzung in ihren Chromosomen sehr ähnlich. Das Histon H 4 vom Rind besteht aus 104 Aminosäuren und unterscheidet sich von dem der Erbse nur in zwei Aminosäurepositionen (2). Eine derart geringe Neigung der Histone zu Mutationen über einen so großen Zeitraum ist ein Hinweis für die präzise DNS-Histon-Wechselwirkung. Eine Änderung der Aminosäuresequenz ist nur noch mit einem Funktionsverlust möglich und kommt damit einer Letalmutation gleich.

In den frühen 60er Jahren hat man den Einfluß der Histone auf die Matrizenaktivität der DNS in einem zellfreien System untersucht. Die Reaktionskomponenten eines solchen Systems bestehen aus DNS, RNS-Bausteinen, RNS-Polymerase, ein Enzym, das die Polymerisation von RNS-Bausteinen zu einem RNS-Molekül katalysiert. Gibt man zu solch einem zellfreien System Histone, so wird die RNS-Synthese unspezifisch gehemmt. Die maximale Hemmung liegt bei einem DNS-Histon-Verhältnis von 1 : 1, also die gleiche Relation, wie sie im Zellkern vorkommt.

Die Histone haben nichts zu tun mit den spezifischen Regulationsprozessen der Genaktivität (1). Welche Funktion hat dann der restliche Teil der chromosomalen Proteine: die Nichthistone? Wenn alle eukaryontischen Chromosomen aus Nukleosomen zusammengesetzt sind, dann können sich die Nukleosomen untereinander nur in ihrem Nicht-histon-Proteingehalt unterscheiden. Als Wechselwirkungspartner von den regulatorischen DNS-Sequenzen werden Nichthiston-Proteine angenommen.

Im Gegensatz zu den Histonen zeigen die Nichthistone eine außerordentlich große Heterogenität. Bisher konnte man in verschiedenen Laboratorien ca. 100 Nichthiston-Proteinkomponenten analysieren. In meiner Doktorarbeit (7) ist es mir gelungen, durch analytische Mikromethoden ca. 500 verschiedene Nichthiston-Proteinkomponenten aus dem Kuheuter zu analysieren und chemisch zu charakterisieren. Der Nichthistonanteil an den gesamten chromosomalen Proteinen schwankt zwischen 10 % und 60 %. Die Nichthistone unterscheiden sich in den verschiedenen Differenzierungsstadien, Zellzyklusstadien und den verschiedenen Organen. Zu ihnen gehören die Enzyme des Chromosomenstoffwechsels, außerdem Proteine, die für die verschiedenen Chromatinstrukturen verantwortlich sind (Eu- und Heterochromatin) und Aktivator-Repressor-Proteine.

Die Vermutung, daß sich gewebespezifische Genregulatorproteine unter den Nichthistonen befinden, läßt sich von Chromatinrekonstitutionsexperimenten herleiten, bei denen zunächst die verschiedenen Komponenten des Chromatins getrennt und dann wieder in den verschiedenen Kombinationen zusammengesetzt wurden. In den letzten

beiden Jahren gelang es einer Glasgower Arbeitsgruppe unter John Paul, das Chromatin aus dem Gehirn und der Leber von Mäuseembryonen in die drei Komponenten DNS, Histone und Nichthistone zu zerlegen (8). Aus diesen Komponenten ließ sich in vitro das Chromatin wieder rekonstituieren und diente in Gegenwart von RNS-Polymerase als Matrize für die RNS-Synthese.

Die fötale Leber hat die Fähigkeit, Hämoglobin zu synthetisieren, dagegen fehlt dem Gehirn diese Syntheseleistung. Rekonstituierte man die aus Leber isolierten Chromatinkomponenten wieder und stimulierte die RNS-Synthese, so fand man den Hämoglobin-Messenger in der Probe. Der gleiche Hämoglobin-Messenger wird in nativem, fötalem Rattenleberchromatin synthetisiert. Rekonstituiert man das Chromatin in der Weise, daß man die Histone und die DNS von der Gehirnpräparation nimmt und die Nichthistonproteine von der Leber, so wird gleichfalls Hämoglobin-Messenger gebildet. Bei den Gehirnrekonstitutionsexperimenten konnte jedoch kein Hämoglobin-Messenger nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht für eine zentrale Rolle der Nichthistone bei der Transkription von einzelnen Genen.

1869 entdeckte Friedrich Mischer im Tübinger Schloßlaboratorium die Nukleinsäuren. Er schrieb an den Anatomen und Embryologen Wilhelm His: "Es ist merkwürdig, wie nahe die beiden Aufgaben, die embryologische und die physiologisch-chemische, miteinander verwandt sind." Erst die molekularbiologischen Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben F. Mischers Ahnungen bestätigt.

Es mag nicht mehr lange dauern, bis man spezifische Genregulatorproteine isolieren und möglicherweise in die Zelle einführen kann, um dann die Genaktivität zu manipulieren. Es könnte auf diese Weise möglich sein, Fehlregulationen von Genen auf der Transkriptionsebene zu verhindern und vielleicht sogar ein breites Spektrum von Krankheiten, einschließlich des Krebses, zu heilen.

Mit der willkürlichen Förderung bzw. Inhibierung von ganz bestimmten Genaktivitäten bei höheren Organismen wären dem Menschen Methoden zugänglich, die ihm einen bisher unbekannten Eingriff in das Naturgeschehen erlauben würden.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. PAUL, J. Nature New Biology, 239 (1972) 134
2. DE LANGE, R.J., J. Biol. Chem. 224 (1969) 319
D.M. GAMBROUGH,
E.L. SMITH,
J. BONNER
3. KORNBERG, R.D. Science, 184 (1974) 868
4. BALDWIN, J.P., Nature, 253 (1975) 245
P.G. BOSELEY,
E.M. BRADBURY,
K. IBEL
5. MCGHEE, J.D., Nature, 254 (1975) 449
J.D. ENGEL
6. BRAM, St., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72
G. BUTLER-BROWNE, (1975) 1043
P. BANDY, K. IBEL
7. KRÜGER, Ch. Diss., einger. bei der Freien
Universität Berlin, 1976
8. PAUL, J., R.S. GILMOUR, Cold Spring Harbor Symp.
N. AFFARA, G. BIRNIE, Quant. Biol. 38 (1973) 885
P. HARRISON, A. HELL,
S. HUMPHRIES, J. WINDASS,
B. YOUNG
9. MÜLLER, H.J. In Heritage from Mendel, ed. R.A. Brink,
S. 419, University of Wisconsin Press,
Madison (1967) 1