

Chromatin. Gene in der dritten Dimension*

Thomas Seebeck

Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Universität Bern, Altenbergrain 21, CH-3013 Bern

Abstract

In the nuclei of eukaryotic cells, chromatin provides the structural framework for storage and processing of the genetic information. Biochemical analysis has revealed the presence of large amounts of a characteristic class of basic proteins, the histones, in association with DNA. Recent developments have lead to the concept of the nucleosome, a well defined complex of 8 histone molecules and 140 basepairs of DNA, as the structural building block of chromatin. The threads of nucleosomes can be wound into higher order structures, the solenoids. The continuous DNA molecule of each chromosome appears to be subdivided into many structural domains which are held together by a protein scaffold.

While so far mostly information on the structure of transcriptionally inactive chromatin has been obtained, current research centers around the structural changes occurring upon activation of previously silent genes.

Der Kern eukaryotischer Zellen fungiert als Speicher und Verarbeitungszentrum des Grossteils der genetischen Information. Diese ist in der Basensequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNS) festgehalten. Die Fülle der Information, die zum Funktionieren einer Zelle (respektive eines Organismus) benötigt wird, bedingt eine entsprechend grosse Menge von Trägermaterial. So enthält der Kern einer menschlichen Zelle etwa 170 cm DNS (Molekulargewicht ca. $3 \cdot 10^{13}$ dalton), was ungefähr 5×10^9 Basenpaaren entspricht, die ihrerseits (minimal) einen Informationsgehalt von 10^{10} bits aufweisen. Diese Grössenordnungen machen deutlich, welche ungeheuren Mengen an Information der gene-

tische Apparat einer Zelle zu speichern und verarbeiten hat. Dazu gehört in erster Linie die Fähigkeit, dass entsprechende Gene jederzeit durch ein spezifisches Signal abgerufen, d.h. in eine präzise Ribonukleinsäure-Kopie transkribiert werden können. Andererseits müssen allfällig auftretende Schäden am genetischen Material (durch mutagene Agenzien beispielsweise) durch entsprechende Reparaturmechanismen erfasst und genauestens repariert werden können. In sich vermehrenden Zellen muss zudem von der gesamten DNS-Menge innert Minuten bis Stunden jeweils eine äusserst genaue Kopie hergestellt werden. Neuere Resultate weisen auch in zunehmendem Mass darauf hin, dass einzelne Abschnitte der DNS innerhalb des Genoms verschoben und zu neuen Kombinationen verknüpft werden können.

Das Verstehen der molekularen Mechanismen dieser zentralen biologischen Vorgänge stellt seit langem eine faszinierende Herausforderung für Naturwissenschaftler jeder fachlichen Couleur dar. Die experimentelle Strategie, die bis in jüngster Zeit dominierte, beruhte auf der Analyse von einzelnen Komponenten des genetischen Apparates nach ihrer teilweisen oder völligen Reindarstellung. So wurden beispielsweise anhand von gereinigten Enzymen und definierten Substraten tiefe Einblicke in die molekularen Mechanismen der DNS-Replikation [1-3], der RNS-Transkription [4] und zahlloser anderer Teilvorgänge im genetischen Apparat gewonnen. Diese Strategie hatte von Anfang an ihre Begrenzung darin, dass man sich bewusst war, dass die untersuchten molekularen Vorgänge im Zellkern höchstwahrscheinlich gerade nicht als Interaktion freier,

* Dieser Artikel beruht auf dem Habilitationsvortrag des Autors vor der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern im Juli 1979.

löslicher Moleküle stattfindet, so wie sie im Reagensglas untersucht wurden, sondern dass diese Vorgänge an Strukturen gebunden ablaufen und durch diese Strukturen massgeblich beeinflusst werden. Erst in neuester Zeit aber konnten Konzepte und Methoden entwickelt werden, die nun eine genauere Analyse dieser Strukturen erlauben.

Chromatin

Bereits sehr frühe biochemische Untersuchungen hatten gezeigt, dass die DNS im Zellkern nicht als nacktes Molekül vorliegt, sondern mit grossen Mengen von Protein komplexiert ist. Für diesen Komplex aus DNS und assoziierten Proteinen im Zellkern hat sich der aus der Histologie entlehnte Begriff «Chromatin» eingebürgert. Die Proteine des Chromatins wurden auf Grund ihres Löslichkeitsverhaltens willkürlich in zwei Hauptgruppen aufgeteilt, die Histone und die Nicht-Histon-Proteine.

Histone

Histone sind relativ kleine (Molekulargewichte zwischen etwa 11000 und 25000 dalton), stark basische Proteine, die nur im Chromatin vorkommen und dort etwa in gleichen Mengen wie die DNS vorliegen. Die Histone lassen sich etwas vereinfachend, in fünf elektrophoretische auftrennbare Typen unterteilen, die als Typen H1, H2A, H2B, H3 und H4 bezeichnet werden. Charakteristischerweise liegen sie in einem molaren Verhältnis von 0,5:1:1:1:1 vor. Die Sequenzanalyse von Histonen aus verschiedenen Tier- und Pflanzenspezies zeigte, dass die Histone H3 und H4 während der Evolution der Eukaryoten auffallend stark konserviert worden sind, das heisst, dass im Verlaufe von etwa 400 Millionen Jahren höchstens jeweils 1% der Aminosäuresequenz verändert wird. Weiterhin stellte sich heraus, dass alle Histone jeweils eine Region aufweisen, die als globuläre, stark hydrophobe Domäne vorliegt, während die übrigen Teile des Moleküls stark basische, sehr flexible «Finger» bilden. Die Primärsequenz innerhalb der hydrophoben Domänen ist auch bei denjenigen Histontypen (H1, H2A und H2B) sehr strikte konserviert, die in den übrigen Teilen des Moleküls stärkere evolutionäre Divergenzen aufweisen als die extrem konservativen Histone H3 und H4 [5].

Nicht-Histon-Proteine

Diese zweite Gruppe der chromosomalen Proteine besteht aus zum grossen Teil noch undefinierten Proteinen, unter denen sich, unter anderen, sämtliche Enzyme und Regulationsproteine des Chromatins befinden. Struktur und Funktion des Grossteils dieser Proteine ist noch ungeklärt, aber neuere Resultate weisen darauf hin, dass einige dieser Proteine an der Genaktivierung beteiligt sind (6-8). Einige weitere Nicht-Histon-Proteine

scheinen eine Gerüstfunktion beim Aufbau der Chromatinstruktur auszuüben (siehe unten).

Nukleosom

Ein erster Durchbruch zum Verständnis der Chromatinstruktur erfolgte 1974, als auf Grund biochemischer und elektronenmikroskopischer Beobachtungen das Konzept des Nukleosoms als Grundbaustein des Chromatins postuliert wurde [9, 10]. Dieses Modell, das dann in kurzer Folge durch eine Fülle von experimentellen Daten verifiziert und verfeinert wurde, ist in Abb. 1 dargestellt.

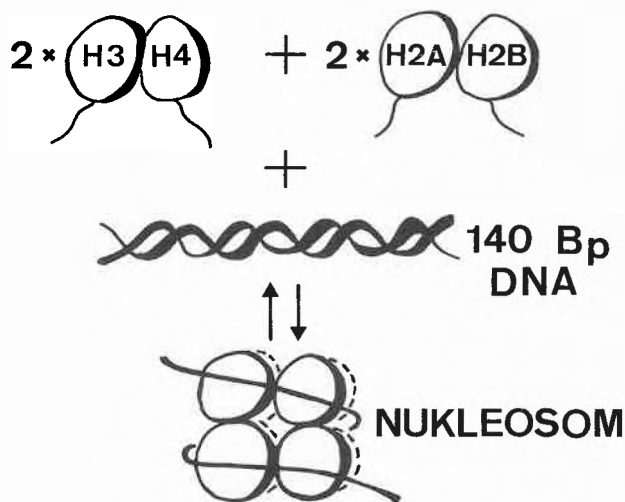


Abb. 1: Aufbau eines Nukleosoms. Jeweils zwei Dimere aus den Histonen H2A und H2B, respektive H3 und H4, bilden den Protein-Kern des Nukleosoms. Die Interaktion der Histone findet in den hydrophoben Domänen dieser Moleküle statt, während die flexiblen basischen Aminoenden zur Interaktion mit der DNS frei bleiben.

Um den Protein-Kern herum windet sich in einem genau definierten Verlauf ein DNS-Abschnitt von 140 Basenpaaren Länge.

Vier der fünf oben beschriebenen Histontypen, nämlich jeweils zwei Dimere aus den Histonen H3 und H4, bilden zusammen mit zwei Dimeren aus H2A und H2B den Protein-Kern des Nukleosoms. Diese Assoziation der Histone geschieht durch die Interaktion der hydrophoben Domänen der jeweiligen Moleküle, so dass ihre flexiblen, stark basischen Aminoenden (die «Finger») verfügbar sind, um die DNS zu binden. Um diesen Proteinkomplex herum windet sich ein Abschnitt des DNS Moleküls von jeweils 140 Basenpaaren Länge [11, 12]. Jedes Nukleosom wiederum ist durch einen freien DNS-Abschnitt von variabler Länge (ca. 20-80 Basenpaare) mit dem nächsten verbunden, so dass die Betrachtung im Elektronenmikroskop das Bild einer Perlenkette ergibt (siehe Abb. 1). Die Untersuchung des enzymatischen Abbaus der DNS im Chromatin mit einer unspezifischen Nuklease von *Mikrokokkus luteus* erbrachte den Nachweis dafür, dass die DNS zwischen den einzelnen Nukleosomen für Enzyme sehr gut zugänglich ist, d. h. in diesem Falle präferentiell abgebaut

wird, während die DNS die um den Proteinkern des Nukleosoms gewunden ist, vor enzymatischem Abbau geschützt ist (Abb. 3).

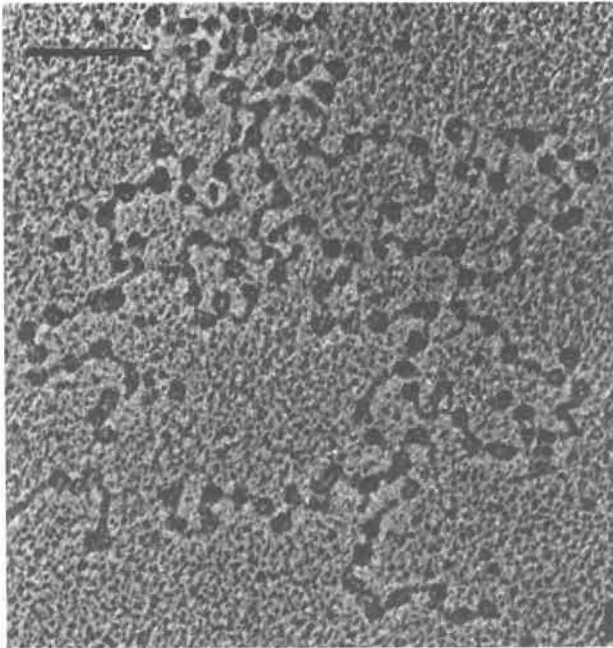


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Nukleosomen aus Rattenleber-Chromatin. Je nach den experimentellen Bedingungen liegen die Nukleosomenketten als Knäuel (diese Aufnahme) oder als ausgestreckte «Perlschnüre» vor (schwarzer Balken = 0,1 μm).

Diese Nukleosomenstruktur des Chromatins wurde bei allen bisher untersuchten Eukaryoten, von der Hefe bis zum Menschen, in praktisch identischer Anordnung gefunden. Diese Anordnung von Histonen und DNS stimmt auch quantitativ gut mit den bereits vorher gefundenen relativen Mengen von DNS und Histonen überein. Die Ausnahme in diesem Bild ist Histon H1, das offenbar am Aufbau des Nukleosoms nicht beteiligt ist.

Solenoid

Mit der Etablierung des Nukleosoms als Strukturbaustein des Chromatins stellte sich naturgemäss die Frage nach allfälligen Strukturen höherer Ordnung. Elektronenoptische Analysen von Chromatin ergaben, dass die Ketten von Nukleosomen ihrerseits in regelmässige Strukturen aufgewickelt sein können, in der Form sogenannter Solenoide [12, 13] (siehe Abb. 4). Bei diesem Faltungsprozess ist nun auch das Histon H1 beteiligt, das als «Klammer» hilft, die Nukleosomenketten in der aufgefalteten Konfiguration zu halten.

Domänen

Sowohl die Struktur des Nukleosoms als auch diejenige des Solenoids erschienen mehr oder weniger ausschliesslich durch die Interaktion von DNS mit Histonen, und von Histonen untereinander bedingt. So stellte sich die

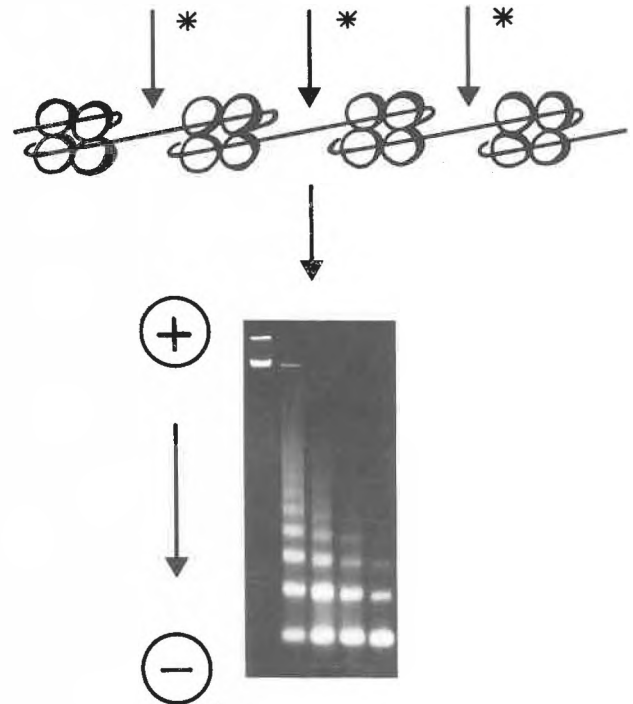


Abb. 3: Nukleasenverdauung von Chromatin A. Die DNS zwischen Nukleosomen (*) ist für Enzyme leichter zugänglich als diejenigen DNS-Abschnitte, die um die Nukleosomen gewunden sind. Wird Chromatin mit Mikrokokkus-Nuklease verdaut, so schneidet dieses Enzym die DNS also präferentiell zwischen den Nukleosomen. Dadurch entstehen DNS-Fragmente, deren Länge durch den Abstand zwischen zwei solchen Schnittstellen definiert ist. B. Die elektrophoretische Analyse der Grösse solcher DNS-Fragmente in Agarose-Gelen zeigt, dass neben Fragmenten, deren Grösse dem Abstand zwei benachbarter Schnittstellen entspricht (Monomeren), auch solche entstehen, die dem Abstand von weiter auseinanderliegenden Schnittstellen entsprechen (Di-, Tri- und höhere Oligomere). Die Kinetik einer solchen Verdauung zeigt zudem, dass zuerst vor allem höhere Oligomere herausgeschnitten werden, die dann mit zunehmender Zeitdauer zu kleineren Oligomeren und schliesslich zu Monomeren verdaut werden.

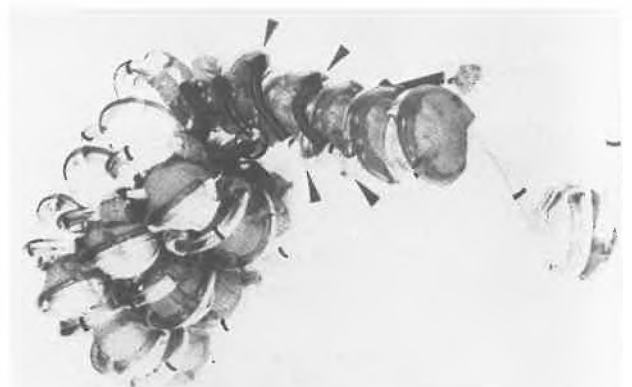


Abb. 4: Solenoid-Struktur (Räumliches Modell). Die Nukleosomen-Kette ist in Form einer regelmässigen Spirale aufgewickelt (ca. 5 Nukleosomen pro Umgang). Histonmoleküle vom Typ H1 liegen im Innern dieser Spirale, wo sie als «Klammern» dazu beitragen, die Nukleosomen in dieser Konfiguration festzuhalten (dunkle Pfeile). (Mit freundlicher Genehmigung der Cold Spring Harbor Press.)

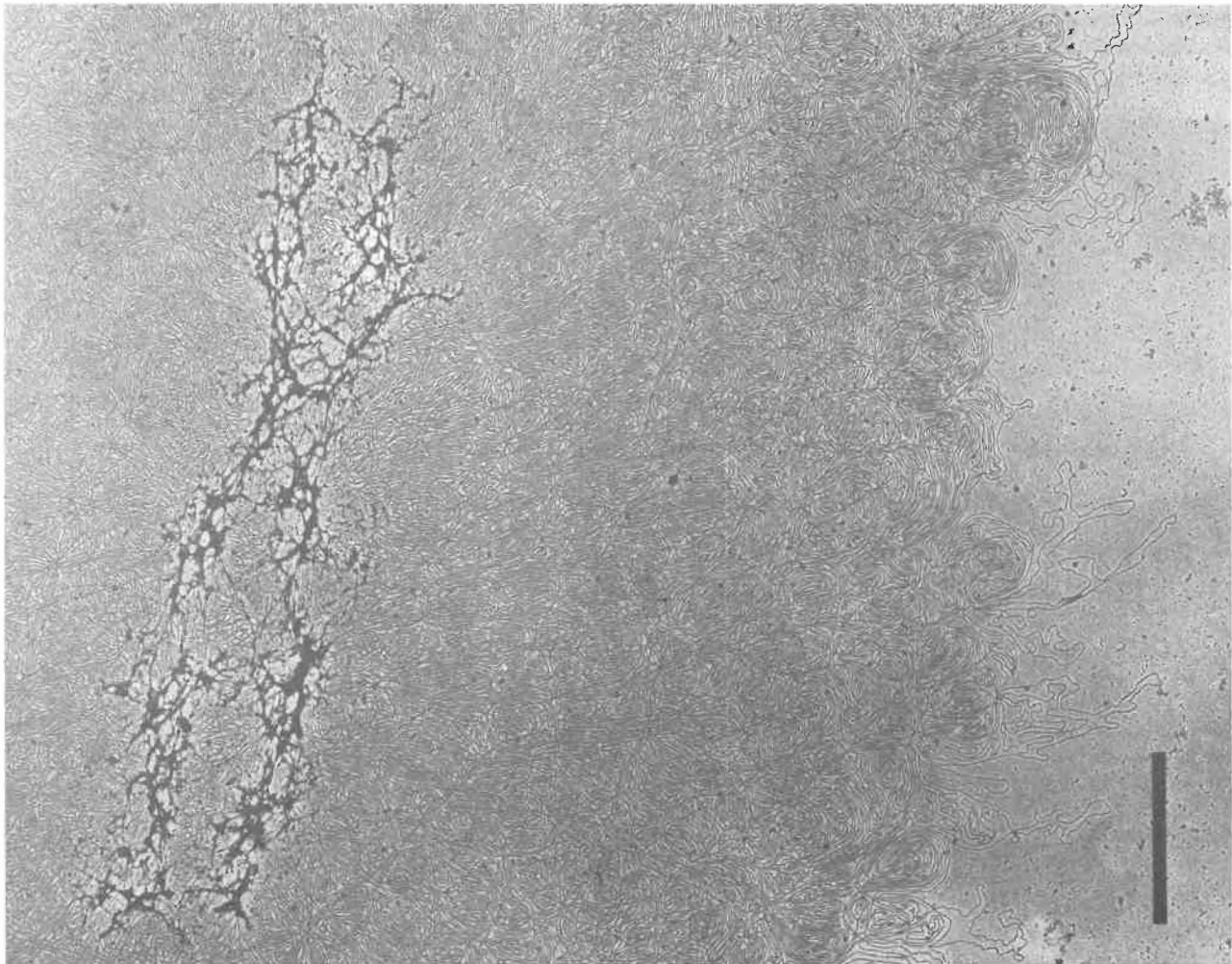


Abb. 5: Domänen des Chromatins. Diese elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt ein menschliches Chromosom (aus HeLa-Zellen), von dem sämtliche Histone und über 95% der Nicht-Histon-Proteine abgelöst worden sind. Deutlich zu sehen ist das verbleibende Proteingerüst, welches das sonst proteinfreie, kon-

tinuierliche DNS-Molekül in zahllosen Schlaufen zusammenhält. Jeweils eine solche Schlaufe wird als eine Domäne bezeichnet (schwarzer Balken = $2\ \mu\text{m}$). (Mit freundlicher Genehmigung der MIT Press).

Frage, ob nicht grössere Abschnitte von Solenoiden ihrerseits in Strukturen höherer Ordnung gegliedert sein könnten und andererseits, ob Histone die einzigen chromosomalen Proteine darstellen, die massgeblich am Aufbau der Struktur beteiligt sind. Experimente, bei denen durch geeignete Bedingungen sämtliche Histone und der überwiegende Teil der Nicht-Histon-Proteine von intaktem Chromatin abgelöst wurden, zeigten, dass die DNS auch unter diesen Bedingungen nicht als freies Molekül vorliegt [14]. Vielmehr bildet der kontinuierliche DNS-Faden zahlreiche Schlaufen, die jeweils an ihrer Basis durch ein Protein-Gerüst (Scaffold) zusammengehalten werden (siehe Abb. 5). Die Grösse dieser Schlaufen, der Domänen, liegt in der Grössenordnung von 20000 bis 80000 Basenpaaren, d. h. etwa $12\text{--}60 \times 10^6$ dalton.

Abb. 6 gibt eine schematisierte Zusammenfassung einer vorläufigen Interpretation der strukturellen Hierarchie des Chromatins.

Genaktivierung

Eines der Ziele der Analyse von Chromatinstruktur und Genomorganisation ist das Verständnis der Vorgänge bei der Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens. Die bisher angeführten Untersuchungen, die ja immer mit Gesamtchromatin ausgeführt wurden, ergeben zwar eine Vorstellung der durchschnittlichen Struktur von Chromatin, sagen aber nichts aus über die Struktur von Chromatin in der unmittelbaren Umgebung eines bestimmten Gens. In den meisten eukaryotischen Zellen aber sind mehr als 90% des Genoms inaktiv, d. h. nur eine sehr kleine Minorität aller Gene wird zu einem gegebenen Zeitpunkt transkribiert. Daraus folgt, dass die bisher untersuchten Chromatinstrukturen diejenigen genetisch inaktiver Abschnitte des Chromatins sind. Nun stellt sich natürlich die Frage nach möglichen Änderungen dieser Struktur, wenn ein Gen aktiviert wird, das heisst, wenn die entsprechende DNS transkribiert werden soll. Schon eine oberfläch-

liche Vorstellung von den räumlichen Gegebenheiten lässt eine Änderung der beschriebenen Chromatinstruktur bei der Genaktivierung für notwendig erscheinen: Der DNS-Strang, der die gewünschte Information trägt, ist mit einem komplementären Strang zu einer Doppelhelix verwickelt. Diese Doppelhelix ihrerseits windet sich etwa zweimal um sich selbst bei der Bildung eines Nukleosoms (der Chromatinabschnitt, der einem Gen äquivalent ist, umfasst etwa 10 bis 20 Nukleosomen). Die Nukleosomenketten ihrerseits sind eng zu einem Solenoid aufgewickelt, das seinerseits in einzelne Domänen gefaltet ist (siehe auch Abb. 6). Es ist schwierig zu sehen, wie ein RNA-polymerase-Molekül, das etwa die Grösse eines Nukleosoms hat, in einer solch vielfach gewundenen Struktur einen einzelnen DNS-Strang finden und dann transkribieren kann.

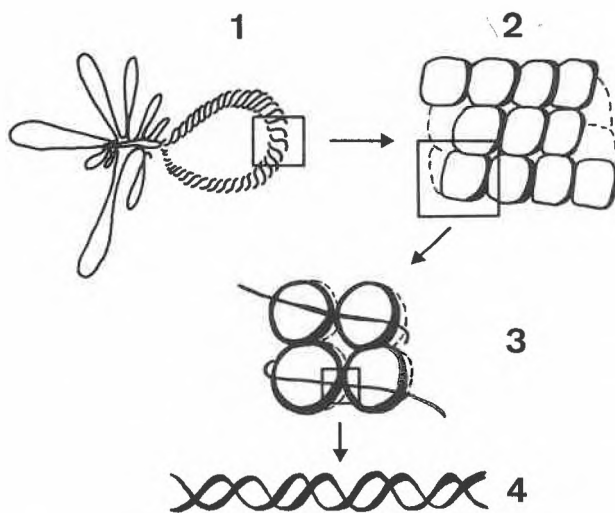


Abb. 6: Schema der Strukturhierarchie des Chromatins.

1. Ein Chromosom enthält ein einziges, kontinuierliches DNS-Molekül, das durch einen Komplex von Gerüst-Proteinen (den Scaffold) in Form zahlreicher Schlaufen, den Domänen, zusammengehalten wird.
2. Diese Domänen liegen im Chromatin in der Form von Solenoiden vor. Diese bestehen aus spiralförmig aufgewundenen Ketten von Nukleosomen.
3. Ein Nukleosom setzt sich aus einem Kern von Histonen und einem darum gewundenen Abschnitt des DNS-Moleküls zusammen. Die einzelnen Nukleosomen sind durch freie Abschnitte des DNS-Moleküls miteinander verbunden.

Die Frage nach einer möglichen Änderung der Chromatinstruktur als Teiloperation der Genaktivierung wird im Moment sehr intensiv bearbeitet. Der allgemeine Konsens ist der, dass die Struktur zumindest in der unmittelbaren Umgebung eines Gens bei dessen Aktivierung geändert wird, so dass das Gen für die RNA-polymerase, wie auch für andere Enzyme, leichter zugänglich und als «aktiv» erkennbar wird. Die genaue Natur dieser Konfigurationsänderungen sind

aber im Moment erst in ihren Umrissen erkennbar und sind höchstwahrscheinlich das Endergebnis des Zusammenspiels zahlreicher, ihrerseits wieder fein verknüpfter Regelfunktionen. Bereits aber ist klargeworden, dass die Aktivierung eines Gens nicht in einem Schritt vor sich geht, sondern dass die dazu notwendigen Strukturänderungen im Chromatin über mehrere Schritte verlaufen, die jeweils wieder einzeln reguliert werden können. Als repräsentatives Beispiel dafür sei die Aktivierung des Ovalbumin-Gens beim Huhn angeführt. Dieses sekretorische Protein wird beim geschlechtsreifen Huhn in den Zellen des Eileiters gebildet. Im Chromatin der sekretorischen Zellen des Eileiters junger Hühnchen liegt das Ovalbumin-Gen in der Struktur eines inaktiven Gens vor. Wird das Ovalbumin-Gen durch die Gabe von Östrogen induziert, so verändert sich als erste Antwort auf die Hormongabe die Chromatinstruktur des Ovalbumingens dergestalt, dass es nachher in seiner aktiven Konfiguration vorliegt. Erst nach dieser Konformationsänderung kann die entsprechende messengerRNA transkribiert werden. Wird im jetzigen Zeitpunkt die Hormonbehandlung abgesetzt, so hört die Transkription von messengerRNA wieder auf, das Ovalbumin-Gen bleibt aber in seiner aktiven Konformation. Wird später wieder Östrogen verabreicht, so beginnt die Synthese der entsprechenden messengerRNA ohne Verzögerung, weil das Gen bereits in der aktiven Konformation vorliegt. Die molekularen Vorgänge dieser Genaktivierung sind noch unbekannt, aber Resultate aus anderen Systemen deuten darauf hin, dass eine Gruppe der Nicht-Histon-Proteine, die sogenannten High-mobility-group proteins an der Konformationsänderung beteiligt sein könnten. Ganz grundsätzlich stellt sich aber auch die Frage, ob das einzelne Gen die Regulationseinheit darstellt, oder ob grössere Chromatinabschnitte jeweils durch das gleiche Signal aktiviert werden können. Ganz neue Befunde deuten darauf hin, dass eventuell die einzelnen Domänen solche Regulationseinheiten darstellen könnten, die als Antwort auf ein entsprechendes Signal als Ganzes vom inaktiven in den aktiven Zustand «umkippen» können [15, 16].

Schlussfolgerungen

Die Untersuchung der Struktur des Chromatins und ihres Einflusses auf die Regulation der genetischen Aktivität steckt heute noch in den Anfängen. Doch schon die blosse Existenz von definierten Strukturen verschiedener Ordnung im eukaryotischen Chromatin und deren Veränderung in Abhängigkeit von der Genaktivität hat bereits zu einer wichtigen Folgerung geführt: Dazu nämlich, dass Strukturen von zentraler Bedeutung sind für die Regulation und den Ablauf der genetischen Informationsverarbeitung. Dieser Erkenntnisschritt führt nun hinaus über das bislang dominierende Konzept von Jacob und Monod, in welchem genetische Regelvorgänge prinzipiell als Summen

von Interaktionen löslicher, frei miteinander reagierender Moleküle betrachtet werden. Dieses Konzept war im Verlauf der Jahre in verschiedenen prokaryotischen Systemen experimentell bestätigt worden. Trotzdem drängte sich der Schluss auf, dass die molekularen Vorgänge der genetischen Regulation, zumindest bei den Eukaryoten, gerade nicht durch die Interaktion freier Moleküle stattfindet, sondern dass all diese Vorgänge an Strukturen ablaufen und durch diese massgeblich beeinflusst werden. Dies schaffte nun Raum für die Annahme, dass das Jacob-Monod Konzept zwar in einigen Spezialfällen aus dem prokaryotischen Bereich zur völligen Beschreibung der Regelvorgänge hinreichend ist, dass aber beim überwiegenden Teil solcher Steuerungsprozesse der Einfluss der Strukturen nicht vernachlässigt werden darf.

Welcher Art diese Einflüsse sind und wie solche, komplexere Regulationsvorgänge ablaufen, darüber werden uns hoffentlich die Forschungsarbeiten der nächsten Jahre vermehrt Auskunft geben können.

Referenzen

- 1 *A. Kornberg*: DNA Synthesis, Freeman & Co, San Francisco 1974.
- 2 *R. Sheinin, J. Humbert und R. E. Pearlman*: Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 277.
- 3 *R. Schekman, A. Weiner und A. Kornberg*: Science 186 (1974) 987.
- 4 *R. Losick und M. Chamberlin*: RNA Polymerase. Cold Spring Harbour 1976.
- 5 *C. von Holt, W. N. Strickland, W. F. Brandt und M. S. Strickland*: FEBS Lett. 100 (1979) 201.
- 6 *G. D. Kuehn, H. U. Affolter, V. J. Atmar, T. Seebeck, V. Gubler und R. Braun*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 2541.
- 7 *B. W. O. Malley, H. C. Towle und R. J. Schwartz*: Ann. Rev. Genetics 11 (1977) 239.
- 8 *S. Weisbrod und H. Weintraub*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 630.
- 9 *A. L. Olins und D. E. Olins*: Science 183 (1974) 330.
- 10 *R. D. Kornberg*: Science 184 (1974) 868.
- 11 *J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes, R. S. Brown, B. Rushton, M. Levitt und A. Klug*: Nature 269 (1977) 29.
- 12 *A. Worcel*: Cold Spring Harbour Symposium 42 (1977) 313.
- 13 *J. T. Finch und A. Klug*: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (1976) 1897.
- 14 *K. W. Adolph, S. M. Cheng und U. K. Laemmli*: Cell 12 (1977) 805.
- 15 *A. Royal, A. Garapin, B. Cami, F. Perin, J. L. Mandel, M. Le Meur, F. Brégégère, F. Gannon, J. P. Le Pennec, P. Chambon, P. Kourilsky*: Nature 279 (1979) 125.
- 16 *C. Wu, P. M. Bingham, K. J. Livak, R. Holmgren und S. R. Elgin*: Cell 16 (1979) 797.