

2.4 Das Chromatin – seine Struktur und seine Funktion

von Ulrich Scheer

Die genetische Information, die als lineare Abfolge von je zwei Purin- und Pyrimidinbasen in der Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Zellkerns niedergelegt ist, ist im wesentlichen in allen Zellen eines Organismus identisch. Dennoch kann die Expression der genetischen Information in einzelnen Zelltypen sehr unterschiedlich sein. Zelldifferenzierung beruht letztlich darauf, daß in verschiedenen Zelltypen verschiedene Gene aktiv sind. Über die grundlegenden Mechanismen der Steuerung solcher genetischer Programme ist bisher nur wenig bekannt. Man weiß jedoch, daß für die Genexpression die Art der Verpackung von DNS mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen zu Chromatin eine große Rolle spielt sowie die sequenzspezifische Anlagerung von Proteinen an die DNS, welche als Regulationsfaktoren die Aktivität von Genen gezielt modulieren. Die hier dargestellten Untersuchungen haben zum Ziel, die Rolle des Chromatins bei der Regulation der Genexpression im Zuge von Zelldifferenzierungen aufzuzeigen, um so fehlgesteuerte Differenzierungsvorgänge, die zur Entartung normaler Zellen in Krebszellen führen, zu verstehen.

Chromatin ist ein Sammelbegriff, der die verschiedenen Formen des Materials der Chromosomen umfaßt. In der Mole-

kularbiologie bezeichnet man mit Chromatin im engeren Sinne das genetische Material der Zellen, die Desoxyribonukleinsäure in ihren biochemisch und strukturell präzise definierten Nucleoprotein-Verpackungskomplexen, die durch Anlagerung von spezifischen Kern-Proteinen, vor allem den Histonen, zustandekommen.

Am Chromatin beginnt die komplexe Wirkkette der Genexpression mit dem Umschreiben (der Transkription) funktioneller DNS-Abschnitte oder Gene in Ribonucleinsäure (RNS)-Moleküle. Der grundsätzliche Ablauf der Genexpression, die alle Vorgänge von dem Ablesen der genetischen Information bis zur Synthese der Protein-Genprodukte umfaßt, ist bei allen eukaryontischen Zellen gleich.

Die Transkription der im Zellkern befindlichen DNS in Vorläufer der Boten-RNS

(messenger RNA, mRNA) wird durch spezielle Enzyme, die RNS-Polymerasen, bewirkt. Während oder nach ihrer Synthese wird diese RNS verändert (Reifung): So werden beispielsweise die Moleküle modifiziert, Sequenzen ausgeschnitten und die Schnittstellen wieder miteinander verknüpft, bestimmte Proteine lagern sich an und bilden so kompakte RNS-Protein-Komplexe. Nach Ausschleusen durch die Poren der Kernhülle lagern sich die Boten-RNS Moleküle an Ribosomen des Zellplasmas an und übertragen so dem Proteinsyntheseapparat der Zelle eine Abschrift der genetischen Information, welche die Synthese spezifischer Proteine steuert (Translation).

Andere Gene wiederum kodieren RNS-Moleküle, die nie in Proteine übersetzt werden, sondern andere Funktionen haben: Beispiele sind die transfer-RNSs

und ribosomalen RNSs. Die letztere RNS-Klasse ist ein Bau- und Funktionselement der Ribosomen.

Chromatin läßt sich durch eine von dem amerikanischen Zellbiologen Oscar Miller eingeführte „Spreitungstechnik“ im Elektronenmikroskop darstellen. Eine besondere Bedeutung dieser Methode liegt darin, daß man mit ihrer Hilfe auch die Transkription von Genen direkt sichtbar machen kann. Man erhält so grundsätzlich wichtige Informationen über die Größe von Genen oder Transkriptionseinheiten (aus der sich die Größe der primären RNS-Transkriptionsprodukte ableiten läßt), ihre Anordnung im Genom, den strukturellen Aufbau von aktiven und inaktiven Chromatinbereichen und den jeweiligen Aktivitätszustand von Genen.

Ziel der hier geschilderten Arbeiten ist es, einerseits den genetischen Inhalt von Transkriptionseinheiten zu definieren (z. B. durch „In-situ-Hybridisierung“) und andererseits den biochemischen Aufbau von aktiven Genen zu untersuchen (z. B. durch Lokalisierung mit Antikörpern gegen bestimmte Proteine). Die Aufdeckung von Unterschieden – biochemischer und struktureller Art – zwischen genetisch aktiven und inaktiven Chromatinbereichen gibt uns Hinweise auf grundlegende Regulationsprinzipien, die bei der selektiven Transkription des Genoms eine Rolle spielen und so letztlich Zelldifferenzierung und Zelltransformation, d. h. die Entartung einer Zelle zu einer Tumorzelle, steuern.

Inaktives Chromatin

Im Elektronenmikroskop erscheint die Hauptmenge des Chromatins, gleichgültig, ob es aus menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Zellkernen gewonnen wurde, als lineare Ketten von globulären bzw. scheibenförmigen Untereinheiten, den Nucleosomen. Diese bestehen aus definierten DNS-Histon-Komplexen und stellen die elementare Verpackungseinheit der DNS im Chromatin dar. In der lebenden Zelle sind die Nucleosomen-Ketten weiter verdichtet bis hin zu den bereits im Lichtmikroskop erkennbaren Chromosomen, wie sie etwa in sich teilenden Zellen beobachtet werden.

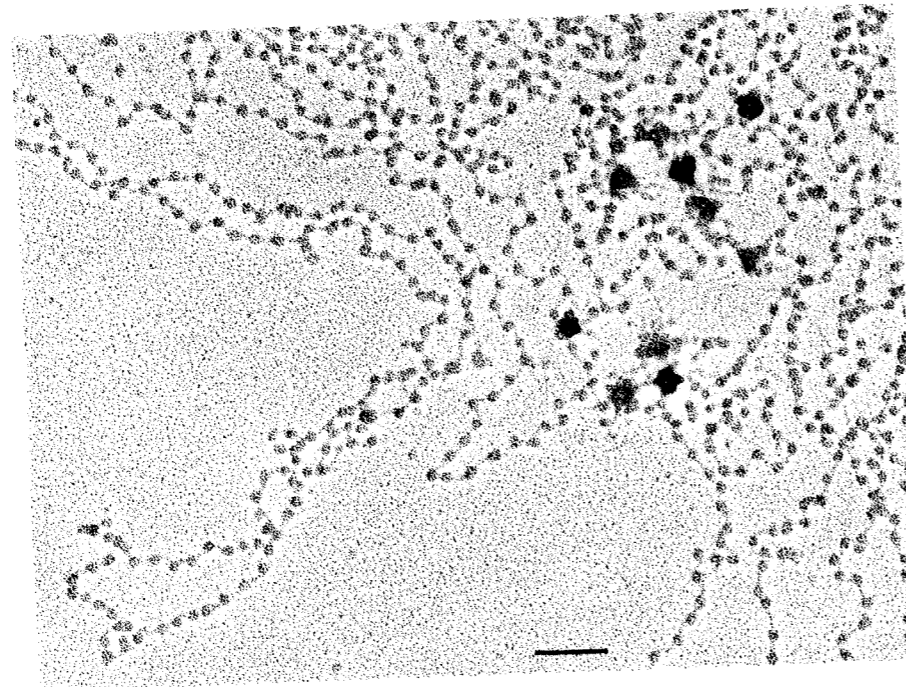


Abb. 17
Menschliche Zelle (HeLa) mit transkriptionell inaktivem Chromatin, das in nucleosomalen Perlenketten-Strukturen angeordnet ist. An einigen Stellen erkennt man lokale Verdichtungen der Chromatin-Filamente. Eichstrich = 0,1 µm

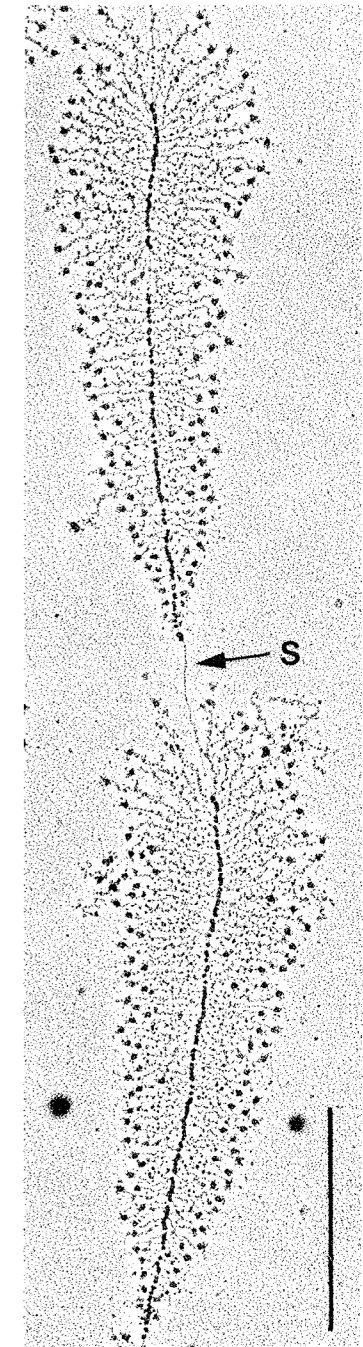
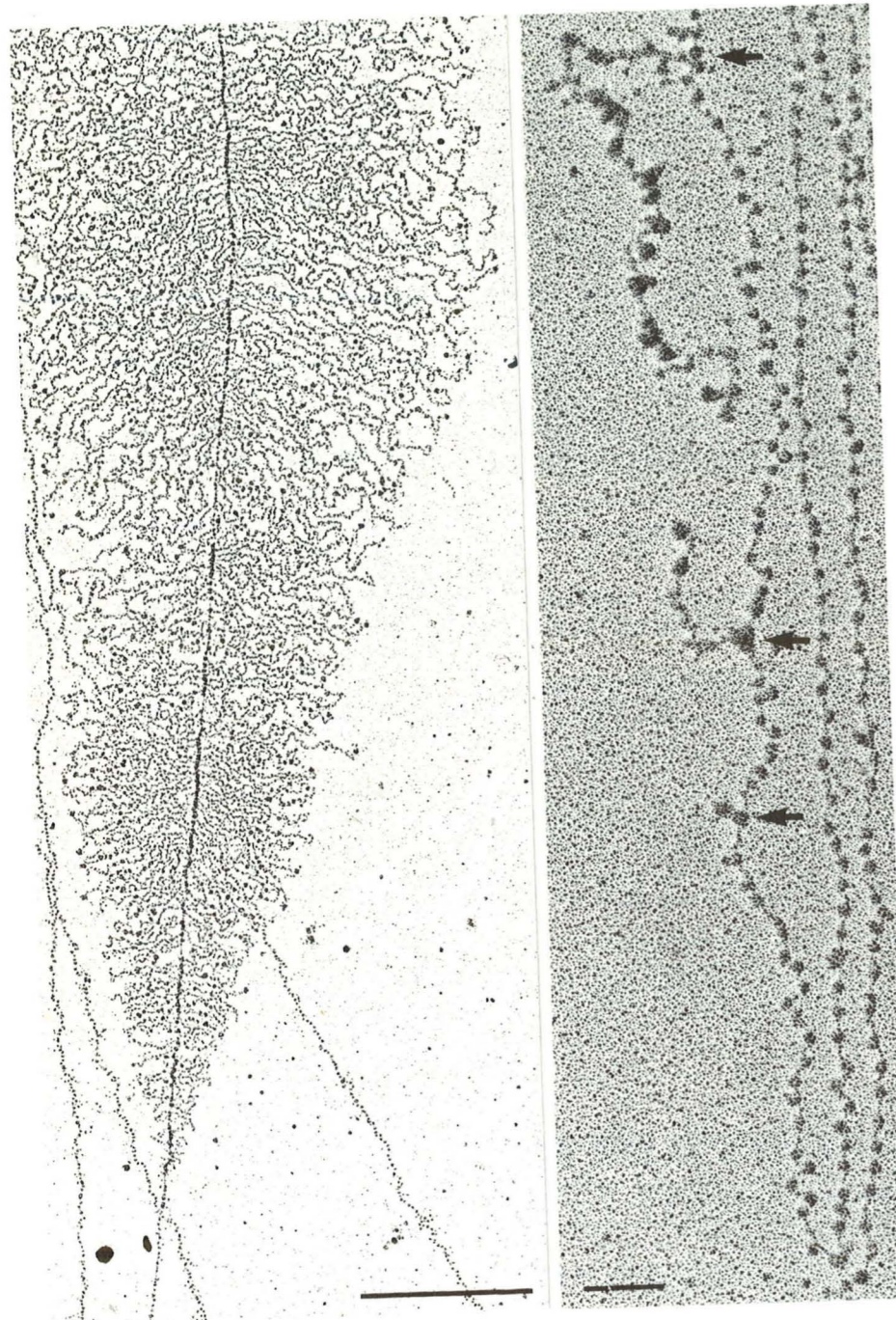


Abb. 18
Transkriptionell aktive ribosomale RNS-Gene eines Salamanders. Jede „Weihnachtsbaum“-Struktur stellt ein aktives Gen dar, das gleichzeitig von zahlreichen dicht gepackten RNS-Polymerasen gelesen wird. Die seitlichen Fibrellen enthalten die wachsenden RNS-Ketten. Die Gene sind durch „Spacer“ (S)-Chromatin getrennt, das eine glatte, nicht-nucleosomale Organisation hat. Eichstrich = 1 µm



Aktives Chromatin

Da sich der eigentliche Transkriptionsvorgang direkt im Elektronenmikroskop darstellen läßt, kann man aktive Chromatinbereiche eindeutig ansprechen. Ein aktives RNS-Polymerase-Molekül erscheint als globuläres Partikel mit einem Durchmesser von etwa 1,5 Nanometern (1 Nanometer = 1 Milliardstel Meter), das der Chromatinachse aufsitzt und eine mehr oder weniger lange seitliche Fibrille trägt. Eine solche Lateralfibrille enthält die sich entwickelnde RNS-Kette, die ihrerseits wiederum mit Proteinen besetzt ist. Je nach dem Aktivitätszustand des betreffenden Gens erkennt man nur eine oder wenige oder – wie im Fall der in vielen Zellen hochaktiven Gene für ribosomale RNS (rRNS) – zahlreiche, dicht aufeinanderfolgende Lateralfibrillen. In solchen Fällen wird die Leserichtung der RNS-Polymerasen durch die Längenzunahme der seitlichen Fibrillen angezeigt. Initiations- und Terminationsorte der Polymerasen lassen sich eindeutig dem Anfang und Ende einer „Weihnachtsbaum“-Struktur zuordnen.

Abb. 19
Proteingene in verschiedenen Aktivitätszuständen. Das linke Bild zeigt die Anfangsregion eines hochaktiven Gens aus einem Lampenbürsten-Chromosom eines Molches. Das rechte Bild stellt ein nur mäßig aktives Gen (drei Transkriptionskomplexe sind durch Pfeile gekennzeichnet) aus einer kultivierten Zelle von *Xenopus laevis* mit deutlichem nukleosomalem Perlenkettenmuster dar. Eichstriche = 1 μm (linkes Bild) und 0,1 μm (rechtes Bild)

Aktive rRNS-Gene, die üblicherweise in einigen hundert Kopien in den Nukleolen (Kernkörperchen) eines jeden Zellkerns vorkommen und durch ihre Tandemanordnung und hohe Transkriptionsaktivität meist leicht erkennbar sind, liegen in einer nicht-nukleosomalen Verpackung vor: ihre Chromatinachse ist deutlich anders organisiert als die Perlenkette von inaktivem Chromatin. Dies gilt auch für die zwischen den Genen liegenden, meist nicht transkribierten Abschnitte (Spacer). Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß der Übergang in diese nicht-nucleosomale und weitgehend gestreckte Chromatinanordnung die erste erkennbare strukturelle Veränderung im Zuge der Aktivierung von rRNS-Genen ist und der eigentlichen Transkription vorangeht.

Transkriptionseinheiten von Protein-Genen zeigen stark unterschiedliche Längen; daraus folgt die heterogene Größenverteilung ihrer Primärprodukte, d. h. der Moleküle für die Vorläufer der Boten-RNSs, die sogenannten „heterogeneous nuclear RNSs“. Sie kommen in der Regel nur in Einzahl und ohne erkennbares Anordnungsmuster und mit variabler Polarität entlang eines Chromatinstrangs vor. Während diese Gene in den meisten Fällen nur mäßig dicht mit Lateralfibrillen belegt sind, gibt es einige bemerkenswerte Ausnahmen wie die Ausfaltungen (Puffs) der „Riesenchromosomen“ aus den Speicheldrüsen mancher Insekten und die seitlichen Schleifen der „Lampenbürsten-Chromosomen“ bestimmter Pflanzen und Tiere: hier weisen Protein-Gene ebenfalls eine nahezu maximale Belegungsdichte mit RNS-Polymerasen auf. In solchen hochaktiven Zuständen liegt das Chromatin ebenfalls wieder in einem weitgehend entfalteten, nicht-nucleosomalen Zustand vor. In Zuständen ver-

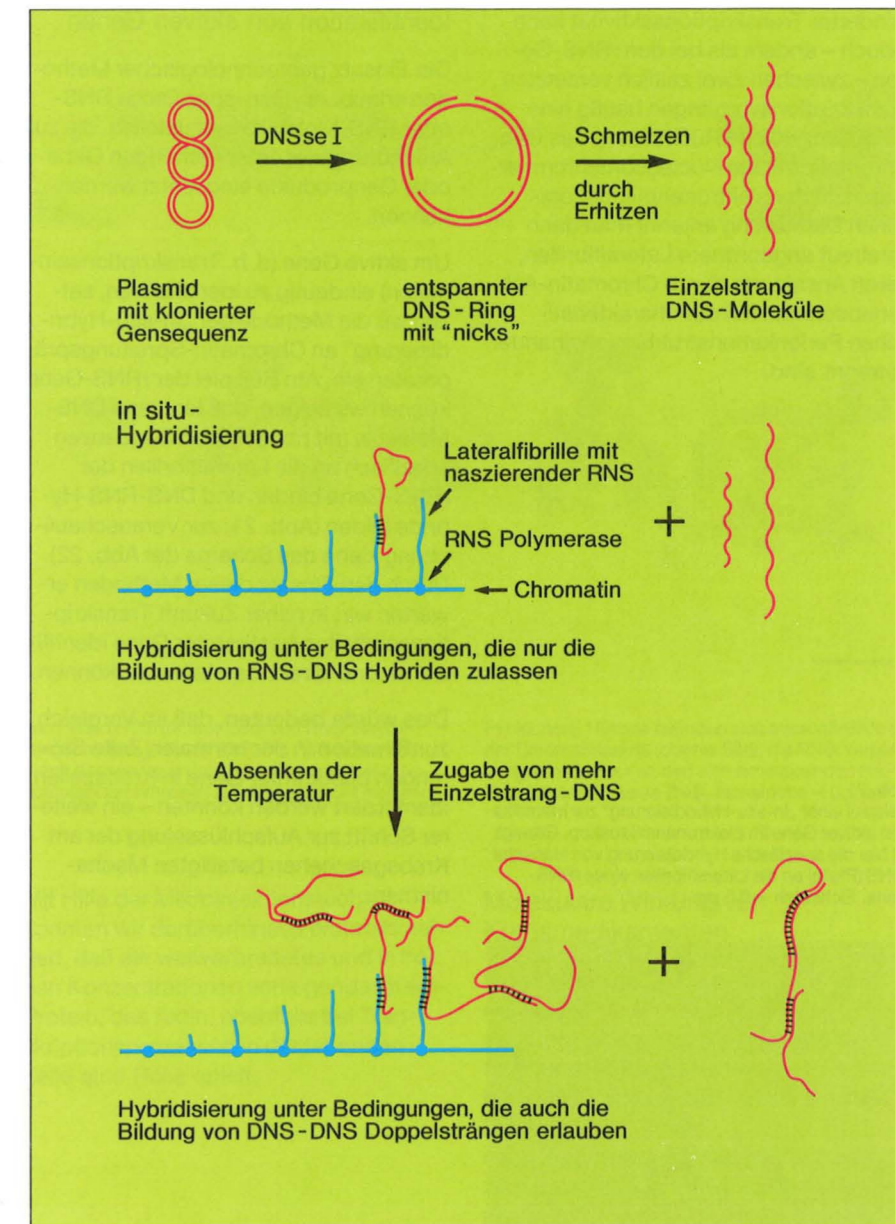


Abb. 20
Schematische Darstellung der „In-situ-Hybridisierung“ an elektronenmikroskopischen Spreitungs-

präparaten. Die hier beschriebene Methode hat den Vorteil, daß die DNS-Probe durch die Bildung größerer Aggregatbüschel direkt sichtbar ist

minderter Transkriptionsaktivität kann jedoch – anders als bei den rRNS-Genen – zwischen zwei zeitlich versetzten Transkriptionsvorgängen häufig eine zwischenzeitliche Rückfaltung des Gen-Chromatins in die Nucleosomenform erfolgen. In der elektronenmikroskopischen Darstellung erkennt man dann zerstreut angeordnete Lateralfibrillen, deren Ansatzorte durch Chromatin-Achsenabschnitte mit der charakteristischen Perlenkettenstruktur voneinander getrennt sind.

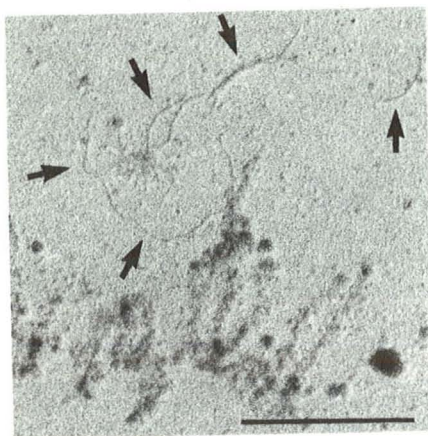
Identifikation von aktiven Genen

Der Einsatz gentechnologischer Methoden erlaubt es, Gen-spezifische DNS- oder RNS-Moleküle herzustellen, die zur Aufspürung der entsprechenden Gene oder Genprodukte eingesetzt werden können.

Um aktive Gene (d. h. Transkriptionseinheiten) eindeutig zu identifizieren, setzen wir die Methode der „In-situ-Hybridisierung“ an Chromatin-Spreitungspräparaten ein. Am Beispiel der rRNS-Gene können wir zeigen, daß klonierte DNS-Moleküle mit ribosomalen Sequenzen spezifisch an die Lateralfibrillen der rRNS-Gene binden und DNS-RNS-Hybride bilden (Abb. 21; zur Veranschaulichung siehe das Schema der Abb. 22). Durch den Einsatz dieser Methoden erwarten wir, in naher Zukunft Transkriptionseinheiten bestimmter Gene identifizieren und direkt darstellen zu können.

Dies würde bedeuten, daß im Vergleich zur Situation in der normalen Zelle Störungen bestimmter Gene in Krebszellen identifiziert werden könnten – ein weiterer Schritt zur Aufschlüsselung der am Krebsgeschehen beteiligten Mechanismen.

Abb. 21
Beispiel einer „In-situ-Hybridisierung“ zur Identifikation aktiver Gene im Elektronenmikroskop. Gezeigt ist hier die spezifische Hybridisierung von klonierter rDNS (Pfeile) an die Lateralfibrillen eines rRNS-Gens. Eichstrich = 0,5 µm



Proteine aktiver Chromatinbereiche

Den biochemischen Feinbau von Chromatin in verschiedenen Funktionszuständen kann man unter Verwendung von spezifischen Antikörpern mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Immunlokalisation untersuchen. Zur Sichtbarmachung der Antikörper im Elektronenmikroskop werden sie an kolloidale Goldpartikel mit einem Durchmesser von 5 oder 20 Nanometer gebunden, die elektronenmikroskopisch als kleine, schwarze Körnchen erscheinen. Ein besonders günstiges Modell-Objekt bieten hier die erwähnten hochaktiven „Lampenbürsten-Chromosomen“ von Amphibien-Oocyten. Antikörper gegen Histon-Proteine beispielsweise erlauben den Nachweis dieser Proteine an transkriptionell aktiven Chromatinbereichen, obwohl diese Bereiche normalerweise nicht in nucleosomaler Verpackung vorliegen. Antikörper gegen spezifische RNS-Verpackungsproteine wiederum zeigen, daß die sich bildenden premRNS-Ketten sofort nach ihrer Synthese, d. h. in unmittelbarer Nachbarschaft von der RNS-Polymerase, in linear angeordnete, globuläre RNS-Protein-Komplexe gerafft werden. Diese Methode eröffnet uns nun die Möglichkeit, durch Einsatz weiterer Antikörper die biochemische Zusammensetzung von transkriptionell aktiven Genen auf einer hohen Auflösungsebene zu untersuchen. Beispielsweise konnten wir so die Existenz von bestimmten Ribonucleoprotein-Partikeln (snRNPs), die eine wichtige Rolle beim Trennen und Wiederzusammenfügen von VorläufermRNS-Stücken spielen, an sich entwickelnden Lateralfibrillen nachweisen.

Ein ganz anderer experimenteller Ansatz zur Aufklärung der Funktion bestimmter Chromatin-Bestandteile ist die Mikroin-

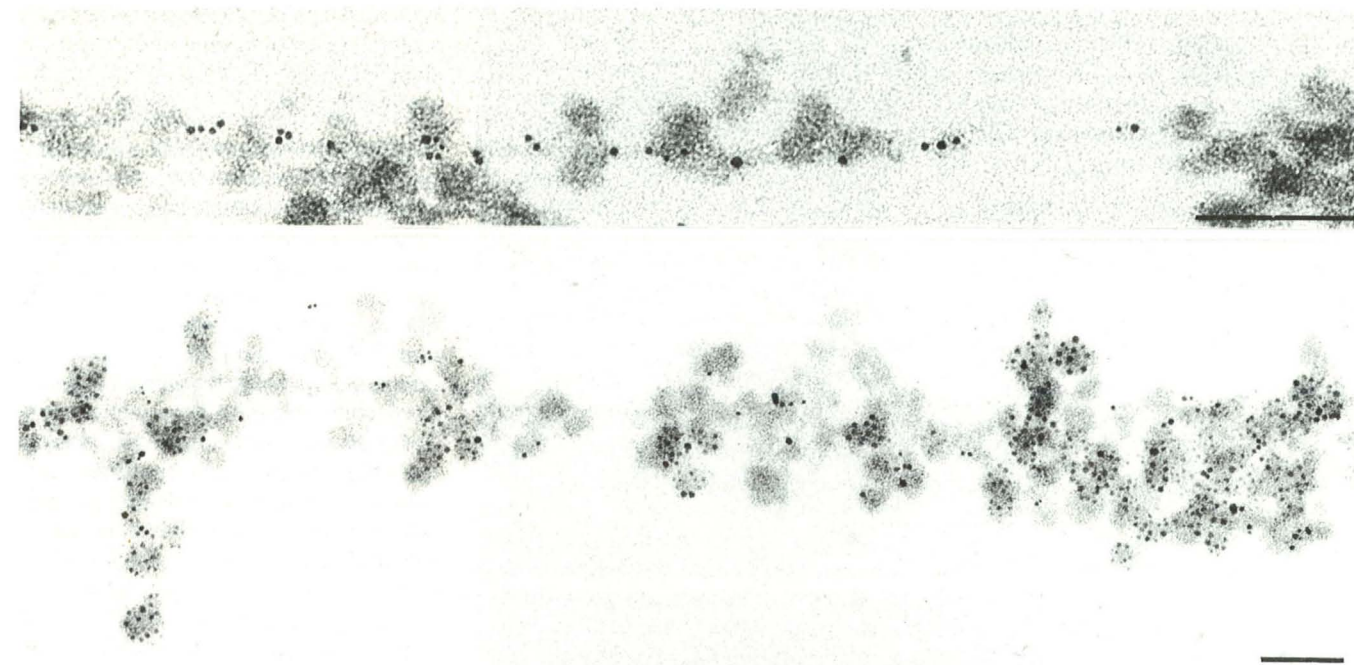


Abb. 22
Elektronenmikroskopische Immunlokalisation von Chromatin-Proteinen. Beide Bilder zeigen transkribierte Chromatinbereiche von Lampenbürsten-Chromosomen nach Inkubation mit Antikörpern ge-

gen Histon H2B (oberes Bild) und RNS-Verpackungsproteine (unteres Bild). Die Antikörper sind durch Koppelung an kolloidale Goldpartikel (5 Nanometer Durchmesser) sichtbar gemacht (schwarze

Pünktchen). Histone befinden sich ausschließlich an der Chromatinachse (oberes Bild), die RNS-Verpackungsproteine nur an den sich entwickelnden RNP-Transkripten (unteres Bild). Eichstriche = 0,1 µm

jektion von Antikörpern gegen Chromatin-Proteine direkt in den Zellkern lebender Zellen. Wir untersuchen dabei, ob „vor Ort“ gebrachte Antikörper durch die spezifische Bindung an eben dieses Protein hemmend oder modifizierend in den Ablauf der Genexpression eingreifen.

Dies ist tatsächlich der Fall: Antikörper gegen Histon H2B, bestimmte Nicht-Histon-Proteine (HMG-1, HMG-14/17) und RNS-Polymerase II hemmen die Transkription von Protein-Genen in der lebenden Zelle, – ein Hinweis darauf, daß diese Proteine funktionell mit aktiven Chromatinbereichen verbunden sind.

Mit Hilfe der Mikroinjektionstechnik konnten wir darüberhinaus erstmals zeigen, daß ein weitverbreitetes und in hohen Konzentrationen vorliegendes Kernprotein, das Aktin, ebenfalls bei Transkriptionsprozessen in der lebenden Zelle eine Rolle spielt.

Molekulare Wirkung von Krebsmedikamenten

Eine Reihe von Drogen, die als Krebsmedikamente (Zytostatika) klinische Bedeutung haben, hemmen die Transkription durch Einlagerung in das DNS-Molekül. Ihre Wirkung läßt sich direkt im Elektronenmikroskop verfolgen: Kurz nach Zugabe von Medikamenten wie zum Beispiel Actinomycin D oder Adriamycin zu Zellen kommt es zu einer dramatischen Abnahme der Anzahl der Lateralfibrillen pro Gen.

Abhängig von der Medikamentenkonzentration und der Dauer der Einwirkung

kommt es schließlich zum vollständigen Erliegen der Transkription: Alle Lateral-fibrillen sind nun abgeworfen und das Gen-Chromatin weist jetzt auch die typische nucleosomale Organisation von inaktivem Chromatin auf.

Ob eine Droge transkriptionelle oder nachgeschaltete posttranskriptionelle Vorgänge beeinflusst, ist oftmals aus biochemischen Daten nur schwer ableitbar. Elektronenmikroskopische Analysen von Chromatinspreitungen erlauben hier eine sichere Entscheidung.

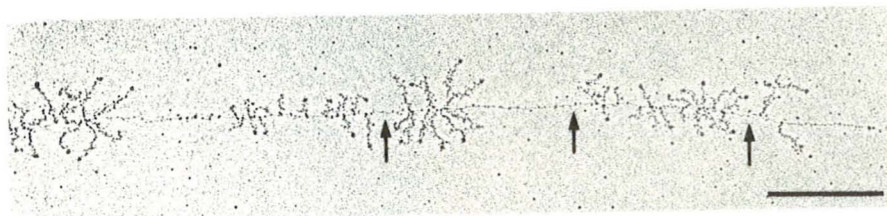
Ordnungsprinzipien im Zellkern?

Die Frage, ob der funktionelle Ablauf der Genexpression eine definierte topologische Anordnung der Gene im Zellkern bedingt, haben wir experimentell am Beispiel der rRNS-Gene untersucht.

Da diese Gen-Klasse – und nur sie – von der RNS-Polymerase des Typs I gelesen wird, stellen Antikörper gegen diese Polymerase ein hochspezifisches Mittel zur Lokalisierung von transkriptionell aktiven rRNS-Genen dar.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie und der Immun-Elektronenmikroskopie konnten wir zeigen, daß die rRNS-Gene eng gepackt in bestimmten Strukturkomponenten (den „fibrillären Zentren“) der Nukleolen vorliegen. Diese typische räumliche Ordnung der rRNS-Gene ist jedoch nach experimentellen Eingriffen in Reifungsvorgänge bei der rRNS-Bildung aufgehoben. Zugabe der Hemmdroge DRB (5,6-Dichloro-1- β -D-Ribofuranosylbenzimidazol), – einem Analogon des natürlichen Nucleinsäure-Bausteins Adenosin, das die Transkription der rRNS-Gene nur unwesentlich beeinflusst, – führt innerhalb weniger Stunden zu einer Entfaltung der Nukleolen verbunden mit einer umfassenden räumlichen Umverteilung der rRNS-Gene, die nun nahezu den gesamten Kern-Binnenraum ausfüllen. Dieser Effekt kann nach Absetzen der Droge völlig rückgängig gemacht werden. Er zeigt exemplarisch, daß die im Kern ablaufen-

Abb. 23
Inaktivierung von rRNS-Genen durch Zugabe des Krebsmedikaments Aktinomycin D zu den Zellen: die Anzahl der lateralen Fibrillen ist bereits stark reduziert. Einige resultierende Genlücken sind durch Pfeile markiert. Eichstrich = 1 μ m



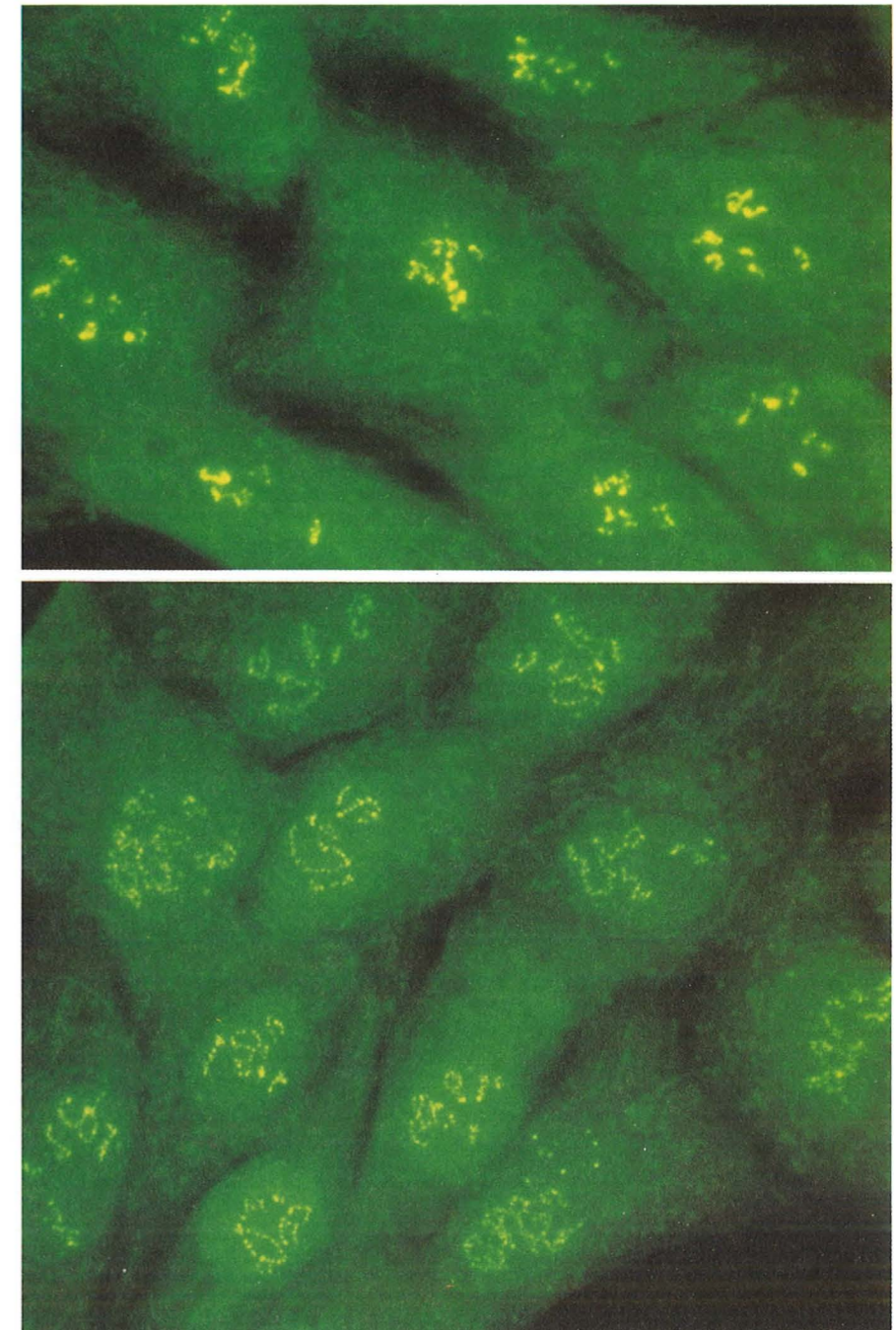
den Vorgänge der Genexpression eine bestimmte topologische Anordnung der dabei beteiligten Komponenten, hier in den Kernkörperchen, erfordern.

Die Zelle ist also nicht – wie man lange gedacht hat – eine Art Sack, in dem verschiedene Bestandteile ungeordnet enthalten sind. Vielmehr stellt sie ein höchst differenziertes System mit exakten Anordnungen dar, in dem bestimmte Funktionen mit bestimmten Ordnungsprinzipien verbunden sind. Die Kenntnis dieser Ordnungsprinzipien wird es uns in der Zukunft erlauben, Störungen im Zellgeschehen – wie sie zum Beispiel der Krebsentstehung entsprechen – genauer zu beobachten und eventuell die Ausgangspunkte der Störungen zu identifizieren.

Summary

Examination of spread preparations of chromatin by electron microscopy allows the visualization and identification of transcriptionally active and inactive chromatin and provides a useful tool to study structural parameters of chromatin organization as a function of transcription. Such preparations can be combined with in situ hybridization and immunolocalization techniques in order to identify the genetic content and the protein composition of transcription units. By microinjection of antibodies against specific proteins into nuclei of living cells the involvement of these components in the transcription process is demonstrable as an inhibition of transcriptional activity. Using chromatin spreading techniques, effects of certain drugs on the transcriptional process can also be directly examined. A direct correlation between the specific topological arrangement of genes and their function is indicated by a dramatic redistribution of the rRNA-genes of the nucleolus after experimental inhibition of processing steps of the pre-rRNA.

Abb. 24
Lokalisierung von aktiven ribosomalen RNS-Genen in kultivierten Rattenzellen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Verwendet wurden Antikörper gegen RNS-Polymerase I.
Oberes Bild: im Normalzustand liegen die ribosomalen RNS-Gene dicht gepackt in den Nukleolen vor.
Unteres Bild: sechs Stunden nach Zugabe des Adenosin-Analogons DRB haben sich die Nukleolen stark aufgelockert und die ribosomalen RNS-Gene durchziehen nun in Form von Perlenketten-Strukturen den gesamten Kernbinnenraum



Priv. Doz. Dr. Ulrich Scheer
Abteilung für Membranbiologie und
Biochemie,
Institut für Zell- und Tumorbologie

Beteiligte Wissenschaftler

Prof. Dr. Werner W. Franke

In Zusammenarbeit mit

Dr. Hanswalter Zentgraf
Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie,
Institut für Virusforschung

Prof. Dr. Ekkehard Bautz
Fakultät für Biologie,
Abteilung Molekulare Genetik,
Universität Heidelberg

Dr. Michael Bustin
National Institute of Health, Bethesda,
USA

Dr. Terence Martin
University of Chicago, USA

Dr. Kathleen Rose
The University of Texas, Houston, USA

Dr. John Sommerville
University of St. Andrews, Schottland

Ausgewählte Publikationen

Scheer, U.: Changes of nucleosome frequency in nucleolar and non-nucleolar chromatin as a function of transcription: an electron microscopic study. *Cell* 13, 535–549 (1978).

Scheer, U., Sommerville, J., Bustin, M.: Injected histone antibodies interfere with transcription of lampbrush chromosome loops in oocytes of *Pleurodeles*. *J. Cell Sci.* 40, 1–20 (1979).

Gall, J. G., Stephenson, E. C., Erba, H. P., Díaz, M. O., Barsacchi-Pilone, G.: Histone genes are located at the sphere loci of new lampbrush chromosomes. *Chromosoma* 84, 159–171 (1981).

Bona, M., Scheer, U., Bautz, E. K. F.: Antibodies to RNA Polymerase II (B) inhibit transcription in lampbrush chromosomes after microinjection into living amphibian oocytes. *J. Mol. Biol.* 151, 81–99 (1981).

Igo-Kemenes, T., Hörz, W., Zachau, H. G.: Chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* 51, 89–121 (1982).

Scheer, U., Zentgraf, H.: Morphology of nucleolar chromatin in electron microscopic spread preparations. In: *The Cell Nucleus*, Vol. 11. H. Busch and L. Rothblum, eds., 143–176. Academic Press, New York (1982).

Scheer, U., Rose, K. M.: Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1431–1435 (1984).

Scheer, U., Hügler, B., Hazan, R., Rose, K. M.: Drug-induced dispersal of transcribed rRNA genes and transcriptional products: Immunolocalization and silver staining of different nucleolar components in rat cells treated with 5,6-dichloro- β -D-ribofuranosylbenzimidazole. *J. Cell Biol.* 99, 672–679 (1984).

Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W. W., Jockusch, B. M.: Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* 39, 111–122 (1984).

Abb. 25

