

- [24] C. Barnett, D. R. Marshall u. D. Lloyd, *J. Chem. Soc. B* 1968, 1536.
 [25] G. Schwarzenbach u. K. Lütz, *Helv. Chim. Acta* 23, 1162 (1940).
 [26] D. Lloyd, R. H. McDougall u. D. R. Marshall, *J. Chem. Soc. C* 1966, 780.
 [27] A. M. Gorrings, Dissertation, University of St. Andrews 1968.
 [28] D. Lloyd u. D. R. Marshall, *J. Chem. Soc.* 1958, 118; R. P. Bell u. D. R. Marshall, *ibid.* 1964, 2195; C. Barnett, H. P. Cleghorn, G. E. Cross, D. Lloyd u. D. R. Marshall, *ibid.* C 1966, 93; A. M. Gorrings, D. Lloyd, F. I. Wasson, D. R. Marshall u. P. A. Duffield, *ibid.* C 1969, 1449; D. Lloyd u. D. R. Marshall, Vortrag bei der Tagung der Heterocyclic Group der Chemical Society, London 1970.
 [29] C. Barnett, *Chem. Commun.* 1967, 637; *J. Chem. Soc. B* 1967, 2436; A. M. Gorrings, D. Lloyd, D. R. Marshall u. L. A. Mulligan, *Chem. Ind (London)* 1968, 130.
 [30] A. M. Gorrings, D. Lloyd u. D. R. Marshall, *J. Chem. Soc. C* 1970, 617.
 [31] E. M. Grant, D. Lloyd u. D. R. Marshall, *Chem. Commun.* 1970, 1320.
 [32] A. M. Gorrings, D. Lloyd u. D. R. Marshall, *Chem. Ind. (London)* 1968, 1160.
 [33] Wie aus jedem Vortrag beim Symposium in Jerusalem [1] hervorging.
 [34] IUPAC-Regel A-12.4.
 [35] D. Lloyd: *Alicyclic Compounds*. Arnold, London u. American Elsevier, New York 1963, S. 103; D. Lloyd: *The Chemistry of Simple Organic Compounds*. University of London Press, London 1964.
 [36] M. J. S. Dewar, *Chem. Soc. Spec. Publ. Nr. 21*, 177 (1967).
 [37] Dieser Ausdruck basiert auf einem Vorschlag, den wir Prof. K. J. Dover, Department of Greek, University of St. Andrews, verdanken.
 [38] E. M. Kosower: *An Introduction to Physical Organic Chemistry*. Wiley, New York 1968, S. 63 ff.
 [39] D. Lloyd u. D. R. Marshall in: *Aromaticity, Pseudo-aromaticity, Anti-aromaticity*. The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem 1971, S. 85.
 [40] P. J. Garratt, N. E. Rowland u. F. Sondheimer, *Tetrahedron* 27, 3157 (1971).

Struktur und Funktion chromosomaler Nucleohistone

Von Eberhard Zimmermann^[*]

Durch die Fortschritte der molekularen Biologie ist eindeutig bewiesen, daß alle genetischen Informationen zellulärer Organismen in der DNA enthalten sind. Der Hauptanteil der DNA ist in den Zellkernen lokalisiert und bildet mit Histonen und sauren Proteinen das Gerüst der Chromosomen. Dieser DNA/Protein-Komplex, auch Nucleohiston oder Chromatin genannt, repräsentiert die Anzahl aller vorhandenen Gene eines Zelltypes und ist eine genetisch funktionelle Einheit. Allen genetischen Strukturen ist dieses Grundelement gemeinsam, und nur dessen räumliche Anordnung oder Multiplizität bestimmt die artgebundene unterschiedliche Morphologie der Chromosomen. Als strukturerhaltende Elemente können die Histone angesehen werden, die im allgemeinen mit dichtgepackten und metabolisch inaktiven DNA-Sequenzen assoziiert sind. Das lysinreiche Histon I scheint eine spezielle regulatorische Funktion zu erfüllen, da es die Transkription bestimmter Gene zu unterdrücken vermag. Die sauren Proteine sind vor allem in metabolisch aktiven chromosomalen Strukturen nachweisbar, die gestreckte DNA-Sequenzen aufweisen und den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der Nucleohistone besonders unterstreichen. Ungefähr 50% der DNA im Nucleohiston-Komplex sind nicht durch Proteine maskiert, obwohl nur ein geringer Prozentsatz dieser freien Nucleotidsequenzen durch RNA-Polymerase transkribiert werden kann. Da die bis jetzt sequenzanalytisch untersuchten Histone eine ungleiche Verteilung der basischen Aminosäurereste aufweisen und nur durch diese geladenen Sequenzen an die DNA gebunden werden können, ist diese „offene“ Struktur leicht erklärlich. In dem von Crick vorgeschlagenen Chromosomen-Modell wird die einzigartige Struktur der Histone berücksichtigt und angenommen, daß die histonreichen Heterochromatinbänder nur multiple Kontrollelemente enthalten und nicht transkribiert werden. Dagegen soll das Euchromatin funktionellen Genen entsprechen, die bereits einsträngige DNA enthalten und für diese spezifische Konformation besondere Proteine benötigen.

1. Einleitung

Die Nucleohistone (Chromatine) sind natürlich vorkommende biologische Makromoleküle, die aus DNA und Proteinen bestehen (Abschnitt 3). Sie sind die Grundbausteine der Chromosomen in den tierischen und pflanzlichen Zel-

len. Während der Interphase der normalen Zellteilung (Mitose) haben die Chromosomen von Organismen mit einem echten Zellkern (Eukaryoten) einen Durchmesser von 200–500 Å. Aufgrund der aufgelockerten Struktur der Nucleohistonstränge können sie optisch nicht nachgewiesen werden. In der Prophase des Teilungszyklus kondensieren sich die Nucleohistonfasern, und das chromosomale Material wird kompakter angeordnet. In der Metaphase lassen sich schließlich die Chromosomen in der Teilungsebene der Zelle als Gebilde aus zwei Chromatiden beobachten, die durch das Centromer zusammengehalten werden. Diese Brücke wird in der folgenden Anaphase abge-

[*] Priv.-Doz. Dr. E. Zimmermann
 Harvard University, Department of Chemistry,
 Cambridge, Massachusetts 02138 (USA)
 Gegenwärtige Anschrift:
 Physiologisches Institut der Universität
 Allgemeines Verfügungszentrum
 44 Münster, Robert-Koch-Straße 28

baut. Von speziellen Organellen der Zelle werden nun Spindelfasern zum Ansatzpunkt des ehemaligen Centromers gebildet, welche die Chromosomenhälften auf die beiden Tochterzellen verteilen. Die folgende Telophase ist der Bildung der beiden neuen Zellkerne gewidmet; eine neue Interphase schließt sich an (Abb. 1). Die Verdoppelung der Chromosomen und damit die Verdoppelung der in ihnen enthaltenen DNA ist bereits in der Mitte der Interphase abgeschlossen. Gleichzeitig mit der DNA-Synthese müssen vor allem Histone gebildet werden, da sie ja die natürlichen Bindungspartner der DNA in den Kernen pflanzlicher und tierischer Zellen sind. (Nur in den Spermatozoenkernen einiger Fischarten sind die Histone durch Protamine ersetzt, eine spezielle Klasse basischer Proteine mit bis zu 60% Arginin.)

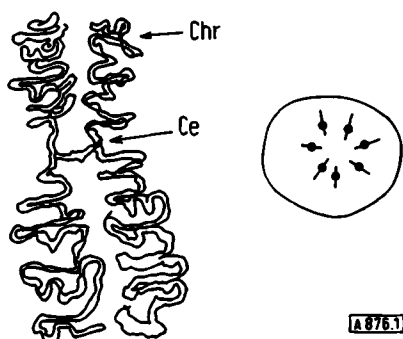


Abb. 1. Links: Metaphase-Chromosom, das aus zwei Chromatiden (Chr) und dem Centromer (Ce) besteht. Rechts: Metaphase-Stadium („Metaphase-Platte“) eines Zellkerns, Schnitt durch die Äquatorebene. Beide Abbildungen stark schematisiert.

Der Nachweis der DNA in den Chromosomen gelang erstmals Feulgen (1924); spätere Bestimmungen des DNA-Gehaltes pro Zellkern ergaben $1.7 \cdot 10^{-13}$ bis $15.0 \cdot 10^{-13} \text{ g}^{[1]}$. Am besten untersucht sind die Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen der Dipteren (Fliegen und Mücken); vor allem in den Interphase-Zellen der Larven lassen sich diese riesigen chromosomalen Strukturen leicht nachweisen. Sie haben die hundertfache Länge und den mehrfachen Durchmesser der Metaphase-Chromosomen und enthalten pro Zellkern wesentlich mehr DNA als die entsprechenden diploiden Zellen der Mammalier.

Die Riesenchromosomen, deren detaillierte Struktur nach spezifischer Färbung betrachtet werden kann, repräsentieren zahlreiche Gene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen, von denen jeweils Hunderte identischer Kopien vorliegen können. Ihr transversales Muster alternierender Bänder chromatischen und achromatischen Materials führte zu den Bezeichnungen Heterochromatin und Euchromatin. Ris fand später bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Schnitten durch Chromosomen, daß Hetero- und Euchromatin-Zonen sich hauptsächlich durch den Packungszustand der Nucleohistone unterscheiden. Diese Muster sind so charakteristisch, daß sie den Cytologen als Grundlage für Vererbungstheorien dienen, da Unterschiede in den Chromosomenmustern sich auch im Phänotyp des Individuums ausprägen. Die meisten Heterochromatin-Zonen scheinen keine aktiven Gene zu repräsentieren und nicht an der Weitergabe genetischer

Informationen beteiligt zu sein. Solche Zonen lassen sich gut anfärben und weisen demnach einen hohen Proteingehalt auf^[2, 3]. Treten an den Riesenchromosomen sichtbare lokale Modifikationen auf, so ist diese sogenannte „Puff“-Bildung Ausdruck erhöhter biologischer Aktivität der betroffenen Zonen, die mit einer verstärkten RNA- und Proteinsynthese verbunden ist (Abb. 2).

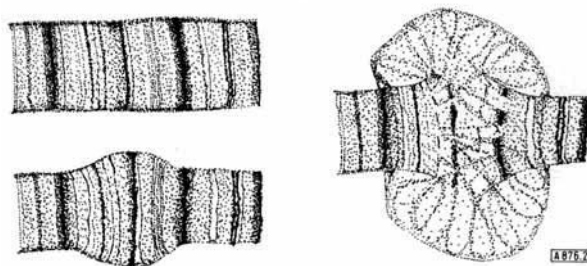


Abb. 2. Bildung eines Puffs (rechts) an Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsen von Dipterenlarven.

2. Struktur der Chromosomen

Die faserige Feinstruktur der Metaphase-Chromosomen ließ vermuten, daß unterschiedlich dicke Nucleohistonsfasern an deren Aufbau beteiligt sind. Der variierenden Dimensionen dieser Fasern versuchen mehrere Theorien gerecht zu werden. Ris^[4] entwickelte die Ansicht, daß ein Chromosom aus vier parallel angeordneten DNA-Doppelhelices besteht, die mit Histonen beladen und lose umeinander gewunden sind. Dabei bilden entsprechend der Multistrang-Hypothese zwei derartige Nucleohistonsfasern mit einem Durchmesser von 40 Å eine chromosomale Unter-einheit von 100 Å Dicke. Die Verknäuelung von zwei solchen Einheiten führt dann zu Chromosomen mit einem ungefähren Durchmesser von 200–250 Å. Diese Vorstellung wurde vor allem durch Untersuchungen über die besondere Anordnung der DNA in den Spermatozoenkernen gestützt. Nach Röntgen-Beugungsuntersuchungen sind in den intakten Spermatozoenköpfen die Nucleoprotaminfasern tatsächlich in dichtester Packung parallel angeordnet und bilden eine Struktur mit speziellen optischen Eigenschaften für polarisiertes Licht: Sie zeigen eine negative Doppelbrechung^[5].

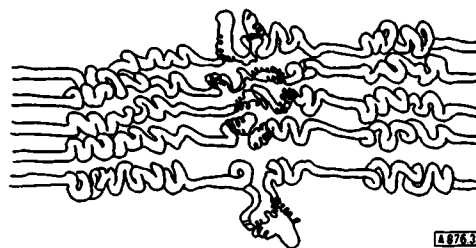


Abb. 3. Parallele Anordnung von Nucleohistonsfasern mit partieller Aufzwirnung der DNA-Doppelhelices.

Nach unseren bisherigen Erkenntnissen muß auch für die Riesenchromosomen der Dipterenlarven eine parallele Anordnung von ungefähr 1000–4000 Nucleohistonsfasern mit einem Durchmesser von jeweils 200–300 Å angenom-

men werden. Jede Faser repräsentiert dabei ein Chromatid, das sich von einem Ende des Riesenchromosoms zum andern erstreckt, wobei starke Knäuelung mit mehr oder weniger gestreckten Strukturen abwechselt (Abb. 3). Diese Untereinheiten der Riesenchromosomen entsprechen völlig den Nucleohistonstrukturen der Metaphase-Chromosomen in diploiden Zellen.

Die Einstrang-Hypothese geht davon aus, daß ein Chromosom durch eine einzige DNA-Doppelhelix repräsentiert wird, die mit Histonen und sauren Proteinen beladen und so gefaltet oder geknäuel ist, daß der Durchmesser des Chromosoms 200–500 Å beträgt. Eine solche Anordnung begünstigt die von *Watson* und *Crick*^[6] vorgeschlagene semi-konservative Replikation der DNA^[*], bei der je ein Strang der DNA-Doppelhelix während der mitotischen Teilung auf die beiden Tochterzellen übergeht.

Taylor^[7] glaubte aufgrund seiner Untersuchungen annehmen zu können, daß das Chromosom aus einem makromolekularen Band quergelegter kurzer DNA-Helices besteht, die alternierend in ihren beiden Strängen über Proteinbrücken („linker“) verknüpft sind. Solche Proteine mit strukturerhaltender Funktion konnten allerdings bis heute nicht nachgewiesen werden (Abb. 4). Gegen diese Vorstellung sprechen weiterhin die vergeblichen Versuche, Chromosomen mit protein-spaltenden Enzymen abzubauen^[8].

Das Verhalten der Metaphasen-Chromosomen während der Zellteilung läßt vermuten, daß interchromosomale Brücken existieren, die die Anordnung einiger oder aller Chromosomen in der Metaphase-Platte bestimmen (siehe Abb. 1). So sind bei einigen Tierspezies alle Chromosomen während der Zellteilung als Ring in der Äquatorebene der Zelle angeordnet, was die Vorstellung stützt, daß mehrere Chromosomen einer einzigen DNA-Doppelhelix zugeordnet werden müssen und die interchromosomalen Brücken nur besondere Nucleotidsequenzen des gleichen DNA-Moleküls sind^[9].

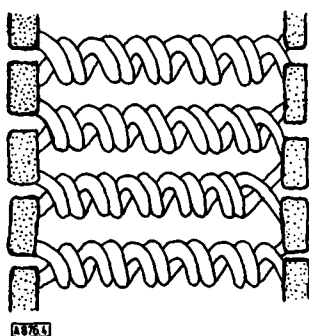


Abb. 4. Taylors Modell der Verknüpfung von DNA-Doppelhelices durch Proteinbrücken („linker“) [7].

Ebenfalls für die Einstrang-Hypothese sprechen die Untersuchungen an den Lampenbürsten-Chromosomen, die in Oocyten^[**] von Amphibien und anderen Vertebraten nachgewiesen werden konnten. Da es sich um diploide Zellen handelt, bestehen die Chromosomen aus zwei Chromati-

den, die teilweise stark gestreckt sind und paarige DNA-Schlaufen ausbilden. Diese Schlaufen gehen von den beiden Chromatiden aus und scheinen bestimmten Genen zu entsprechen, da sich an diesen Nucleotidsequenzen eine intensive RNA- und Proteinsynthese nachweisen läßt^[10].

Aufgrund ihrer Untersuchungen an Lampenbürsten-Chromosomen entwickelten *Gall* und *Callan*^[11] die Hypothese von den „master“- und „slave“-Genen. Um die Diskrepanz zwischen der Größe solcher DNA-Schlaufen und der möglichen räumlichen Ausdehnung eines Gens mit begrenzter Nucleotidsequenz zu überbrücken, nahmen sie an, daß die Schlaufen aus vielen mehr oder minder fehlerfreien Wiederholungen der gleichen Sequenz bestehen. Das master-Gen wird dabei nicht wie die slave-Gene als Matrize für die RNA-Synthese herangezogen.

Die Existenz eines einzigen master-Gen stimmt mit der Vorstellung der klassischen Genetik überein, daß nur ein einziges Gen für eine biologische Leistung vorgesehen ist. Nach *Beermanns* Theorie über die „operative Gliederung“ der Chromosomen wird die RNA dagegen am master-Gen synthetisiert, während die slave-Gene nur der Bindung und Stabilisierung solcher RNA-Moleküle dienen^[12].

Derartige repetierende Sequenzen konnten mit der Spiegelmannschen Hybridisierungstechnik in der DNA aller höheren Organismen nachgewiesen werden^[13–17]. Die Kopien sind dabei oft unvollständig, so daß Gruppen mit repetierenden Sequenzen entstehen, die nicht mehr mit dem Original übereinstimmen. Noch weiß man nicht, ob solche repetierenden Sequenzen vollständige Gene oder nur Teile davon sind, denen eine spezielle regulatorische Funktion zugeschrieben werden kann.

3. Chemische Zusammensetzung der Nucleohistone

Durch saure Extraktion können aus dem chromosomalen Nucleohiston mehrere Histonfraktionen und Teile der sauren Proteine entfernt und mit Äthanol gefällt werden. Ein spezifisches Extraktionsverfahren zur Gewinnung der einzelnen Histonfraktionen wurde von *Johns*^[18] entwickelt; allerdings sind mit dieser Methode die Histone nicht rein darstellbar. Man erhält in den meisten Fällen Gemische mit ähnlichen Fraktionen, die in wäßrigen Lösungen eine ausgeprägte Neigung zur Aggregation zeigen. Die präparierten Fraktionen werden nach ihrem charakteristischen Aminosäuregehalt und den N-terminalen Gruppen unterschieden und eingeteilt (Tabelle 1). Die Elutionsfolge bei der späteren säulenchromatographischen Fraktionierung diente zur Numerierung der Histonfraktionen (I bis IV); Zusatzsymbole unterscheiden die Unterfraktionen wie im Falle des Histons I mit den Fraktionen Ia und Ib oder des Histons II, das in die Unterfraktionen IIa, IIb₁ und IIb₂ aufgetrennt werden kann^[19].

Die lysinreiche Histonfraktion I wurde von *Peacocke*^[20] näher untersucht; das Molekulargewicht der relativ monodispersen Fraktion bestimmte er zu 20000. *Kinkade* und *Cole*^[21] trennten die gleiche Histonfraktion an Amberlite-CG-50-Säulen in vier Unterfraktionen auf, bei denen es sich in Anbetracht der Peacockeschen Ergebnisse um Modifikationen mit anderer Aminosäurezusammensetzung

[*] Bei der semi-konservativen Replikation der DNA werden gleichzeitig beide Stränge der Doppelhelix kopiert.

[**] Oocyten sind Vorläufer der Eizellen.

handeln muß. Die argininreiche Fraktion IIb mit acetyliertem Alanin oder Prolin als endständige Aminosäure trennte Johns^[22] an Carboxymethylcellulose in fünf Unterfraktionen auf, von denen drei durch eine abweichende Aminosäurezusammensetzung hervortreten.

Tabelle 1. Aminosäurezusammensetzung von Histonfraktionen in Mol-%. F₁: sehr lysinreiche Fraktion; F_{2a}, F_{2b}: leicht lysinreiche Fraktion; F₃, F₄: argininreiche Fraktion.

| Aminosäure | F I | F IIa | F IIb | F III | F IV |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------------|--------------|--------------|
| Alanin | 23.5 | 10.5 | 10.5 | 12.5 | 6.9 |
| Arginin | 2.5 | 11.5 | 7.5 | 13.0 | 13.7 |
| Asparaginsäure | 2.8 | 6.0 | 5.5 | 5.0 | 4.9 |
| Glutaminsäure | 6.0 | 8.5 | 9.0 | 11.0 | 5.9 |
| Glycin | 6.8 | 12.5 | 7.0 | 6.5 | 16.7 |
| Histidin | 0.5 | 2.0 | 2.5 | 2.1 | 2.0 |
| Isoleucin | 1.6 | 4.5 | 5.0 | 5.0 | 6.0 |
| Leucin | 4.4 | 10.5 | 6.0 | 8.5 | 7.0 |
| Lysin | 26.3 | 10.5 | 14.5 | 9.0 | 11.0 |
| Methionin | — | — | 0.7 | 0.7 | 2.0 |
| Phenylalanin | 0.8 | 1.6 | 2.0 | 2.5 | 2.0 |
| Prolin | 7.9 | 3.0 | 4.5 | 4.5 | 0.9 |
| Serin | 6.2 | 3.1 | 9.0 | 7.0 | 2.0 |
| Threonin | 5.5 | 5.6 | 6.5 | 7.0 | 7.0 |
| Tyrosin | 0.5 | 3.0 | 3.1 | 2.0 | 3.9 |
| Valin | 5.0 | 7.0 | 6.8 | 6.0 | 8.8 |
| N-terminaler Rest | 100.3 Acetyl | 101.8 Acetyl | 100.1 Prolin oder Alanin | 102.3 Alanin | 100.7 Acetyl |

Solche Beobachtungen werfen die berechnete Frage auf, ob es sich bei diesen Unterfraktionen tatsächlich um nucleare Histone und nicht um Komplexe von Artefakten mit Verunreinigungen handelt^[23, 24]. Stellwagen^[25] wies solche cytoplasmatischen Verunreinigungen in Histonfraktionen nach, die aus gereinigten Zellkernen extrahiert wurden, und Johns^[26] untersuchte die Bindung saurer Proteine des Cytoplasmas an das chromosomale Nucleohiston.

Bonner et al.^[27] gelang es trotz dieser Schwierigkeiten, die Aminosäuresequenz des argininreichen Histons IV aus Bohnenkeimlingen und Kalbsthymuszellen aufzuklären. Übereinstimmend mit Stellwagen^[28] und Ogawa^[29] konnten sie zeigen, daß die Lysinreste ungleichmäßig über das Molekül verteilt sind und sich am Aminoende häufen. Am C-terminalen Ende befinden sich dagegen die sauren Aminosäuren und die neutralen mit ihren hydrophoben Seitenketten^[30] (Abb. 5). Überraschenderweise haben die beiden untersuchten Histone bis auf 2 von 102 Aminosäuren die gleiche Aminosäuresequenz, und außerdem treten bestimmte Peptidfolgen, in denen lediglich eine Aminosäure ausgetauscht ist, gehäuft auf. Diese Tatsache läßt vermuten, daß das Histon-IV-Gen möglicherweise aus repetierenden Sequenzen entstanden ist.

Eine asymmetrische Verteilung der basischen Aminosäuren wurde auch für das Histon IIb und eine Unterfraktion von F I nachgewiesen^[31, 32]. Die besondere Anordnung positiver Ladungsträger entlang der Histonmoleküle eröffnet neue Aspekte für unser Verständnis der Wechselwirkungen zwischen nuclearen basischen Proteinen und der DNA (Abschnitt 8).

Inwieweit die Konformation der Histone oder ihrer Derivate zur Komplexbildung mit der DNA beiträgt, läßt sich

aufgrund unserer bisher lückenhaften Kenntnisse nicht mit Sicherheit sagen^[33]. Für das isolierte lysinreiche Histon I wurde in Äthylchlorhydrin ein Anteil an helicaler Struktur von 46% gefunden; bei den Fraktionen IIa und IIb sind es 65–70%^[34]. Für wäßrige Lösungen werden dagegen Werte von 20% angegeben, die allerdings mit der Konzentration der Histone und dem Alter der Lösungen stark schwanken^[35].

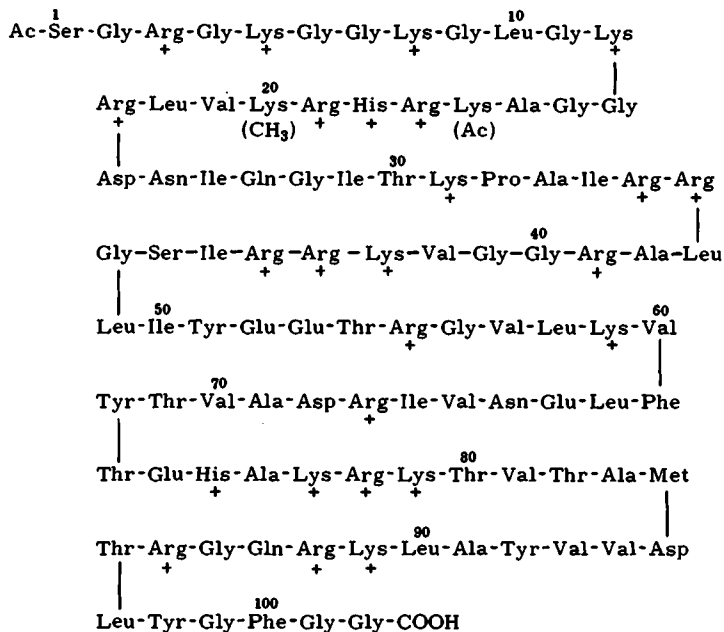


Abb. 5. Aminosäuresequenz der Histonfraktion IV [23]. Die basischen Aminosäuren sind angekreuzt.

Zubay und Doty^[36] schließen aus ihren ORD-Untersuchungen, daß die Hälfte der DNA-gebundenen Histone in der α -Konfiguration vorliegt. Nach Wilkins Vorstellung über den räumlichen Aufbau des chromosomalen Nucleohistons ist es vor allem die α -Helix-Konfiguration, die die

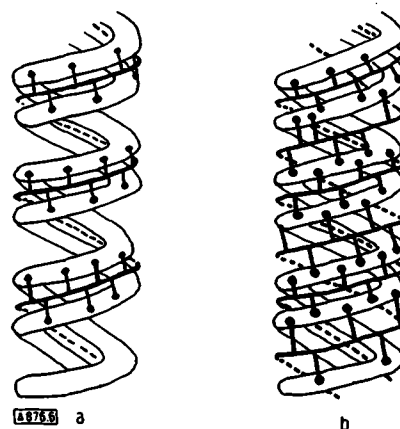


Abb. 6. a) Bindung von Protamin in den schmalen Furchen der DNA-Doppelhelix. b) Bindung von Histonen in den tiefen Furchen der DNA-Doppelhelix [37].

Bindung der Histone in der tiefen Furche der DNA-Doppelhelices erlaubt (Abb. 6)^[37]. Allerdings würde das voraussetzen, daß die Ladungen entlang des Histonmoleküls gleichmäßig verteilt sind, was zumindest für die Histone

IIb und IV ausgeschlossen werden muß. Dagegen muß erwogen werden, ob nicht Acetylierungs-, Phosphorylierungs- oder Methylierungsreaktionen dazu beitragen, sowohl Struktur als auch Funktion der Histone zu differenzieren. *Stocken*^[38] konnte zumindest an regenerierenden Rattenlebern eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Phosphorylierung des Histons I und dessen biologischer Aktivität für die RNA-Synthese nachweisen. Demgegenüber scheinen Acetylierungsreaktionen bevorzugt an den argininreichen Histonen IIb und III abzulaufen^[39, 40]. Da die biologische Aktivität für die RNA- und DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber innerhalb von 1 bis 2 Stunden ihr Maximum erreicht, wird die schnellere Histonacetylierung als erster Schritt der Genaktivierung aufgefaßt. Der Methylierungsschritt folgt erst relativ spät, wenn DNA- und Histonsynthese ihr Maximum überschritten haben. Ganz offensichtlich hat eine solche Reaktion nichts mit Regulationsvorgängen zu tun, kann aber mit einem möglichen Transport neu synthetisierter Histone vom Cytoplasma zu den Zellkernen zusammenhängen.

4. Stoffwechsel der Histone

Robbins und Borun^[41] fanden genügend Hinweise, daß zumindest in HeLa-Zellen^[*] argininreiches Histon im Cytoplasma synthetisiert und später zum Zellkern transportiert wird. Gleiche Ergebnisse liegen für die Synthese des Protamins in Lachs-Testis vor^[42]. Während der cytoplasmatischen Histonsynthese kann eine bestimmte Form kleinerer Polysomen im Cytoplasma nachgewiesen werden, die sich nach der Zellteilung wieder auflösen^[43]. Sie scheinen die Orte der cytoplasmatischen Histonsynthese zu sein, denn sie enthalten für diesen Zweck eine spezifische RNA mit Sedimentationswerten von 7–9 S, die als messenger-RNA für die Histone IIa, IIb und III angesehen wird. Darüber hinaus ist diese RNA nur während der Histonsynthese mit den spezifischen Polysomen verbunden.

Im Gegensatz dazu war es *Reid und Cole*^[44] möglich, in isolierten Thymuszellkernen die Synthese des argininreichen Histons III nachzuweisen. Im Zusammenhang damit sind die Untersuchungen von *Birnstiel und Flamm*^[45] interessant, die die Orte der nuclearen Proteinsynthese näher untersuchten. Nach Pulsmarkierung von Bohnenkeimlingen und Tabakzellkulturen fraktionierten sie die zellulären Komponenten und bestimmten deren Gehalt an markierten Aminosäuren. In beiden Zellarten enthielten die Nucleoli^[**] den überwiegenden Anteil an eingebauten Aminosäuren, was den Schluß zuläßt, daß die Histonsynthese hauptsächlich in diesen zellulären Partikeln abläuft. Wir wissen aber seit langem, daß in den Nucleoli ebenfalls die Synthese ribosomaler Proteine stattfindet. So war es von entscheidender Bedeutung, daß einige der neu synthetisierten Proteine als Histone charakterisiert werden konnten.

[*] HeLa-Zellen sind epitheliale menschliche Krebszellen, die sich in Zellkulturen vermehren lassen. Sie wurden 1953 von der Patientin Helen Lane gewonnen.

[**] Als Nucleoli bezeichnet man sphärische Strukturen im Inneren des Zellkernes, die vor allem ribosomale RNA synthetisieren und mit einem spezifischen chromosomalen Segment, dem nucleolaren Organisator, verbunden sind.

Der Zusammenhang zwischen nuclearer und cytoplasmatischer Histonsynthese wird verständlicher, wenn man berücksichtigt, daß auch für die nucleare Histonsynthese eine 9S-RNA als messenger nachgewiesen werden konnte. In Übereinstimmung mit den hauptsächlich vorkommenden Histonfraktionen läßt sie sich in drei Untereinheiten auf trennen^[46]. Da repetierende Nucleotidsequenzen 20 bis 80% der nuclearen DNA ausmachen können, ist es nicht zu überraschend, daß auch die Histon-Gene derartige Bauelemente enthalten, die gehäuft in den Chromosomen vorkommen^[47].

Allfrey et al.^[48] glauben Hinweise gefunden zu haben, daß *N*-Acetyl-seryl-tRNA eine Rolle bei der Initiierung der Synthese des Histons IIa spielt. Diese Möglichkeit ist nicht auszuschließen, da auch die Synthese des Ovalbumins^[49] und des Hämoglobins^[50] durch acetylierte Seryl-tRNA gestartet wird.

In sich teilenden Zellen mit Chromosomenreplikation ist die Histonsynthese zeitlich eng an die DNA-Synthese gekoppelt. Wird die DNA-Synthese durch Inhibitoren blockiert, so wird gleichzeitig die Synthese der lysinreichen Histone zum Erliegen gebracht, während argininreiches Histon unabhängig von diesen Vorgängen in den Zellen gebildet wird^[51].

5. Saure nucleare Proteine

Stedmans und Stedmans Beobachtungen^[52] legten die Grundlage für die heute geltende Auffassung, daß die sauren Proteine entscheidend bei der Regulation der biologischen Aktivität der chromosomalen Nucleohistone beteiligt sind. Diese Auffassung ist in den letzten Jahren mehrfach angezweifelt worden, und für die Regulation der Genaktivität wurden häufiger bestimmte Histonfraktionen als verantwortlich angesehen. Aber die unbestreitbar hohe Konzentration der sauren Proteine im Zellkern und ihr enormer Stoffwechselumsatz im Vergleich zu dem der fast inerten Histone weisen auf deren regulative Funktion hin, die bis heute noch nicht vollständig erfaßt werden konnte. Die Isolierung und quantitative Bestimmung der sauren Proteine ist methodisch relativ schwierig, da sie zum Teil bei der Extraktion der Histone mit in Lösung gehen.

Busch et al.^[53] extrahierten die sauren Proteine mit verdünnten alkalischen Lösungen, was den Nachteil hat, daß ein Teil der Proteine irreversibel denaturiert wird. Um diesen Nachteil zu umgehen, führte *Wang*^[54] das Extraktionsverfahren mit Desoxycholat ein, das später von *Bonner*^[55] übernommen und verfeinert wurde. Ein anderer, durchaus gleichwertiger Weg ist die Extraktion der gesamten Proteine entweder mit Natrium-dodecylsulfat^[56] oder NaCl und anschließende Fraktionierung an Agarose^[57].

Mit Detergentien extrahierte saure Proteine lassen sich an DEAE-Cellulose-Säulen in mehrere Unterfraktionen auf trennen, die alle mehr oder weniger heterogen sind^[58]. Die Ursache dafür mag in ihrem hohen Gehalt an Lipo- und Phosphoproteinen zu suchen sein, deren Existenz im Zellkern mehrfach nachgewiesen wurde^[59, 60]. Darüber hinaus neigen besonders die sauren Proteine zur Komplexbildung mit basischen Proteinen, was ihre Isolierung und Bestim-

mung weiterhin wesentlich erschwert. Alle diese Gründe erklären auch, warum die Untersuchungen zu ihrer Funktion und metabolischen Aktivität so spärlich sind und es für die einzelnen Fraktionen kaum vergleichbare Daten gibt.

Wang^[61] untersuchte die metabolische Aktivität isolierter Kerne in dem von Allfrey^[62] angegebenen zellfreien System. Solche Kerne sind biologisch funktionsfähige Partikel, die zwischen 40 bis 50% Proteine, nahezu die gleiche Menge DNA und 1–2% RNA enthalten^[63]. Nach Wangs Ergebnissen treten besonders die nuclearen Ribosomen und die Residualpartikel (Komplexe zwischen sauren Proteinen und RNA) durch ihre hohe metabolische Aktivität hervor.

Steele und Busch^[64] verglichen die metabolische Aktivität von normalen Zellkernen mit der von Walker-Tumorzellen, die sie stufenweise mit Lösungen steigender Salzkonzentration extrahierten. Die auf diese Weise aus den Kernen der Tumorzellen isolierten Histonfraktionen nehmen einen höheren Anteil an markierten Aminosäuren als die sauren Proteine auf.

Diese Beobachtung kann als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß den nuclearen Proteinen eine regulatorische Funktion zugeschrieben werden muß. Neuere Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß die sauren Proteine als Gegenspieler zur Inhibitorfunktion der Histone in die Transkription eingreifen^[65, 66]. Dabei scheinen Phosphorylierungsvorgänge die Wechselwirkungen zwischen sauren Phosphoproteinen, DNA und RNA-Polymerase zu kontrollieren. Außerdem besteht eine direkte Beziehung zwischen einer stimulierten RNA-Synthese durch Hydrocortison und Östradiol und einer gesteigerten Synthese gewisser saurer Proteine^[67, 68].

6. Histon-gebundene nucleare RNA

Huang und Bonner^[69] machten als erste die erstaunliche Beobachtung, daß ein spezifischer RNA/Histon-Komplex im Chromatin vorkommt. Aus dem Basen- und dem Phosphorgehalt der isolierten RNA schlossen die Autoren auf eine Molekülgröße von 40 Nucleotiden. Diese „cRNA“ soll nach ihrer Vorstellung mit 15–20 Histonmolekülen einen Komplex bilden, der als Nucleohiston-Untereinheit betrachtet werden kann.

Tabelle 2. Protein/DNA-Relation in Nucleohiston aus verschiedenen Geweben (nach [108]).

| Gewebe | DNA | Histon | andere Proteine | RNA |
|-------------------------|------|--------|-----------------|-------|
| Rattenleber | 1.00 | 1.00 | 0.67 | 0.043 |
| Ratten-Ascites-Tumor | 1.00 | 1.16 | 1.00 | 0.13 |
| HeLa-Zellen | 1.00 | 1.02 | 0.71 | 0.09 |
| Kalbsthymus | 1.00 | 1.14 | 0.33 | 0.007 |
| Seeigelblastula | 1.00 | 1.04 | 0.48 | 0.039 |
| Bohnenkeimlinge (Achse) | 1.00 | 1.03 | 0.29 | 0.26 |

Da ungefähr ein bis zwei RNA-Moleküle pro Gen vorkommen, könnte diese RNA an der Genregulierung beteiligt sein (Tabelle 2).

Ähnliche RNA/Histon-Komplexe konnten auch in Mammalierzellen nachgewiesen werden: in Rattenleberzellen^[70], KB-Zellen^[71], Novikoff-Hepatomzellen^[72] und Kalbsthymuszellen^[73]. Bonners Gruppe gelang es etwas später, diese spezifische RNA aus Ratten-Asciteszellen und embryonalem Hühnergewebe darzustellen^[74]. Alle Ergebnisse sprechen dafür, daß eine solche spezifische cRNA existiert, die hauptsächlich in den Chromosomen zu finden ist und sich von cytoplasmatischer RNA vor allem durch ihren hohen Uracilgehalt unterscheidet. Allerdings treten bestimmte Zweifel an der Existenz einer solchen spezifischen RNA auf, nachdem von Heyden und Zachau^[75] nachweisen konnten, daß kurzkettige RNA-Fragmente durch die Einwirkung von Nucleasen auf tRNA im nuclearen Material gebildet werden können.

7. Dissoziation und Rekonstitution des Nucleohiston-Komplexes

Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit den Strukturänderungen der DNA unter dem Einfluß gebundener Proteine und mit der Komplexbildung im allgemeinen. Offensichtlich liegt aber im nativen Nucleohiston ein so vielgestaltiger Komplex vor, daß eine Rekonstitution durch Addition der Bestandteile nur schwerlich einen Zustand mit gleicher biologischer Aktivität wiederherzustellen vermag: Die sauren Proteine bilden mit den Histonen Komplexe; beide Proteine können sowohl mit der DNA als auch mit der RNA reagieren, und außerdem vermag die DNA mit sequenzanaloger RNA zu hybridisieren. Der stufenweise Abbau des chromosomalen Nucleohistons und die Verfolgung der biologischen Aktivität scheint deshalb ein mindestens gleichwertiger Weg zur Untersuchung des chromosomalen Materials zu sein.

Im nativen Nucleohiston sind die Histone und sauren Proteine elektrostatisch an die DNA gebunden. Obwohl die positiven Ladungen der basischen Aminosäurereste nicht gleichmäßig über die Histonmoleküle verteilt sind, erbrachten neue experimentelle Hinweise durch Olins^[76], daß in Übereinstimmung mit Wilkins Modell^[37] die lysinreichen Histone entlang der tiefen Furche der DNA-Doppelhelix gefunden werden. Ob aber die Histone intermolekulare Quervernetzungen bilden oder aber zur dreidimensionalen Strukturierung in Form von Superknäuelungen beitragen^[77–79], ist bis heute nicht entschieden (Abb. 7).



Abb. 7. Modell der Superknäuelung von langen DNA-Doppelhelices mit stabilisierenden Proteinbrücken.

Luzzati und Nicolaieff^[80] fanden Anhaltspunkte dafür, daß die Nucleohistonstruktur aus Bündeln von vier DNA-Helices mit den umgebenden Histonen aufgebaut ist, wäh-

rend das Nucleoprotamin mehr zu einer konzentrischen Anordnung mit Wasser und Protamin in den Zwischenräumen neigt. Rekonstituierungsversuche an Nucleohiston zeigen nun, daß selbst nach weitgehender Dissoziation des Komplexes in 3.5 M Salzlösungen durch anschließende Dialyse gegen Wasser der native Komplex zurückgebildet werden kann^[81]. Entweder sind in diesem Falle ordnend wirkende Strukturelemente erhalten geblieben, oder aber diese Dissoziationsphänomene sind als solche reversibel.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von vorextrahierten Nucleohiston lassen erkennen, daß die sukzessive Entfernung der Histone bei unterschiedlicher Ionenstärke zur Ausbildung von DNA-Schleifen führt, die sich um einen strukturerhaltenden DNA/Protein-Komplex gruppieren^[82, 83]. Möglicherweise ist dieser Komplex eine native Substruktur der Chromosomen, so wie Bonner vermutete und wie sie bei den Lampenbürsten-Chromosomen beschrieben wurden^[84]. Hier könnte auch die Ursache dafür zu finden sein, daß eine Reassoziierung selbst nach fast vollständiger Dissoziation noch möglich ist. Allfrey und Mirsky^[85] zeigten an Thymus-Zellkernen, daß vor allem die Extraktion des lysinreichen Histons I zur reversiblen Ausbildung solcher DNA-Schleifen führt, während die Entfernung der argininreichen Histone III und IV eine irreversible Auflockerung der Gesamtstruktur zur Folge hat. Die Autoren schließen daraus, daß das argininreiche Histon die Nucleohistonfibrillen quervernetzt, während das lysinreiche Histon zu einer kompakteren Chromosomenstruktur beiträgt.

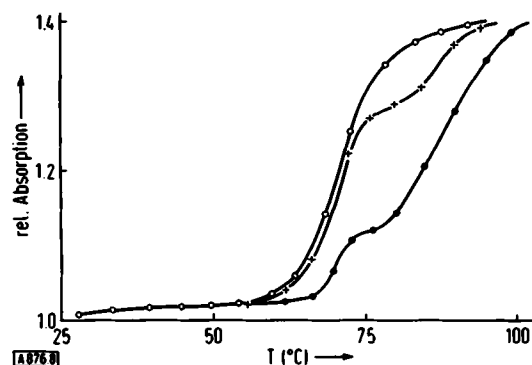


Abb. 8. Profil der thermischen Denaturierung von DNA (—○—○—), von partiell extrahiertem Nucleohiston (—△—△—) und von intaktem Nucleohiston (—●—●—).

Grundlegende Untersuchungen über die Abhängigkeit der Nucleohistonstruktur von den gebundenen Histonfraktionen führte Murray^[86] durch. Bei Erniedrigung des pH-Wertes der Lösung werden schrittweise die Histonfraktionen aus dem Komplex entfernt, wobei die lysinreiche Fraktion am längsten haftenbleibt. Mit dem abnehmenden Histongehalt werden die T_m -Werte der thermischen Denaturierung solcher Restkomplexe zu niedrigeren Temperaturen verschoben (Abb. 8). Da die Histone mit einem mittleren Molekulargewicht von 10000–50000 wesentlich kleiner sind als die DNA und das native chromosomale Nucleohiston ungefähr 50 bis 60% Protein enthält, müssen mehrere Histone mit einem DNA-Molekül verbunden sein.

Für die Verteilung der unterschiedlichen Histone am DNA-Molekül lassen sich zwei extreme Anordnungen ableiten:

Entweder gibt es längere Nucleotidsequenzen mit gleichen Histonmolekülen, oder es sind niemals zwei gleiche Histonmoleküle einander benachbart. Eine schrittweise Extraktion der Histone muß daher beim ersten Bindungstyp zu einer Mischung von proteinfreier DNA mit nativen Nucleohistonmolekülen führen, während beim zweiten Bindungstyp nur partiell deproteinierte Moleküle vorliegen dürften. Nach Murrays Ergebnissen^[86] enthielten die Extrakte in allen Fällen einen DNA/Protein-Komplex mit höheren T_m -Werten als proteinfreie DNA. Außerdem war die Aktivität dieser Komplexe als Matrize für die RNA-Synthese noch signifikant erniedrigt.

Nach diesen Ergebnissen muß angenommen werden, daß stets ungleiche Histonmoleküle einander benachbart sind. Peacockes Untersuchungen^[87] über den Einfluß hoher Salzkonzentrationen auf die Konformation der chromosomalen Nucleohistone stützen diese Vorstellung. Mit steigenden Salzkonzentrationen fällt das Molekulargewicht dieser Komplexe auf 25% des Normalwertes, obgleich der Radius der DNA-Helix sich nicht ändert. Offensichtlich tragen die Histone weniger zur räumlichen Strukturierung der Nucleohistone bei als bisher angenommen wurde, und die Stabilität der Faltungen und Knäuelungen wird überwiegend durch Wasserstoffbrücken garantiert.

In 4 M Harnstofflösungen zeigen die Nucleohistone einen Anstieg der Viskosität^[88]. Da bei Sedimentationsversuchen im gleichen Solvens nur 2% der Proteine in Lösung gehen und die Hyperchromie der thermischen Denaturierung noch 38% beträgt, könnte diese reversible Längenänderung auf die Aufhebung einer Superknäuelung zurückzuführen sein. Zubay und Doty^[36] hatten eine derartige Tertiärstruktur aufgrund von hydrodynamischen Messungen und Lichtstreuungs-Untersuchungen vermutet. Nach Röntgenbeugungsdiagrammen müßte der Durchmesser einer solchen Wendel 120 Å betragen^[89, 90].

8. Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen

Die bis heute vorliegenden Ergebnisse zur Struktur der chromosomalen Nucleohistone erlauben nur eine grobe Abschätzung der komplizierten Bindungsverhältnisse. Aufgrund von Lichtstreuungs- und Sedimentationsanalysen an DNA-Komplexen mit arginin- und lysinreichen Histonen folgern Touvet und Champagne^[91], daß das lysinreiche Histon spezifisch, aber nichtionisch an definierte Bindungsplätze der DNA gebunden wird, wobei das DNA-Molekül eine Längenausdehnung erfährt. Demgegenüber soll das gebundene argininreiche Histon eine Kontraktion der Struktur verursachen.

Die bevorzugte Bindung von Histonen oder homogenen Polypeptiden an definierte Nucleotidsequenzen wurde von Chargaff^[92] und Lucy^[93] erstmals experimentell untersucht. Felsenfeld et al.^[94] führten diese Untersuchungen systematisch fort, und nach ihren Ergebnissen reagiert Polylysin kooperativ mit adenin(A)- und thymine(T)-reichen Sequenzen, während Polyarginin bevorzugt mit cytosin(C)- und guanin(G)-reicher DNA Komplexe bildet. Felsenfeld beschreibt diese Reaktion als selektiv, reversibel, kooperativ und stöchiometrisch; als Endprodukt müssen gleichgroße, micellenartige Partikeln mit 1700 Å Durch-

messer angesehen werden^[93]. Allerdings ist die Spezifität der Arginin/DNA-Wechselwirkung nur dann voll ausgeprägt, wenn der Anteil dieser Aminosäure über 60% liegt, was nur für die Protamine als natürliche Bindungspartner der DNA zutrifft. ORD-Spektren synthetischer Komplexe lassen erkennen, daß die Wechselwirkungen zwischen Polylysin und DNA die DNA-Konformation stabilisieren^[96, 97]. Diese Strukturänderungen sind entweder auf eine Verkürzung der DNA-Helices oder auf eine Superknäuelung zurückzuführen.

Leider lassen sich diese Ergebnisse nicht durch die Bestimmung der Bindungsparameter zwischen den einzelnen Reaktanden absichern^[98]. Während Pyrimidinbasen fast keine individuellen Unterschiede gegenüber Polypeptiden erkennen lassen, ist bei Purinen das Gegenteil der Fall. Polyarginin und Polylysin zeigen aber eine etwas erhöhte Affinität für CG-reiche Polynucleotide^[99]. Die Komplexbildung wird jedoch durch Natrium-Ionen stark inhibiert, die offensichtlich mit den ϵ -Aminogruppen der Lysinreste um die Ladungsträger der DNA konkurrieren^[100]. Da Natrium-Ionen und bivalente Erdalkalimetall-Ionen bevorzugt mit AU- und AT-reichen Polymeren reagieren, könnten solche Konkurrenzwirkungen eine Verlagerung basischer Proteine zu CG-reichen Sequenzen bedingen und so in den Vorgang der Genregulierung eingreifen.

Ähnlich in der Wirkung, nur wesentlich effektiver als divalente Kationen, reagieren aliphatische Polyamine wie Spermin und Spermidin, deren Spezifität für AT-reiche Sequenzen aber angezweifelt wird^[101–104].

Ihre Bindung ist nicht kooperativ und reversibel, denn die Profile der thermischen Denaturierung sind monophasisch. Ebenso verhalten sich kurzkettige Polypeptide wie Tetraarginin und -lysin, während das Octalysin schon bestimmte Nucleotidsequenzen vorzieht.

Einen Übergang zwischen kooperativer Bindung und Gleichgewichtsreaktion findet man beim DNA/Protamin-Komplex. Die Profile der thermischen Denaturierung sind entsprechend der kooperativen Bindung biphasisch, und die T_m -Werte der gebildeten Komplexe sind zu höheren Temperaturen verschoben. Der erste T_m -Wert des Komplexes hängt bei gleicher DNA-Konzentration direkt von der zugesetzten Menge Protamin ab, was offensichtlich als Ausdruck einer Strukturspezifität und der besonderen Affinität zur DNA gewertet werden kann^[105].

9. Biologische Aktivität des chromosomalen Nucleohistons

Für die Untersuchungen spezifischer Wechselwirkungen zwischen DNA und Proteinen in nativen als auch reassozierten Nucleohistonen ist die Frage nach der biologischen Aktivität von besonderer Bedeutung. Natives chromosomales Nucleohiston enthält im allgemeinen RNA-Polymerase, DNA-Polymerase und Nucleosid-Triphosphatase; ihre spezifische Aktivität und Konzentration ändern sich mit dem Entwicklungszustand der Zelle. Sicherlich ist die DNA-Polymerase im Nucleohiston-Komplex der sich teilenden Zelle an die DNA gebunden, und auch RNA-Polymerase kann sowohl spezifisch als auch unspezifisch mit diesem Komplex assoziiert sein.

Die Untersuchungen über die Matrizeneigenschaft der Nucleohistone geben Auskunft darüber, welche Informationen durch die RNA-Polymerase transkribiert werden können. Für derartige Versuche verwendet man RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* und inkubiert steigende Mengen DNA oder Nucleohiston mit dem Enzym. Es läßt sich dadurch zeigen, daß am chromosomalen Nucleohiston ein Teil der Nucleotidsequenzen wahrscheinlich durch die gebundenen Proteine maskiert ist und weniger RNA an diesen Matrizen synthetisiert werden kann^[106, 107]. Außerdem ist die Fähigkeit der am Nucleohiston synthetisierten RNA, mit freier DNA zu hybridisieren, geringer im Vergleich zur RNA, die an proteinfreien DNA-Matrizen transkribiert wurde^[108]. Im Nucleohiston stehen demnach nicht nur eine begrenzte Anzahl von Informationen für die RNA-Synthese zur Verfügung, sondern auch die Transkription der „freien“ Sequenzen ist behindert, denn die an Nucleohistonen synthetisierten RNA-Moleküle sind wesentlich kleiner (Abb. 9)^[109, 110].

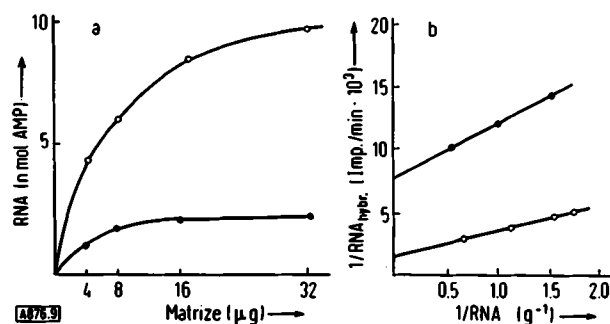


Abb. 9. a) RNA-Synthese an DNA- (—○—○—) und Nucleohistonmatrizen (—●—●—) mit *E. coli*-Polymerase. b) Hybridisierung der in vitro synthetisierten RNA von DNA- (—○—○—) und Nucleohistonmatrizen (—●—●—) (nach [130]).

Daß die Bindung der Proteine die biologische Aktivität des chromosomalen Nucleohistons einschränkt und verändert, konnten als erste Paul und Gilmour nachweisen^[111]. Die von ihnen aus Knochenmarks- und Kalbsthymuszellen dargestellten Nucleohistone enthielten zwar gewebsspezifische Sequenzen, die auch transkribiert werden konnten, aber sie repräsentierten nur 5–12% des Anteiles der freien DNA. Die an isolierten Nucleohistonen synthetisierte RNA enthält dabei keine Sequenzen, die nicht auch in vivo vorkommen würden. Diese Tatsache kann als Beweis dafür aufgefaßt werden, daß die angewendeten Extraktionsverfahren keine wesentlichen Konformationsänderungen hervorrufen.

Wird dagegen ein Teil der Histone durch 0.5–0.6 M Salzlösungen aus dem Komplex entfernt, so wird an diesen Matrizen eine RNA synthetisiert, deren Hybridisierungskapazität sprunghaft auf den Wert der an freier DNA synthetisierten RNA ansteigt^[106]. Da unter diesen Bedingungen nur das Histon I in Lösung geht und der größere Anteil der Proteine gebunden bleibt, scheint die Vorstellung von der Maskierung der DNA durch die gebundenen Proteine nicht mehr ausreichend. Es ist eher zu vermuten, daß bei der Extraktion mit 0.5–0.6 M Salzlösungen ein Repressor entfernt wird, der entweder die sterische Konformation oder die Aktivität der RNA-Polymerase direkt beeinflußt.

Diese Vorstellung wird durch die Tatsache stark gestützt, daß nur 50% der Nucleotidsequenzen im Nucleohiston mit Proteinen assoziiert sind^[112, 113].

Spelsberg und Hnilica^[114, 115] kommen in dieser Hinsicht zu widersprüchlichen Ergebnissen: Die selektive Extraktion des Histons I führte zu keinem Anstieg der biologischen Aktivität des partiell deproteinisierten Nucleohistons. Die Autoren vermuten, daß es sich vielmehr um eine Aktivierung des RNA-Synthesystems durch die gestiegene Salzkonzentration handelt. Selbst nach Entfernung aller Histone und eines Teils der sauren Proteine war die biologische Aktivität des extrahierten Nucleohistons immer noch wesentlich eingeschränkt.

Mit den heute bekannten Standardmethoden zur Transkription und Hybridisierung werden nur solche multiplen Gene erfaßt, die durch schnelle repetierende Synthese in genügendem Ausmaß transkribiert werden können. Es darf aber angenommen werden, daß gerade ihnen eine fundamentale Bedeutung zukommt, da ihre Aktivität dem Entwicklungszustand der Zelle entspricht. Ein Beispiel soll diese Tatsache erhellen: In Seeigel-Eiern kann eine RNA-Synthese schon im Vier-Zellen-Stadium nachgewiesen werden, während erst beim Übergang zur Gastrula diejenigen Cistronen spezifisch aktiviert werden, die die Synthese der ribosomalen RNA und tRNA gewährleisten^[116].

Für die allgemeineren Funktionen der Genrepression sind die Histone verantwortlich zu machen, da sie in fast jeder Zelle vorkommen und eine artenspezifische Aminosäuresequenz aufweisen. Ob dabei die arginin- oder lysinreichen Histone den Vorzug verdienen, läßt sich bis jetzt nicht experimentell nachweisen, da beiden Histonen eine gewisse Repressorwirkung zugeschrieben werden muß^[117, 118].

Johns und Hoare^[119] zeigen für dieses Problem eine Alternativlösung auf. Bei der Untersuchung von präzipitierenden DNA/Histon-Komplexen konnten sie nachweisen, daß mit steigendem Histonzusatz der Komplex teilweise wieder in Lösung geht und seine Matrizeneigenschaft wiedergewinnt. Unter diesen Umständen ist der repressori-sche Effekt der arginin- und lysinreichen Histone eine Frage der DNA/Histon-Relation und nicht so sehr der Spezifität.

Wahrscheinlich aber spielen bei der Genregulation vor allem die sauren Proteine eine Rolle, da in den aktiven Regionen des chromosomalen Nucleohistons der Gehalt an solchen Proteinen bei gleichbleibender Histonkonzentration ansteigt^[120-122]. Damit in Zusammenhang zu stehen scheinen *Pauls und Gilmours* Beobachtungen^[123], daß nur dann reassozierte Komplexe mit vergleichbarer biologischer Aktivität erhalten werden, wenn saure Proteine an der Reaktion beteiligt sind.

Die gewebsspezifischen Restriktionen der Nucleohistone als Matrice für die RNA-Synthese sind auf die Wirkung der sauren Proteine zurückzuführen^[124]. Die Wechselwirkungen zwischen DNA und diesen Proteinen scheinen außerordentlich kompliziert zu sein, da der Zusatz von sauren Proteinen zu einer Steigerung der RNA-Transkription an Nucleohistonmatrizen führt, wie *Wang* berichtete^[125].

In einem gewissen Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von *Bonnars* Arbeitskreis, der die Mitwirkung der chromosomalen RNA als integrierenden Bestandteil für die Re-

assoziierung der Nucleohistone voraussetzt^[126]. Die spezifischen RNA/Histon-Komplexe würden demnach nicht so sehr der Maskierung von bestimmten Nucleotidsequenzen dienen, sondern vor allem an der Genregulation beteiligt sein.

Für diese Vorstellung sprechen die Tatsachen, daß das gebundene Histon die Matrizeneigenschaft der DNA für die DNA-Polymerase nicht einschränkt^[127] und daß weiterhin die Wirkung der Histone auf die Aktivität der RNA-Polymerase weder zu ihrem charakteristischen Gehalt an Aminosäuren noch zum Ladungsmuster der Proteine in Beziehung steht.

Die von *Crick*^[128] kürzlich veröffentlichte Theorie zur Struktur der Nucleohistone versucht, den erwähnten widersprüchlichen Beobachtungen gerecht zu werden. Seine Vorstellung basiert auf der Annahme, daß den Proteinen im Nucleohiston eine entscheidende Rolle für die Genregulation zukommt. Außerdem garantieren die Proteine, daß die DNA in den biologisch aktiven Chromosomenabschnitten entwirrt und einsträngig vorliegt.

Um diese Konzeption verstehen zu können, soll noch einmal auf die Struktur des Nucleohistons eingegangen werden. Wie erwähnt, sind die alternierenden transversalen Bänder des Euchromatins und Heterochromatins lediglich Ausdruck einer unterschiedlichen Tertiärstruktur: Dichter gepackte und gestreckte Nucleotidsequenzen wechseln miteinander ab, so wie es eindeutig an den Riesenchromosomen der Dipteren-Larven nachgewiesen werden konnte. *Crick* geht nun weiter davon aus, daß in den gestreckten euchromatischen Zonen die DNA dauernd aufgezerrt ist und in Einzelsträngen vorliegt. Nur diese Nucleotidsequenzen repräsentieren aktive Gene, die durch RNA-Polymerase transkribiert werden können und groß genug sind, um vollständige Informationen zur Codierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 30000 und 40000 zu enthalten. Die entzerrte Struktur der DNA soll durch spezifische Proteine, wahrscheinlich Histone, gewährleistet und aufrechterhalten werden. Das Heterochromatin ist demgegenüber biologisch inaktiv und enthält multiple Kontrollelemente, die für eine abgestufte und regulierte biologische Aktivität des Euchromatins notwendig sind.

Zur Bestätigung dieser Theorie und für ein besseres Verständnis der chromosomalen Strukturen sind wir allerdings auf neue und zusätzliche experimentelle Informationen angewiesen. Offensichtlich sind unsere Vorstellungen über die DNA/Protein-Wechselwirkungen zu schematisch und zu lückenhaft für eine verlässliche Aussage über die Zusammenhänge zwischen der Struktur und der biologischen Aktivität der chromosomalen Nucleohistone. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Aussage *Mirskys*^[129] kein Widerspruch, daß möglicherweise die gesamte DNA mit Proteinen beladen ist und nur der Bindungscharakter entscheidet, ob dieser oder jener Genabschnitt biologisch aktiv ist.

Eingegangen am 15. März 1971, ergänzt am 3. Februar 1972 [A 876]

[1] R. Sager u. F. J. Ryan: Cell Heredity. Wiley, London 1961.

[2] H. Ris in D. McElroy u. B. Glas: Chemical Basis of Heredity. Johns Hopkins Press, Baltimore 1957.

[3] H. L. K. Whitehouse: Mechanism of Heredity. St. Martins Press, New York 1969.

- [4] H. Ris, Colloq. Ges. Physiol. Chemie, Mosbach/Baden, 1958/1959.
- [5] M. H. F. Wilkins, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 75 (1956).
- [6] J. D. Watson u. F. D. Crick, Nature 171, 964 (1953).
- [7] J. H. Taylor, Proc. 10th Intern. Congr. Genet. Montreal 1, 63 (1958).
- [8] J. A. Huberman u. A. D. Riggs, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 599 (1966).
- [9] G. C. Hoskins, Nature 217, 748 (1968).
- [10] H. G. Callan, J. Cell. Sci. 2, 1 (1967).
- [11] J. G. Gall u. H. G. Callan, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 562 (1962).
- [12] W. Beermann, Naturwissenschaften 52, 365 (1967).
- [13] D. D. Brown u. C. S. Weber, J. Mol. Biol. 34, 661 (1968).
- [14] S. A. Yankovsky u. S. Spiegelman, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 48, 1466 (1962).
- [15] F. M. Ritossa, K. C. Atwood u. S. Spiegelman, Genetics 54, 663 (1966).
- [16] R. A. Gilmour, J. W. Steward u. F. Sherman, Biochim. Biophys. Acta 161, 270 (1968).
- [17] H. M. Goodman, J. Bilson, A. Landy, S. Brenner u. J. D. Smith, Nature 217, 1019 (1968).
- [18] E. W. Johns, Biochem. J. 92, 55 (1964).
- [19] K. Murray in J. Bonner u. P. Ts'o: The Nucleohistones. Holden Day, San Francisco 1964.
- [20] A. J. Hayden u. A. R. Peacocke, Biochem. J. 110, 243 (1968).
- [21] J. M. Kinkade u. R. Cole, J. Biol. Chem. 241, 5798 (1966).
- [22] E. W. Johns, European J. Biochem. 4, 437 (1968).
- [23] J. Leclerc, A. Martinage, M. Dautrevaux u. G. Biserte, Biochim. Biophys. Acta 194, 342 (1969).
- [24] J. Magliozzi, D. Puro, C. Lin, R. Ortman u. A. L. Dounce, Exp. Cell Res. 67, 11 (1971).
- [25] R. H. Stellwagen u. R. D. Cole, J. Biol. Chem. 234, 4452 (1968).
- [26] E. W. Johns u. S. Forrester, European J. Biochem. 8, 547 (1969).
- [27] R. J. DeLang, M. Fambrough, E. L. Smith u. J. Bonner, J. Biol. Chem. 243, 5906 (1968); 244, 319 (1969).
- [28] M. Bustin, S. Rall, R. H. Stellwagen u. R. D. Cole, Science 163, 391 (1969).
- [29] Y. Ogawa, G. Quagliariotti, J. Jordan, C. W. Taylor, W. C. Starbuck u. H. Busch, J. Biol. Chem. 244, 4387 (1969).
- [30] P. Santiere, W. C. Starbuck, C. Roth u. H. Busch, J. Biol. Chem. 243, 5899 (1968).
- [31] K. Iwai, K. Ishikawa u. H. Hayashi, Nature 226, 1056 (1970).
- [32] M. Bustin, S. C. Rall, R. H. Stellwagen u. R. D. Cole, Science 163, 391 (1969).
- [33] A. M. Tamburro, A. Scatturin u. G. Vidali, Int. J. Protein Res. 2, 127 (1970).
- [34] E. M. Bradbury, C. Crane-Robinson, D. M. P. Phillips, E. W. Johns u. K. Murray, Nature 205, 1315 (1965).
- [35] P. J. Urnes u. P. Doty, Advan. Protein Chem. 16, 401 (1961).
- [36] G. Zubay u. P. Doty, J. Mol. Biol. 1, 1 (1959).
- [37] M. H. F. Wilkins, G. Zubay u. H. R. Wilson, Trans. Faraday Soc. 55, 497 (1959).
- [38] W. S. Stevely u. L. A. Stocken, Biochem. J. 110, 187 (1968).
- [39] E. L. Gershey, G. Vidali u. V. G. Allfrey, J. Biol. Chem. 243, 5018 (1968).
- [40] B. G. T. Pogo, A. O. Pogo, V. G. Allfrey u. A. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 59, 1337 (1968).
- [41] E. Robbins u. T. W. Borun, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 57, 409 (1967).
- [42] J. R. Tevnick, C. J. Ingles u. G. H. Dixon, Fed. Proc. 26, 603 (1967).
- [43] T. W. Borun, M. D. Scharff u. E. Robbins, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 58, 1977 (1967).
- [44] B. R. Reid u. R. D. Cole, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 51, 1044 (1964).
- [45] M. L. Birnstiel u. W. G. Flamm, Science 145, 1434 (1964).
- [46] L. H. Kedes u. M. L. Birnstiel, Nature New Biology 230, 165 (1971).
- [47] L. H. Kedes u. P. R. Gross, Nature 223, 1335 (1969).
- [48] C. C. Liew, G. W. Haslett u. V. G. Allfrey, Nature 226, 414 (1970).
- [49] K. Marita, I. Tsuchida, S. Tsunazawa u. K. Ogata, Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 327 (1969).
- [50] D. G. Laycock u. J. A. Hunt, Nature 221, 1118 (1969).
- [51] G. Chalkley u. H. Maurer, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 498 (1965).
- [52] E. Stedman u. E. Stedman, Nature 153, 500 (1944).
- [53] H. Busch: Histones and Other Nuclear Proteins. Academic Press, New York 1965.
- [54] T. Y. Wang, J. Biol. Chem. 241, 2913 (1966).
- [55] K. Marushige, D. Brutlag u. J. Bonner, Biochemistry 7, 3149 (1968).
- [56] T. Shirey u. R. C. Huang, Biochemistry 8, 4138 (1969).
- [57] J. E. Loeb, Biochim. Biophys. Acta 157, 424 (1968).
- [58] G. Patel, V. Patel, T. Y. Wang u. C. R. Zobel, Arch. Biochem. Biophys. 128, 654 (1968).
- [59] L. J. Kleinsmith, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 55, 1128 (1966).
- [60] H. G. Rose u. J. H. Frenster, Biochim. Biophys. Acta 106, 577 (1965).
- [61] T. Y. Wang, Biochim. Biophys. Acta 68, 52 (1963).
- [62] V. G. Allfrey, R. Meudt, J. W. Hopkins u. A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 47, 907 (1961).
- [63] G. Patel u. T. Y. Wang, Biochim. Biophys. Acta 95, 314 (1965).
- [64] W. J. Steele u. H. Busch, Cancer Res. 23, 1153 (1963).
- [65] L. J. Kleinsmith, J. Heidema u. A. Carroll, Nature 226, 1025 (1970).
- [66] C. S. Teng, C. T. Teng u. V. G. Allfrey, J. Biol. Chem. 246, 3597 (1971).
- [67] J. A. Smith u. R. J. King, Brit. J. Cancer 24, 861 (1970).
- [68] K. R. Shelton u. V. G. Allfrey, Nature 228, 132 (1970).
- [69] R. C. Huang u. J. Bonner, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 960 (1965).
- [70] A. C. Peacocke u. C. W. Dingmann, Biochemistry 6, 1818 (1967).
- [71] C. J. Larsen, F. Galibert, J. C. Lelong u. M. Boiron, C. R. Acad. Sci. Paris 264, 1523 (1967).
- [72] T. Nakamura, A. W. Prestayko u. H. Busch, J. Biol. Chem. 243, 1368 (1968).
- [73] A. W. Prestayko u. H. Busch, Biochim. Biophys. Acta 169, 327 (1968).
- [74] M. Dahmus, Dissertation, California Inst. Technol. 1968.
- [75] H. W. von Heyden u. H. G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta 232, 651 (1970).
- [76] D. E. Olins, J. Mol. Biol. 43, 439 (1969).
- [77] G. Zubay: The Nucleohistones. Holden-Day, San Francisco 1964.
- [78] E. W. Johns, Homeostatic Regul. Ciba Found. Symp. 1969.
- [79] P. Henson u. I. O. Walker, Eur. J. Biochem. 14, 345 (1970).
- [80] V. Luzzati u. A. Nicolaieff, J. Mol. Biol. 7, 142 (1963).
- [81] J. Palau, J. F. Pardon u. B. M. Richards, Biochim. Biophys. Acta 138, 633 (1967).
- [82] J. Sonnenbichler, Nature 223, 205 (1969).
- [83] J. Sonnenbichler u. P. Nobis, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 349, 1556 (1968).
- [84] E. Fredericq u. C. Houssier, European J. Biochem. 1, 51 (1967).
- [85] V. C. Littau, C. J. Burdick, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 54, 1204 (1965).
- [86] K. Murray, J. Mol. Biol. 15, 409 (1966); 39, 125 (1969).
- [87] P. M. Bayley, B. N. Preston u. A. Peacocke, Biochim. Biophys. Acta 66, 943 (1968).
- [88] J. A. Bartley u. R. Chakley, Biochim. Biophys. Acta 160, 224 (1968).
- [89] J. F. Pardon, M. H. F. Wilkins u. B. M. Richards, Nature 215, 508 (1967).
- [90] Y. Ohba, Biochim. Biophys. Acta 123, 76 (1966).
- [91] M.-C. Touvet u. M. Champagne, J. Chem. Phys. 63, 696 (1966).
- [92] P. Spitnik, R. Lipshitz u. E. Chargaff, J. Biol. Chem. 215, 7651 (1955).
- [93] J. A. Lucy u. J. A. V. Butler, Biochim. Biophys. Acta 16, 431 (1955).
- [94] M. Leng u. G. Felsenfeld, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 56, 1325 (1966).
- [95] J. T. Shapiro, M. Leng u. G. Felsenfeld, Biochemistry 8, 3219 (1969).
- [96] M. Tsuboi u. K. Matsuo, J. Mol. Biol. 15, 256 (1966).
- [97] D. E. Olins, A. L. Olins u. P. H. von Hippel, J. Mol. Biol. 33, 265 (1968).
- [98] K. G. Wagner u. R. Arav, Biochemistry 7, 1771 (1968).
- [99] S. A. Latt u. H. A. Sober, Biochemistry 6, 3293 (1967).
- [100] S. A. Latt u. H. A. Sober, Biochemistry 6, 3307 (1967).
- [101] H. R. Mahler u. B. D. Mehrotra, Biochim. Biophys. Acta 68, 211 (1963).
- [102] S. Z. Hirschmann, M. Leng u. G. Felsenfeld, Biopolymers 5, 227 (1967).
- [103] O. Heby u. I. Agrell, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 29 (1971).

- [104] I. Agrell u. O. Heby, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 39 (1971).
- [105] E. O. Akiurimisi, J. Bonner u. P. O. P. Tso, J. Mol. Biol. 11, 1281 (1965).
- [106] Y. V. Koslov u. G. P. Georgiev, Nature 228, 245 (1970).
- [107] T. C. Spelsberg, L. S. Hnilica u. A. T. Ansevin, Biochim. Biophys. Acta 228, 550 (1971).
- [108] J. Bonner, M. E. Dahmus, D. Fambrough, R. C. Huang, K. Marushige u. D. Y. H. Tuan, Science 159, 147 (1968).
- [109] T. Hoare u. E. W. Johns, Biochem. J. 119, 931 (1970).
- [110] C. H. Tan u. M. Miyagi, J. Mol. Biol. 50, 641 (1970).
- [111] J. Paul u. R. S. Gilmour, J. Mol. Biol. 16, 242 (1966).
- [112] R. F. Itzhaki, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 25 (1970).
- [113] R. J. Clark u. G. Felsenfeld, Nature, New Biology 229, 101 (1971).
- [114] T. C. Spelsberg u. L. S. Hnilica, Biochim. Biophys. Acta 228, 202 (1971).
- [115] T. C. Spelsberg u. L. S. Hnilica, Biochim. Biophys. Acta 228, 212 (1971).
- [116] P. R. Gross, K. Kraemer u. L. I. Malkin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 569 (1965).
- [117] J. Hindley, Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 175 (1963).
- [118] G. C. Barr u. J. A. V. Butler, Nature 199, 1170 (1963).
- [119] E. Johns u. T. A. Hoare, Nature 226, 650 (1970).
- [120] H. J. Frenster, Nature 206, 680 (1965).
- [121] Y. Kurashina u. Y. Oba, Protein (Tokyo) 15, 2 (1970).
- [122] G. Rovera u. R. Barega, J. Cell. Physiol. 77, 201 (1971).
- [123] J. Paul u. R. S. Gilmour, J. Mol. Biol. 34, 305 (1968).
- [124] T. C. Spelsberg, L. S. Hnilica u. T. Ansevin, Biochim. Biophys. Acta 228, 550 (1971).
- [125] M. Kamiyama u. T. Y. Wang, Biochim. Biophys. Acta 228, 563 (1971).
- [126] I. Bekhor, G. Kung u. J. Bonner, J. Mol. Biol. 39, 351 (1969).
- [127] S. Schwimmer u. J. Bonner, Biochim. Biophys. Acta 108, 67 (1965).
- [128] F. Crick, Nature 234, 25 (1971).
- [129] A. E. Mirsky, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2945 (1971).
- [130] K. Marushige u. J. Bonner, J. Mol. Biol. 15, 160 (1966).

Die Funktion des Metall-Ions in der Carboanhydrase

Von R. H. Prince und P. R. Woolley^[*]

Im vorliegenden Fortschrittsbericht soll eine Zusammenfassung über die Chemie des Metall-Ions im Enzym Carboanhydrase gegeben werden. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Ableitung der Wirkungsweise des Enzyms aus dem Studium des Metalls. Die Ergebnisse aus der Chemie der Metallenzyme scheinen eine Neubewertung einiger Aspekte der herkömmlichen Metallkomplex-Chemie zu verlangen.

1. Einleitende Betrachtung: Die Eigenschaften von Metallkomplexen

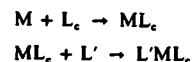
1.1. Das freie Metall-Ion

Die Hauptcharakteristika der Komplexchemie lassen sich durch das quantenmechanische Bild vom Metall-Ion verstehen, in welchem Elektronen in wasserstoffähnlichen Orbitalen untergebracht werden. Die Elektronen eines freien Ions im Grundzustand besitzen eine charakteristische Energie- und Ladungsverteilung. Diese Eigenschaften führen zur Konzeption von Ionenradius und Nettoladung und, im Zusammenhang mit angeregten Zuständen, der Polarisierbarkeit. Diese drei Attribute manifestieren sich in der Komplexchemie des Metall-Ions als maximale Koordinationszahl, Polarisierungskraft, Lewissäurestärke, stereochemisches Verhalten, Reaktionsfähigkeit etc. (vgl. z. B.^[1a]).

[*] Dr. R. H. Prince und Dr. P. R. Woolley
University Chemical Laboratory
Lensfield Road
Cambridge CB2 1EW (England)

1.2. Das komplex gebundene Metall

Betrachten wir ein Metall-Ion M, das von einem Liganden L_c mit gegebener Geometrie komplex gebunden wird und wenigstens eine freie Koordinationsstelle behält. Diese freie Koordinationsstelle kann von einem (einzähnigen) Liganden L' besetzt werden:



Die Bildung des Komplexes aus M und L_c wird die Eigenschaften von M gegenüber denen des freien, aber auch des solvatisierten Ions verändern. Darüber hinaus werden sich die Eigenschaften von L_c (und L') durch die Komplexbildung ändern. Der erste offenkundige Effekt am Metall-Ion wird eine Verringerung der Zahl freier oder von Lösungsmittelmolekülen besetzter Koordinationsstellen der inneren Sphäre sein, wenn L_c gebunden wird. Außerdem wird, falls L_c eine Nettoladung trägt, die Komplexbildung von einer Änderung der Gesamtladung begleitet sein. In jedem Fall wird die Ladung am Metall-Ion bei der Komplexbildung beträchtlich abnehmen; auch die Elektronenenergien