

1 Einleitung

1.1 Chromatin

Der Zellkern höherer Eukaryonten ist eine Membran-umgebene Organelle, die nicht nur das Genom, sondern auch den gesamten Protein-Apparat zur DNA-Replikation und Genexpression enthält. Obwohl der Zellkern menschlicher Zellen nur einen Durchmesser von ca. 5-10 μm besitzt, muss in ihm die gesamte DNA verpackt werden, die immerhin beim Menschen ausgestreckt eine Gesamtlänge von 2 m aufweist. Es wird deutlich, dass die DNA in stark kompakter Form vorliegen muss; dennoch müssen Gen-kodierende Bereiche ständig für Proteine zugänglich sein, um DNA-gekoppelte Prozesse zu gewährleisten.

Die DNA in höheren Eukaryonten ist auf mehrere Chromosomen verteilt. Der DNA-Doppelstrang wird durch Proteine zu einer kompakteren Struktur gefaltet. Der erste Kompaktierungsschritt der DNA wird durch die Verpackung in Nukleosomen realisiert. Ein Nukleosom ist ein Oktamer aus jeweils zwei der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Um das Nukleosom wickelt sich ein ungefähr 146 Basenpaare (bp) langer DNA-Strang. Dieser hochkonservierte Nukleoproteinkomplex tritt in allen eukaryontischen Genomen ca. alle 200 bp auf, wobei ein ungefähr 50 bp langes Stück als „Linker-DNA“ zwischen den einzelnen Nukleosomen fungiert (Luger et al., 1997). In einer zweiten Kompaktierungsstufe falten sich die Nukleosomenpartikel zur sogenannten 30 nm-Faser. Benachbarte Nukleosomen werden durch jeweils ein Histon H1 stabilisiert. Die 30 nm-Faser wiederum wird durch bislang unbekannte Mechanismen dichter gepackt, bis ein Chromosom entsteht. Durch die übergeordneten Verpackungsstufen wird die lineare Ausgangs-DNA als Chromatin mindestens 10000fach kompakter (Holmes und Cozzarelli, 2000). Nicht alle Bereiche auf den Chromosomen sind gleich dicht gepackt: stark kompaktierte („kondensierte“) Bereiche werden als Heterochromatin bezeichnet (Heitz, 1928). Diese Bereiche sind transkriptionell weitgehend inaktiv. Das weniger stark kompaktierte („dekondensierte“) Euchromatin umfasst den transkriptionell aktiven Teil des Chromatins.

Das Chromatin und der dadurch verbundene höhere Organisationsgrad der DNA spielt eine zentrale Rolle bei jedem Aspekt der DNA-Biologie der Zelle.

1.2 Heterochromatin

Der Begriff Heterochromatin (HC) wurde aufgrund ausschließlich histologischer Merkmale geprägt, um einen Teil des Karyotyps zu beschreiben, der lichtmikroskopisch kompakt im Interphase-Kern zu sehen war (Heitz, 1928). Es gibt zwei Arten von Heterochromatin, das „konstitutive“ und das „fakultative“ Heterochromatin. Das fakultative Heterochromatin besteht aus transkriptionell aktiven Regionen, die reversibel funktionelle und strukturelle Merkmale von Heterochromatin annehmen können.

Das konstitutive Heterochromatin besitzt in der Regel eine verminderte Gendichte, ist aber nicht komplett genfrei. Dieses Heterochromatin wird generell erst spät in der S-Phase repliziert (O'Keefe et al., 1992). Gerade für die Funktion von Telomeren und Centromeren spielt das Heterochromatin eine wichtige Rolle. Ein wesentliches Merkmal von Centromeren und Telomeren sind hoch repetitive DNA-Sequenzen, die als Satelliten-DNA bezeichnet werden (Vafa und Sullivan, 1997). Das Heterochromatin stabilisiert die repetitiven DNA-Sequenzen durch eine Hemmung der Rekombination zwischen homologen Wiederholungen (Guarente, 2000; Grewal und Moazed, 2003). Zusätzlich zur Funktion der Aufrechterhaltung der Genomstabilität spielt das Heterochromatin eine Rolle in der Regulation der Genexpression während der Entwicklung und zellulären Differenzierung (Grewal und Moazed, 2003). Das Heterochromatin ist z.B. an der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in somatischen Zellen beteiligt (Avner und Heard, 2001).

Das Heterochromatin um das Centromer wird als pericentrisches Heterochromatin bezeichnet. Es wird für eine richtige Chromosomen-Kohäsion und -Segregation benötigt (Peters et al., 2001; Nonaka et al., 2002; Hall et al., 2003).

Der Status des pericentrischen Heterochromatins wird epigenetisch und stabil über viele Zellteilungen vererbt (Cavalli, 2002). Die Struktur des Heterochromatins ist relativ resistent gegenüber spezifischem und unspezifischem Nuklease-Verdau und ist generell weniger zugänglich für Proteine (Elgin, 1996). Dies sollte sich in einer höhergeordneten, dicht gepackten Struktur des Heterochromatins widerspiegeln. Es wird vermutet, dass durch die regelmäßig angeordnete α -Satelliten-DNA eine reguläre Chromatinstruktur aufgebaut wird (Gilbert und Allan, 2001). Posttranslationale Modifikationen von Histonen spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin (s. 1.3 Histon-Code-Hypothese). Ein Merkmal des Heterochromatins sind hypoacetylierte Histone, während im transkriptionell aktiven Euchromatin die Histone hyperacetyliert sind (Roth et al., 2001).

Eine weitere Eigenschaft von Heterochromatin ist die Lysin 9-Methylierung des Histons H3 (meK9-H3), die eine Bindung des Heterochromatin Proteins 1 (HP1) ermöglicht (Cowell et al., 2002). Eine Zerstörung der meK9-H3-Methylierung verhindert die Bindung der HP1-Proteine an Nukleosomen (Lachner et al., 2001).

Ein drittes epigenetisches Merkmal von Heterochromatin ist die Cytosin-Hypermethylierung der DNA (Richards und Elgin, 2002). Diese Methylierung wird epigenetisch weitervererbt, wobei zur Etablierung und Aufrechterhaltung auch die Histon-Methylierung und die Histon-Deacetylierung mit der DNA-Methylierung in Verbindung stehen (Richards und Elgin, 2002). Es sind Komplexe von Methyl-CpG-bindenden Proteinen mit Histon-Deacetylasen gefunden worden (Dobosy und Selker, 2001). Diese Komplexe scheinen die lokalen Histonacetylierungslevel zu reduzieren, indem sie die DNA-Methylierung als Marker benutzen (Richards und Elgin, 2002).

1.3 Histon-Code-Hypothese

Chromatinfunktionen werden durch eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen an den aus dem Nukleosom ragenden N-terminalen Enden aller 4 nukleosomalen Histone reguliert. Die wichtigsten Modifikationen sind Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung (Lachner et al., 2003). Die Entdeckung von Enzymen, die solche Modifikationen katalysieren, und von Chromatin-assoziierten Proteinen, die selektiv an positionsspezifischen Histonmodifikationen binden, hat gezeigt, dass die Modifizierung der Histon-Enden den genetischen Informationsgehalt drastisch erhöht (Jenuwein und Allis, 2001). Dieses als „Histon-Code-Hypothese“ postulierte Phänomen scheint für die Kontrolle von Chromatinregionen, die Vererbung und die gesamte funktionale Organisation der Chromosomen eine bedeutende Rolle einzunehmen (Strahl und Allis, 2000).

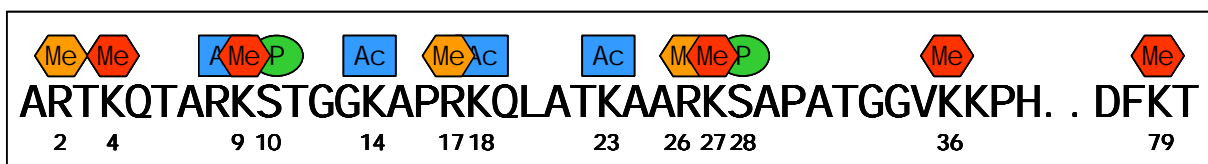


Abb. 1: Histon-Modifikationen des N-Terminus von Histon H3. Me: Methylierung; Ac: Acetylierung; P: Phosphorylierung. Die Zahlen unterhalb der Aminosäuresequenz geben die jeweilige Position der Modifikation an. Man beachte, dass Lysin 9 sowohl acetyliert als auch methyliert werden kann (nach Lachner et al., 2003).

Acetylierung und Arginin-Methylierung werden mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht, während Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung noch relativ unbekannte Phänomene sind, die multiplen Prozessen zugeschrieben werden wie Chromatin-Dekondensierung und -Inaktivierung (Moore et al., 2002; Lachner et al., 2003; Ladurner, 2003).

Hochkonservierte Lysinreste im N-terminalen Ende aller vier Kernhistone, aber besonders der Histone H3 und H4, werden *in vivo* enzymatisch acetyliert (Jenuwein und Allis, 2001). Die Acetylierung wird durch zwei Enzymfamilien reguliert, den Histon-Acetyltransferasen (HATs) und den Histon-Deacetylasen (HDACs) (Chen et al., 2001; Marks et al., 2003).

Man findet acetylierte Histone in transkriptionell aktivem Chromatin und hypoacetylierte Histone in transkriptionell inaktivem Chromatin (Kurdistani und Grunstein, 2003). Daher sind die Histone im pericentrischen und fakultativen Heterochromatin generell bei vielen Organismen deacetyliert (Grant, 2001). HATs sind daher als transkriptionelle Co-Aktivatoren und HDACs als Co-Repressoren zu betrachten. Wenn diese Enzyme rekrutiert werden, bauen sie Regionen im Genom auf, die entweder transkriptionell aktiv oder repressiv sind (Grant, 2001). Die Modifikation von Histon-Enden durch Acetylierung erhöht die Durchlässigkeit des Chromatins für Transkriptionsfaktoren, da die kovalente Bindung des Acetylrestes die positive Ladung der ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenkette aufhebt (Kurdistani und Grunstein, 2003). Dadurch verringert sich die Affinität zur negativ geladenen DNA. Außerdem scheinen auch Histon:Histon Interaktionen zwischen benachbarten Nukleosomen und Interaktionen mit anderen regulatorischen Proteinen durch die Acetylierung verändert zu werden (Horn und Peterson, 2002). Jedoch verringert sich die Histon-DNA-Bindung in Nukleosomen *in vitro* bei erhöhter Acetylierung nicht (Mutskov et al., 1998). Es ist daher zu vermuten, dass eine höher geordnete Chromatinstruktur durch die Acetylierung verändert wird (Tse et al., 1998; Horn und Peterson, 2002).

Die Histon-Lysinmethylierung wirkt ortsabhängig, da sie sowohl Gene aktivieren oder inaktivieren kann, je nachdem, an welchem Lysin der Methylrest erzeugt wird (Lachner et al., 2003). Es scheint mindestens vier Lysine bei H3 (K4, K9, K27, K36) zu geben, die methyliert werden können (Abb. 1; Lachner et al., 2003). Die Histon-Methylierung ist komplex, zum einen, da mehrere spezifische Methyltransferasen (HMTs) gefunden wurden, und zum anderen, weil unterschiedliche Methylierungsgrade existieren. So kann jedes Lysin eine Mono-, Di-, und Trimethylierung aufweisen, die jeweils unterschiedliche Chromatindomänen kennzeichnen (Lachner et al., 2003; Lehnertz et al., 2003).

Die Methylierung von K4-H3 findet man an aktiven Promotoren im Euchromatin, wobei wahrscheinlich Transkriptionsfaktoren spezifisch die Methylierung erkennen (Strahl et al., 1999; Zhang und Reinberg, 2001).

Die Methylierungen an den anderen Lysinen von H3 werden mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht. Die K9-Methylierung ist hauptsächlich im Heterochromatin zu finden, wo sie eine spezifische Bindungsstelle für die HP1-Proteine darstellt (Jacobs et al., 2001; Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2001a; Cowell et al., 2002). Die Methylierung wird abhängig vom Chromatinstatus durch mehrere verschiedene Methyltransferasen katalysiert. Die humane Methyltransferase SUV39H1 und ihre Homologen in anderen Organismen ist für die Trimethylierung des K9 aus einem Mono- oder Dimethylstadium im pericentrischen Heterochromatin verantwortlich. In SUV39H1-Doppelnulmutanten in der Maus sowie nach der Inaktivierung der HMT-Funktion in *S. pombe* ist die pericentrische K9-H3-Methylierung aufgehoben, wobei sich auch die Lokalisation der HP1-Proteine drastisch ändert (Bannister et al., 2001; Nakayama et al., 2001; Peters et al., 2001; Peters et al., 2002). Daher scheint die Trimethylierung des Lysins ein stabiles Merkmal pericentrischen Heterochromatins zu sein (Joost Martens, mündliche Mitteilung).

Die Methyltransferase G9a ist eine beim Menschen und bei der Maus entdeckte Histon-Methyltransferase, die die K9-H3-Methylierung im Euchromatin katalysiert (Tachibana et al., 2001; Ogawa et al., 2002; Tachibana et al., 2002). Die vorherrschende Methylierung scheint eine K9-Dimethylierung zu sein, wobei ein Verlust der G9a-Aktivität zu einem verringerten Gehalt an K9-Methylierung im Euchromatin führt (Tachibana et al., 2002). Diese HMT scheint Komplexe in menschlichen Zellen mit einer HP1-Isoform und bestimmten transkriptionellen Repressoren zu bilden (Ogawa et al., 2002). Es könnte daher sein, dass durch die HMT G9a im Euchromatin Promotoren reguliert werden (Lachner et al., 2003).

In weiblichen Säugetierzellen wird ein X-Chromosom inaktiviert, um eine äquivalente Genexpression von den Geschlechtschromosomen zu gewährleisten (Avner und Heard, 2001). Die K9-H3-Methylierung ist ein prominenter Marker für das inaktive X-Chromosom (Xi); HP1-Proteine sind damit nicht assoziiert (Heard et al., 2001; Boggs et al., 2002; Mermoud et al., 2002; Peters et al., 2002). Die K9-H3-Methylierung auf dem Xi ist auch unabhängig von der SUV39H1-Methyltransferase. Möglicherweise spielt die K27-Methylierung auch eine Rolle bei der X-Chromosom-Inaktivierung (Peters et al., 2002; Silva et al., 2003; Plath et al., 2003). Daher dürfte es sich bei der X-Chromosom-Inaktivierung um einen HP1-unabhängigen Mechanismus der Chromatin-Repression handeln.

1.4 Heterochromatin Protein 1

Das Heterochromatin Protein 1 (HP1) ist als chromosomales nicht-Histonprotein ein wichtiger Bestandteil von Heterochromatin (Cowell et al., 2002). HP1 ist ein in Struktur und Funktion hochkonserviertes Protein mit Mitgliedern in allen bisher untersuchten Eukaryonten (Abb. 2; Ekwall et al., 1995; Eissenberg und Elgin, 2000; Gaudin et al., 2001; Couteau et al., 2002).

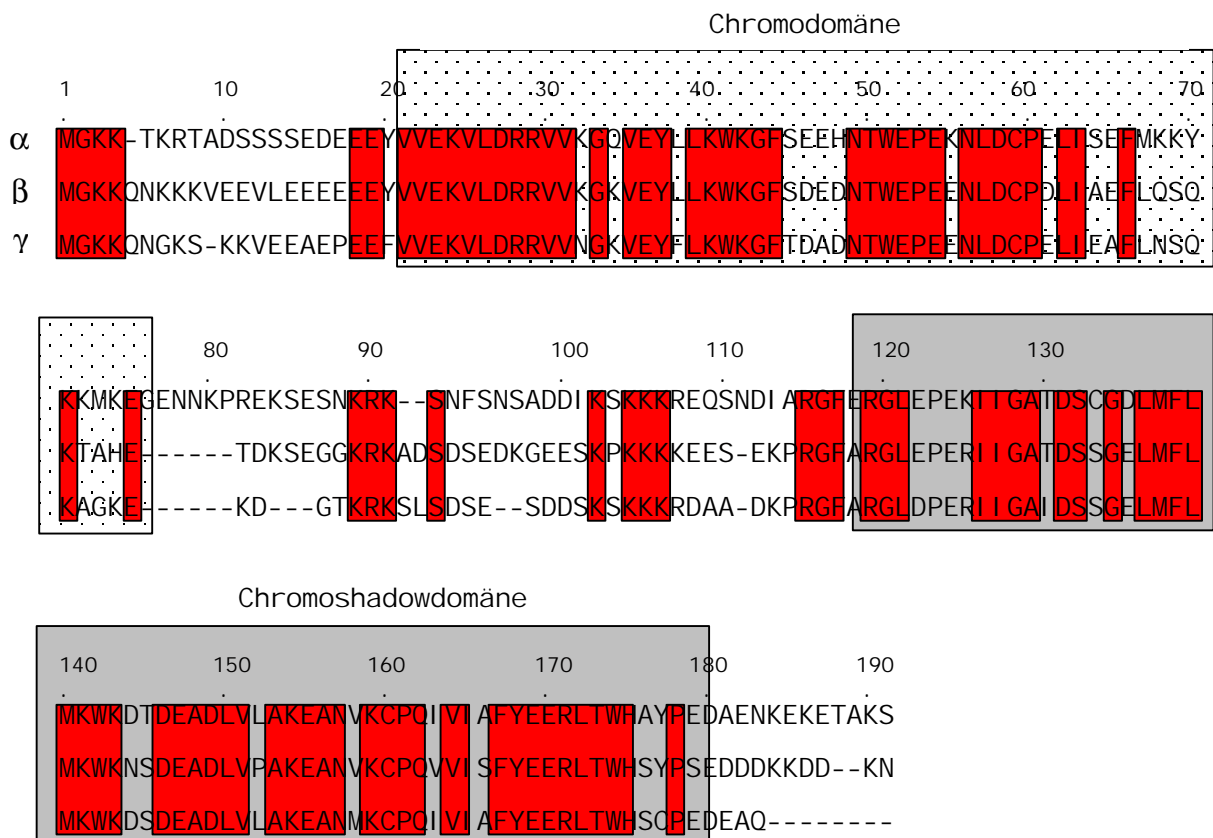


Abb. 2: Vergleich der humanen Aminosäuresequenzen von HP1α, HP1β und HP1γ. Die konservierten Chromodomänen (gepunktetes Rechteck) und die Chromoshadowdomänen (graues Rechteck) sind hervorgehoben. Zwischen den beiden Domänen liegt das weniger stark konservierte flexible Zwischenstück. Die konservierten Aminosäuren sind rot unterlegt (nach Minc et al., 1999).

1.4.1 Domänenstruktur von HP1-Proteinen

HP1-Proteine besitzen ein Molekulargewicht von 15-35 kDa. Sie bestehen aus einer N-terminalen Chromodomäne (CD, **chromatin organisation modifier**), die auch in anderen Proteinfamilien zu finden ist, und einer nur bei HP1-Proteinen vorkommenden C-terminalen Chromoshadowdomäne (CSD), die durch ein flexibles Zwischenstück miteinander verbunden sind (Abb. 2; Eissenberg und Elgin, 2000; Jones et al., 2000). Die Chromodomäne wurde

ursprünglich als eine 50 Aminosäuren lange und 77 % homologe Region aus den HP1- und Polycomb-Proteinen aus *D. melanogaster* charakterisiert (Paro und Hogness, 1991). Diese Region wurde aber später auch in anderen Proteinen, z. B. in der Histonmethyltransferase SUV39H1, der Helikase CHD und dem Retinoblastoma Protein 1 gefunden (Jones et al., 2000). Die Chromodomäne von HP1 erkennt und bindet spezifisch an meK9-H3 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2001a). Nach der Histon-Code-Hypothese wird die Regulation des genetischen Codes durch posttranslationale Modifikationen erheblich erweitert (Strahl und Allis, 2000). Die Methylierung des Lysins an Position 9 des Histons H3 ist ein Merkmal für Heterochromatin, wobei HP1 für die Aufrechterhaltung des repressiven Zustands essentiell ist (Eissenberg und Elgin, 2000; Lachner et al., 2001).

Die Chromoshadowdomäne (CSD) ist strukturell so stark mit der Chromodomäne verwandt, dass angenommen wird, die HP1-Gene seien durch eine Duplikation der Chromodomänen-Sequenz entstanden (Jones et al., 2000). Die CSD ist für die Hetero-, Homodimer- und Multimerbildung der HP1-Proteine verantwortlich (Cowell und Austin, 1997; Cowieson et al., 2000; Smothers und Henikoff, 2000; Wang et al., 2000; Nielsen et al., 2001b). Die Chromoshadowdomäne ist auch für die meisten Interaktionen mit anderen Proteinen verantwortlich (Li et al., 2002). In mehreren Interaktionspartnern von HP1, aber auch in der CSD von HP1 selbst, ist eine Pentapeptid-Konsensus-Sequenz gefunden worden. Dieses Motiv scheint ausreichend für die Bindung zu sein, da Mutationen in diesem Bereich die Interaktionsfähigkeit zerstören (Brasher et al., 2000; Smothers und Henikoff, 2000).

1.4.2 HP1-Varianten in höheren Eukaryonten

Die Struktur und die Funktion von HP1 ist in allen Eukaryonten stark konserviert. Abgesehen von der Spaltheife *S. pombe*, in der nur ein HP1-Protein (Swi6) existiert, gibt es in allen anderen bis jetzt untersuchten Eukaryonten drei Isoformen (Ekwall et al., 1995). In *Drosophila* kommen die drei Homologen HP1a, -b und -c vor (Smothers und Henikoff, 2001). Menschen und Mäuse besitzen drei Isoformen (HP1 α , - β und - γ). Die Isoformen besitzen große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, der Domänenstruktur und der zellulären Lokalisation (Abb. 2; Ye und Worman, 1996; Furuta et al., 1997; Minc et al., 1999). Obwohl es kleine Unterschiede bzgl. der chromosomalen Lokalisation und den Proteininteraktionspartnern von HP1-Proteinen in den verschiedenen Spezies gibt, ist noch nicht klar, ob die Proteine redundante oder spezifische Funktionen haben. Eine Interpretation