

Molekulare Grundlagen der Vererbung



Das Gemälde »Laokoon 1977« von Hans Erni könnte als Voraussicht der Fragen gesehen werden, die sich durch die Fortschritte der Molekularbiologie stellen. Es drückt aber auch die Abhängigkeit des Menschen von seinem genetischen Material aus. (Mit freundlicher Genehmigung von H. Erni, Luzern)

2.1 Funktion und Struktur der DNA	22
2.1.1 DNA als Träger der Erbinformation	22
2.1.2 Chemische Zusammensetzung	23
2.1.3 Konfiguration der DNA	23
2.1.4 Physikalische Eigenschaften der Nukleinsäuren	28
2.2 Die Verdoppelung der DNA (Replikation)	31
2.2.1 Semikonservative Replikation	31
2.2.2 Mechanismen der Replikation bei Prokaryoten	36
2.2.3 Mechanismen der Replikation bei Eukaryoten	39
Literatur	46

Überblick

Bestimmte erbliche Eigenschaften können durch Infektion von Mäusen mit abgetöteten Erregern übertragen werden. Die chemische Analyse der übertragenen Substanz zeigte, dass es sich um Desoxyribonukleinsäure (DNA) handelt. Der chemische Aufbau der DNA ist sehr einfach. Sie besteht aus einem Rückgrat aus Zuckermolekülen (Desoxyribose), die durch Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft sind. An der Desoxyribose befinden sich heterozyklische Basen. Insgesamt gibt es in der DNA nur vier verschiedene Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin).

Die DNA kommt in Form einer Doppelhelix vor, die aus zwei antiparallel umeinander gewundenen Strängen besteht. Die beiden DNA-

Stränge der Doppelhelix werden durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen zusammengehalten. Bei dieser Verknüpfung der Basen durch Wasserstoffbrücken bestehen nur zwei verschiedene Möglichkeiten: Es kann entweder Guanin mit Cytosin oder Adenin mit Thymin verbunden werden. Man bezeichnet solche miteinander verbundenen Basen als Basenpaare und die durch Basenpaare verknüpften DNA-Stränge als komplementäre Stränge.

Zur konstanten Weitergabe des Erbmaterials muss sich die DNA identisch duplizieren können. Aufgrund ihrer Struktur ist die DNA hierzu sehr einfach in der Lage. Trennen sich die beiden Stränge der Doppelhelix einer Chromatide (nicht unterteilbare Längseinheit

des Chromosoms), so kann an jedem der beiden Stränge ein neuer, komplementärer Strang synthetisiert werden, da seine Struktur durch die Basenfolge in dem alten Strang vollständig festgelegt ist. Man bezeichnet diesen Vorgang der Verdoppelung der DNA als Replikation. Durch Replikation entsteht eine zweite DNA-Doppelhelix. Während einer Zellteilung können die beiden Chromatiden auf die Tochterzellen verteilt werden, und die Kontinuität des genetischen Materials ist damit gesichert. Da bei der Replikation in beiden neu gebildeten DNA-Doppelhelices jeweils ein Strang der ursprünglichen DNA-Doppelhelix erhalten bleibt, wird die Replikation als semi-konservativ bezeichnet.

2.1 Funktion und Struktur der DNA

2.1.1 DNA als Träger der Erbinformation

Der Eindruck, dass das Geheimnis der chemischen Grundlage der Vererbung in den Proteinen zu suchen sei, beherrschte noch in den 1930er-Jahren die Vorstellungen der Forscher. Dennoch gehen die grundlegenden experimentellen Befunde, die die Grundlage zur Identifikation der **DNA als Träger der erblichen Eigenschaften** bilden, bereits in die 1920er-Jahre zurück. Frederick **Griffith** hatte beobachtet, dass bestimmte Bakterienstämme imstande waren, erbliche Eigenschaften an andere Bakterienstämme mit ursprünglich abweichenden Eigenschaften zu übertragen. Für diese Untersuchungen hatte er *Streptococcus pneumoniae* (auch als *Pneumococcus pneumoniae* bezeichnet) verwendet, den Erreger der Lungenentzündung. Manche *Streptococcus*-Stämme formen auf dem Kulturmedium große, ebene Bakterienkolonien und werden daher als infektiöse S-Stämme (S für engl. *smooth*) bezeichnet. Subkutane Infektionen von Mäusen mit diesen Erregerstämmen führen zum Tod der Mäuse. Hingegen zeigen Infektionen mit nicht infektiösen R-Stämmen keine letalen Folgen; diese bilden auf Kulturmedium kleinere, raue Kolonien (R für engl. *rough*). Auch durch Hitze inaktivierte S-Stämme erzeugen keine Infektionen. Mischt man jedoch hitzeinaktivierte S-Stämme und lebende R-Stämme und infiziert damit eine Maus, so stirbt diese an den Folgen einer Infektion. Man bezeichnet diesen Vorgang als **Transformation**: Die hitzeinaktivierten infektiösen Bakterien transformieren die nicht infektiösen R-Stämme und erzeugen infektiöse Bakterien, indem sie eine zunächst unbekannte Substanz auf die nicht infektiösen Bakterien übertragen. Die Ursache für diese Transformation blieb zunächst unbekannt, bis Oswald **Avery**, Colin **MacLeod** und Maclyn **McCarthy** 1944 die entscheidenden Experimente ausführten. Sie behandelten die infektiösen hitzeinaktivierten Bakterienstämme mit verschiedenen Enzymen, um auf diese Weise zu testen, durch welche chemischen Verbindungen die Transformation ausgelöst wird. Die Begründung Averys für die Wahl des experimentellen Systems erinnert auffallend an Mendels Motivation für die Wahl seines Untersuchungsmate-

rials: »For purpose of study, the typical example of transformation chosen as a working model was the one with which we have had most experience and which consequently seemed best suited for analysis« (Avery et al. 1944). Das entscheidende Ergebnis dieser Versuche war der Befund, dass proteolytische Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin) und Ribonuklease keinen Effekt auf die Transformationsfähigkeit ausübten, wohl aber Desoxyribonuklease (in der Originalpublikation als »*desoxyribonucleodepolymerase*« bezeichnet). Die physikochemischen Untersuchungen der transformierenden Substanz in der Ultrazentrifuge, durch Elektrophorese und durch Messungen des Absorptionsspektrums gaben zusätzliche Hinweise auf den Desoxyribonukleinsäure-Charakter dieser Verbindung. So konnten kaum mehr Zweifel bestehen, dass DNA die biologisch aktive Verbindung für die Transformation der Pneumokokken ist.

Dennoch blieb die eigentliche Basis der biologischen Funktion von DNA noch immer unverstanden, und zu ihrer Erklärung bedurfte man des von **Watson** und **Crick** vorgestellten Strukturmodells der DNA-Doppelhelix. Avery und seine Mitarbeiter beschreiben am Schluss der Diskussion ihrer Versuchsergebnisse, in bemerkenswerter Zurückhaltung, die Konsequenzen aus ihren Befunden folgendermaßen: »If the results of the present study on the chemical nature of the transforming principle are confirmed, then nucleic acids must be regarded as possessing biological specificity the chemical basis of which is as yet undetermined« (Avery et al. 1944).

Unterstützt wurde die Interpretation der Daten von Avery durch spätere Experimente, die Alfred **Hershey** und Martha **Chase** (1951) ausführten. Infiziert man Bakterien mit **Bakteriophagen** (► Abschn. 4.3), deren **Hüllproteine** mit ^{35}S und deren DNA mit ^{32}P markiert ist, so findet man, dass im Wesentlichen ^{32}P -markiertes Material in die Bakterienzellen gelangt, während die ^{35}S -Markierung an den Bakterienzellwänden zurückbleibt. Da Stoffwechsel und Vermehrung der Bakteriophagen in der Zelle erfolgen, muss die DNA die maßgebliche chemische Komponente der Bakteriophagen sein, nicht aber das Protein.

- **Die Erkenntnis, dass DNA die Erbinformation enthält, beruht auf Experimenten, die zeigen, dass DNA imstande ist, erbliche Eigenschaften einer bakteriellen Donorzelle auf eine genetisch andersgeartete bakterielle Rezeptorzelle zu übertragen.**

2.1.2 Chemische Zusammensetzung

Die chemischen Verbindungen, die die Träger der Erbinformation sind, wurden schon 1871 durch Friedrich **Miescher** in seinem Labor im Keller des Tübinger Schlosses entdeckt. Miescher untersuchte die Bestandteile von Eiter, den er aus Verbandsmaterial isolierte, das er aus der Tübinger chirurgischen Klinik erhielt. Dabei entdeckte er als wesentlichen Bestandteil des Eiters eine Substanz, die er **Nuklein** nannte. Ähnliche Verbindungen fand er im Sperma von Lachsen, aber sein Interesse wandte sich bald wieder den Eiweißmolekülen zu. Das Nuklein bezeichnen wir heute als Nucleinsäure. Nucleinsäuren erschienen Miescher als zu einformig in ihrer chemischen Zusammensetzung, da sie im Wesentlichen große Anteile an Phosphat enthielten. Diese Einformigkeit konnte sein Interesse nicht erwecken. Erst im Laufe der ersten Jahrzehnte des 20. Jahrhunderts wurden die Bestandteile der Nucleinsäuren und ihr molekularer Aufbau genauer analysiert. Als Hauptkomponenten erkannte man in allen Nucleinsäuren vier heterozyklische organische Basen – **Adenin, Guanin, Cytosin** und **Thymin** – oder, alternativ zum Thymin, das zu diesem nahe verwandte **Uracil**. Diese Basen sind seitlich an eine Kette von Ribose- oder Desoxyribosemolekülen gebunden, die untereinander durch Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind (■ Abb. 2.1). Man unterschied daher Desoxyribose-haltige Nucleinsäuren, die die Bezeichnung **Desoxyribonucleinsäure** (DNS oder DNA vom engl. *deoxyribonucleic acid*) erhielten, von den Ribose-haltigen Nucleinsäuren, **Ribonucleinsäure** (RNS oder RNA vom engl. *ribonucleic acid*) genannt. Ein wichtiger, aber zunächst in seiner eigentlichen Bedeutung nicht wahrgenommener Befund war die annähernd äquimolare Menge der organischen Basen. Erwin **Chargaff** erkannte 1951, dass nur jeweils zwei Basen, nämlich Guanin und Cytosin einerseits und Adenin und Thymin andererseits in der DNA in genau äquimolaren Mengen vorhanden sind. Diese grundlegenden chemischen Eigenschaften, zusammen mit röntgenspektrometrischen Daten der Struktur kristallisierter DNA-Moleküle, die einen helixartigen Aufbau der Moleküle als einfachste Interpretation anzeigten, waren entscheidend für das Verständnis der grundlegenden Struktur von DNA-Molekülen. Sie erlaubten es James Watson und Francis Crick (1953a, b), ein Strukturmodell für die DNA zu entwerfen, das es ermöglicht, die grundlegenden Eigenschaften und Funktionen des genetischen Materials aller Lebewesen von der molekularen Seite her zu verstehen.

Die DNA ist nach diesem Modell aus zwei antiparallelen Nucleinsäuresträngen aufgebaut, die in einer rechtsgewundenen Spirale miteinander verwunden sind und durch Wasserstoffbrückenbindungen der Basen zusammengehalten werden (■ Abb. 2.2). Diese Struktur wird als **DNA-Doppelhelix** bezeichnet. In ihrer äußeren Form ist sie durch zwei Vertiefungen ge-

kennzeichnet: die kleine und die große Furche (engl. *minor* bzw. *major groove*). Diese Furchen spielen eine wichtige Rolle für die Interaktion der DNA mit Eiweißmolekülen zur Verpackung der DNA im Chromosom, aber auch für die Bindung regulatorischer Proteinmoleküle (► Abschn. 3.3, ► Abschn. 4.6.3 und ► Abschn. 7.3.2). Vor allem die große Furche ist bedeutsam, da in ihr die Basenpaare in ihrer sequenzspezifischen Struktur zur Außenseite der Doppelhelix hin exponiert werden.

Das **Watson-Crick-Modell** der DNA-Doppelhelix enthält als biologisch wichtigstes Strukturelement die Bildung von Basenpaaren durch Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basen (■ Abb. 2.3). Die Basenpaarung erfolgt jeweils zwischen der Amino- und der Keto-Form des Adenin (A) und Thymin (T) oder zwischen Cytosin (C) und Guanin (G). Damit waren auch die einige Jahre vorher von Erwin **Chargaff** aufgestellten **Regeln der konstanten Proportionen** erklärt. Sie besagen im Wesentlichen, dass in allen DNA-Molekülen die Zahl der A- und T-Moleküle gleich ist sowie entsprechend die Zahl der G- und C-Moleküle ($A:T = G:C = 1$); entsprechend ist auch die Summe gleich ($A + G = T + C$).

Da Adenin und Thymin durch zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, Guanin und Cytosin aber durch drei, ist die Doppelhelix in AT-reichen DNA-Abschnitten weniger stabil als in GC-reichen Abschnitten. Diese physikalische Eigenschaft kann auch zur experimentellen Bestimmung des mittleren Basengehalts der DNA ausgenutzt werden (■ Abb. 2.7, ■ Abb. 2.8 und ■ Abb. 2.9). Für die Stabilität der Doppelhelix ist jedoch nicht allein die Energie der Wasserstoffbrückenbindungen entscheidend, sondern auch die molekulare Interaktion zwischen den Basen (Van-der-Waals-Kräfte).

- **Träger der Erbinformationen sind die Nucleinsäuren. Es handelt sich hierbei um hochmolekulare lineare Kettenmoleküle, die durch ein Zucker-Phosphat-Grundgerüst gebildet werden. In den meisten Organismen ist die Desoxyribose die Zuckerkomponente der Nucleinsäuren des Erbmaterials, die daher als Desoxyribonucleinsäure (DNA) bezeichnet wird.**

An den Zuckermolekülen befinden sich heterozyklische Purin- oder Pyrimidinbasen. Durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Basen (Guanin und Cytosin bzw. Adenin und Thymin) können zwei DNA-Ketten miteinander in Wechselwirkung treten und eine schraubenförmige Doppelhelix mit einer tieferen und einer flacheren Furche an ihrer Außenseite bilden.

2.1.3 Konfiguration der DNA

DNA-Doppelhelices können in mehreren strukturellen Konfigurationen vorliegen, die von der Basenfolge und den Ionenbedingungen im Lösungsmittel abhängig sind. Die von Watson und Crick vorgeschlagene Konformation wird als **B-Konfiguration** (**B-Konformation**) bezeichnet. Alternative Strukturen sind die **A-** und die **Z-Konfiguration** (**A-** und **Z-Konformation**); die wichtigsten physikalischen Eigenschaften dieser drei Konformationen sind in ■ Tab. 2.1 zusammengefasst. Die A-Konfiguration

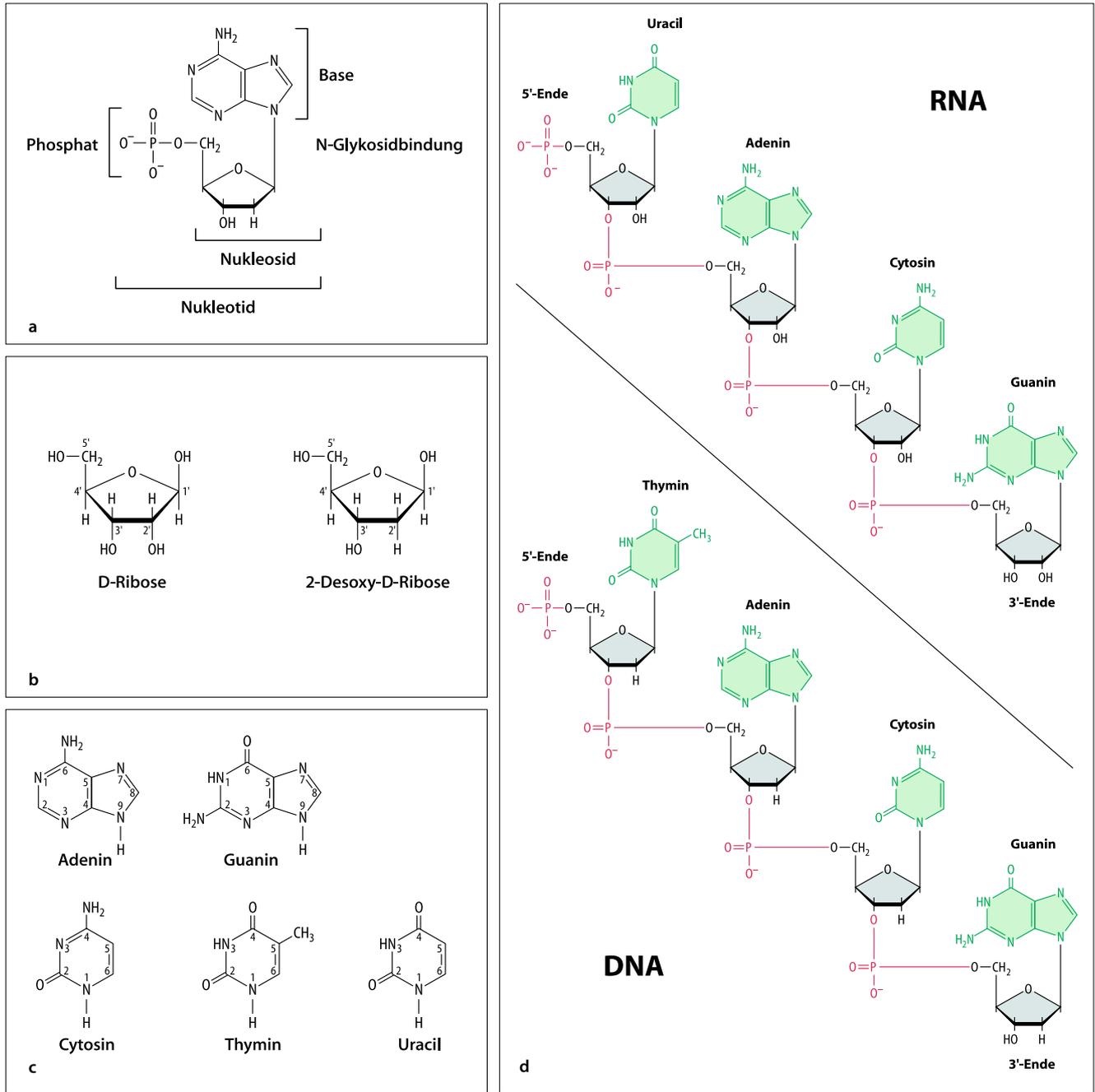
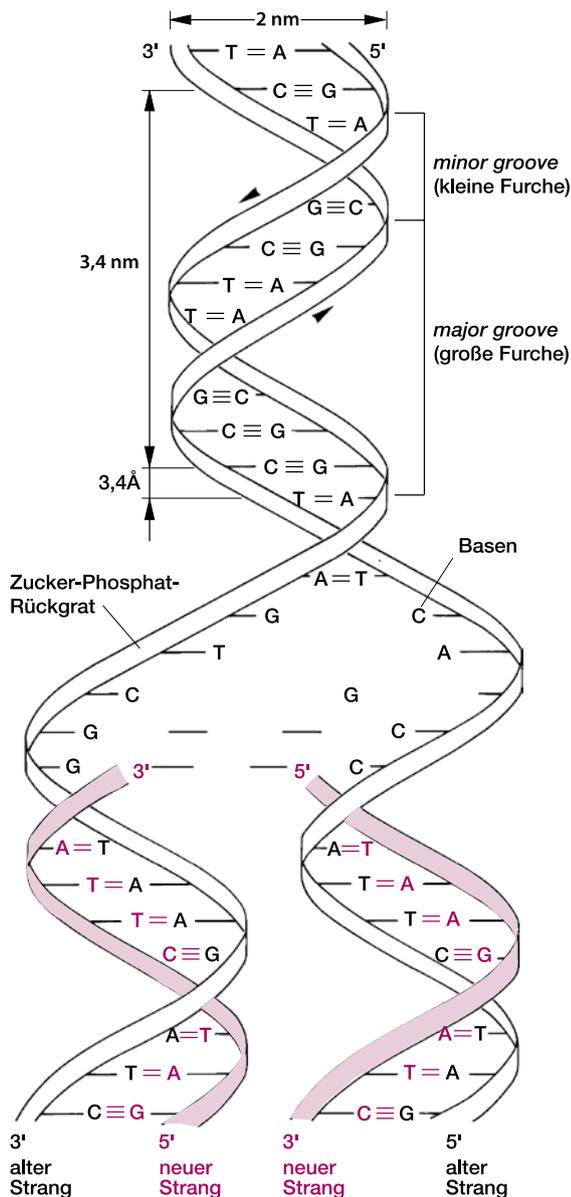
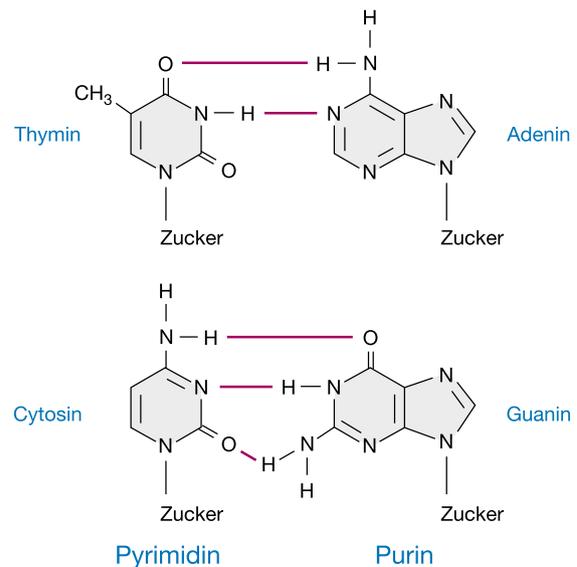


Abb. 2.1 Aufbau der DNA und RNA. **a** Bausteine der Nucleinsäure sind die Nucleotide, die aus einer Base (hier: Adenin), einem Zucker (hier: 2-Desoxy-D-Ribose) und einem Phosphatrest bestehen. Die Base ist über eine N-glykosidische Bindung mit dem 1'-C des Zuckers verbunden. Die Verbindung aus Base und Zucker wird als Nucleosid bezeichnet (hier: Adenosin). Der Phosphatrest ist als Ester mit dem 5'-C des Zuckers verbunden; die dargestellte Verbindung heißt Adenosin-5'-monophosphat. **b** Die Nucleinsäuren werden entsprechend dem Zuckerbaustein als Ribonucleinsäuren (bei Verwendung der D-Ribose; Abk. RNA) oder Desoxyribonucleinsäuren (bei Verwendung der 2-Desoxy-D-Ribose; Abk. DNA) bezeichnet. Die Zuckerbausteine unterscheiden sich durch die Anwesenheit (D-Ribose) oder Abwesenheit (Desoxyribose) einer OH-Gruppe am 2'-C. Die Nummerierung der einzelnen C-Atome im Ring ist angegeben. **c** Die Basen sind entweder die Purine Adenin (A) bzw. Guanin (G) oder die Pyrimidine Cytosin (C) bzw. Thymin (T). Bei der RNA tritt Uracil (U) an die Stelle von Thymin. Die Nummerierung der einzelnen C-Atome im Ring ist angegeben. Die entsprechenden Nucleotide werden als Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymin oder Uridin bezeichnet. **d** Über 5'→3'-Phosphodiesterbindungen am Zucker verbundene Nucleotide bilden die Makromoleküle der DNA bzw. RNA. Verschiedene DNA- bzw. RNA-Moleküle unterscheiden sich durch die Folge der organischen Basen (Sequenz). (d nach Löffler und Petrides 2003, mit freundlicher Genehmigung von Springer)



■ **Abb. 2.2** Strukturmodell der DNA-Doppelhelix zum Zeitpunkt der Verdoppelung (Replikation). Eine Windung der Doppelhelix der B-Konformation mit etwa 10 Basenpaaren benötigt etwa 3,4 nm, während der Durchmesser der Doppelhelix etwa 2 nm beträgt. Die große und kleine Furche (*major groove* und *minor groove*) sind angegeben. Die beiden DNA-Einzelstränge weisen eine entgegengesetzte Orientierung auf (*Pfeilköpfe* und Angabe der freien endständigen 5'-OH- bzw. 3'-OH-Gruppen der Desoxyribose)

erhält man vor allem bei hohen Salzkonzentrationen oder in stark dehydratisiertem Zustand; es erscheint daher zweifelhaft, ob sie unter biologischen Bedingungen vorkommt. Sie unterscheidet sich von der B-Konformation dadurch, dass die Basen nicht mehr senkrecht zur Achse der Doppelhelix angeordnet, sondern um etwa 19° gegen die Horizontale gedreht sind. Zugleich beträgt die Anzahl der Basenpaare je Windung der Doppelhelix 11 statt der 10 Basenpaare, die die B-Konformation kennzeichnen. Diese Veränderungen in der Struktur bedingen eine Vergrößerung des Durchmessers der Doppelhelix auf 2,55 nm anstatt der 2,37 nm, die in der B-Konfiguration gefun-



■ **Abb. 2.3** Wasserstoffbrücken bei der Basenpaarung in der DNA. Bestimmte Basen (A und T in DNA bzw. A und U in RNA sowie G und C) können sich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken paaren (*rote Linien*). Durch die Paarung solcher komplementärer Basen entstehen doppelsträngige Nucleinsäuren, die die Form einer Doppelhelix annehmen

■ **Tab. 2.1** Physikochemische Eigenschaften der DNA

	Konfiguration		
	A	B	Z
Windungsrichtung	Rechts	Rechts	Links
Doppelhelix Ø	2,55 nm	2,37 nm	1,85 nm
Basenpaare pro Helixwindung ^a	~ 11	~ 10	~ 12
Länge pro Helixwindung ^a	~ 2,9 nm	~ 3,4 nm	~ 4,4 nm
Windung zwischen Basenpaaren	33,6°	35,9°	60°
Basenneigung zur Helixachse	19°	-1,2°	-9°
Propellertwist	18°	16°	~ 0°
Helixachse läuft durch	Große Furche	Basen	Kleine Furche
Große Furche	Eng, tief	Breit	Sehr klein, flach
Kleine Furche	Breit, flach	Eng	Sehr eng, tief
Glykosylbindung	Anti	Anti	Anti (Pyrimidine), syn (Purine)

Nach Dickerson et al. 1983, Nelson und Cox (2009)

^a rundungsbedingte Ungenauigkeiten möglich

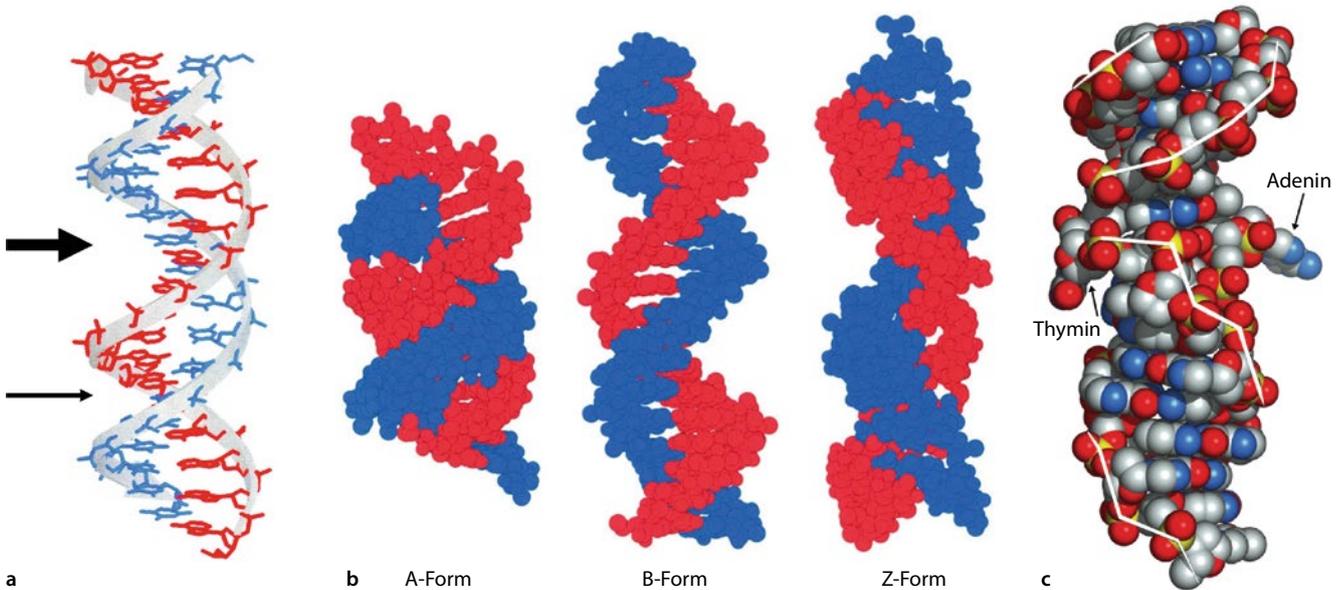


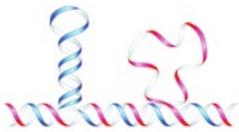
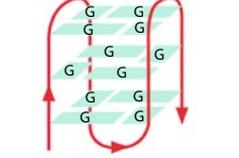
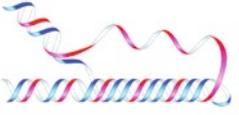
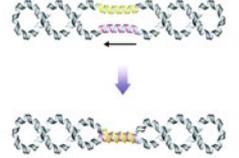
Abb. 2.4 DNA in A-, B- und Z-Konformation. **a** In der rechtsdrehenden B-Konformation verbindet eine gleichmäßige Linie die Phosphatgruppen; die große und die kleine Furche sind deutlich ausgeprägt (Pfeile). **b** Raumfüllende Modelle der A-, B- und Z-Form der DNA. Diese Formen können in Abhängigkeit des Hydratationszustandes und der Ionenstärke der Umgebung beobachtet werden. Die Unregelmäßigkeit des DNA-Grundgerüsts in der linksdrehenden Z-Konformation ist offensichtlich. Hier ist die Furche tief und erreicht die Helixachse. **c** Ansicht eines DNA-Moleküls (15 bp) mit dem Übergang zwischen der linksdrehenden Z-Form und der rechtsdrehenden B-Form. Zwei Basen an der Übergangsstelle sind aus dem Stapel der Basen herausgedrückt (Adenin und Thymin, Pfeile). Die weiße Linie verbindet die einzelnen Phosphatreste der DNA-Kette. O: rot; N: blau; P: gelb; C: grau. (a, b nach Bergethon 2010, mit freundlicher Genehmigung von Springer; c nach Ha et al. 2005, mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group)

den werden. Die Anordnung der Basenpaare ist übrigens auch in der B-Konfiguration nicht strikt in der gleichen Ebene orientiert, sondern die Ebenen können geringfügig gegeneinander gedreht sein. Hieraus resultieren durch weitere Verschiebungen in der Basenanordnung und des Zucker-Phosphat-Rückgrats sequenzspezifische Unregelmäßigkeiten in der Doppelhelix.

In allen bisher beschriebenen Strukturformen der DNA ist die Doppelhelix **rechtsgewunden**, d. h. sie ist im Uhrzeigersinn gedreht, unabhängig davon, ob man von oben oder von unten auf das korkenzieherartig gedrehte Molekül schaut. Eine **Links-drehung** hingegen findet man bei der **Z-DNA-Konfiguration** (Abb. 2.4). Der Name Z-DNA leitet sich von der Zick-Zack-Struktur (engl. *zigzag*) ab, die die Phosphatgruppen an der Außenseite der Doppelhelix bilden, wenn man sie sich untereinander verbunden vorstellt. Bei der B-DNA hingegen zeigen sie sich in einer glatten, schneckenartig um die Doppelhelix gewundenen Linie. Z-DNA kann entstehen, wenn Pyrimidin- und Purinbasen in einem Strang miteinander abwechseln, z. B. also viele GCGCGCGC-Wiederholungen. Auch in dieser Form stehen die Basenpaare nicht senkrecht zur Achse der Doppelhelix, sondern in einem Winkel von 9° . Der Abstand der Basen voneinander ist noch größer als in der A-Konfiguration und beträgt 12 Basen pro Helixwindung. Eine volle Windung erfordert 4,56 nm, und der Durchmesser beträgt nur 1,85 nm, das Molekül ist also länger und dünner. Die Struktur der Z-DNA ist somit viel gestreckter als die der B-DNA. Das hat auch zur Folge, dass die große Furche beinahe völlig zugunsten einer relativ tiefen kleinen Furche verschwindet. 26 Jahre nach der ersten Beschreibung der Z-DNA durch Wang und seine Mitarbeiter (1979) wurde der Übergangsbereich zwischen der

B- und Z-Form kristallisiert (Ha et al. 2005). Dabei zeigte sich, dass zwei Basen aus der Helix herausragen und damit für verschiedene Modifikationen besonders leicht zugänglich sind (Abb. 2.4c).

Unter den üblichen physiologischen Bedingungen ist die B-Form energetisch begünstigt. Allerdings wird die Z-Form nicht nur durch die oben erwähnten GC-haltigen Sequenzen stabilisiert, sondern auch durch Anlagerungen von Kationen wie Spermin und Spermidin, die Methylierung des Cytosin-Restes sowie besondere Formen der negativen Überspiralisierung (engl. *supercoiling*). Eine besondere biologische Bedeutung der Z-DNA blieb aber lange unklar; heute erscheint es jedoch als gesichert, dass die Z-Form eine wichtige Rolle in der Transkription spielt (Abschn. 3.3). Es gibt offensichtlich in vielen Genen definierbare Sequenzelemente (engl. *Z-DNA forming regions*, ZDR), die die Ausbildung von Z-DNA in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes begünstigen. Weiterhin wurde in der Folge eine Reihe von Proteinen identifiziert, die spezifisch an DNA in der Z-Form binden. Das bekannteste ist ADAR1, eine Adenosin-Desaminase (engl. *adenosine deaminase*, *RNA-specific*), die eine spezifische Funktion beim Editieren von RNA-Molekülen ausübt (Abschn. 3.3.6). Die Bindung an die Z-DNA erfolgt dabei über eine spezifische Z-DNA-Bindungsdomäne der Proteine. Auch manche Virus-Proteine verfügen über eine Z-DNA-Bindungsdomäne, die damit an offene Transkriptionsstartpunkte binden und so die Transkription zellulärer Gene abschalten können. Hier eröffnen sich neue Möglichkeiten einer antiviralen Therapie.

Struktur	Konformation	Voraussetzungen	Sequenz
Haarnadelstruktur		direkte Wiederholungen	<pre>CNGCNGCNG CNGCNGCNG</pre>
DNA-Entwindungselement		AT-reiche Regionen	<pre>ATTCTATTCT TAAGATAAGA</pre>
Tetraplex		Einzelstrang Oligo-G-Bereiche	<pre>CGGCGGCGG GCCGCCGCC</pre>
Dreifachhelix		RY spiegelbildliche Wiederholungen	<pre>GAAGA AGAAG CTTCT TCTTC</pre>
Klebrige DNA		2 GA-reiche Abschnitte direkte Wiederholungen	<pre>GAAGAAGAAG CTTCTTCTT</pre>

■ **Abb. 2.5** Besonders Wiederholungssequenzen neigen zu Anordnungen, die nicht der üblichen B-Konformation entsprechen. Haarnadelstrukturen entstehen durch direkte Wiederholungssequenzen (N in der Sequenz: jede Base). Wiederholungen der Sequenz CGG bilden besonders stabile Haarnadelstrukturen aus. AT-reiche Regionen (z. B. am Startpunkt der DNA-Replikation) können sich leicht öffnen und werden als Entwindungselemente bezeichnet. Tetraplexe bilden sich an G-reichen Sequenzen und führen zu einem stabilen G-Quartett aus vier DNA-Strängen. Eine Dreifachhelix kann leicht durch lange Stränge spiegelbildlicher Wiederholungen von Purin-Pyrimidin-Sequenzen gebildet werden (R: Purine, A oder G; Y: Pyrimidine, T oder C); die Wiederholung von GAA-TTC ist häufig an der Regulation der Genexpression beteiligt. Klebrige DNA wird durch sehr lange GAA-TTC-Wiederholungseinheiten hervorgerufen und führt zu einer sehr stabilen hantelförmigen Struktur, die auch durch Erhitzen auf 80 °C nicht aufgebrochen werden kann. (Nach Wells et al. 2005, mit freundlicher Genehmigung der Autoren)

☞ Es wurde eine Reihe weiterer DNA-Strukturen beobachtet, die nicht der üblichen B-Konformation entsprechen (■ Abb. 2.5). Schon 1957 wurde von einer DNA berichtet, die aus einer Dreifachhelix besteht; besonderes Sequenzmerkmal sind hier sehr lange Bereiche von spiegelbildlichen Wiederholungseinheiten, die abwechselnd aus Purinen und Pyrimidinen gebildet werden. Weitere mögliche Formen sind Haarnadelstrukturen, Entwindungselemente, Tetraplexe und hantelförmige klebrige DNA-Strukturen. Es gibt inzwischen zahlreiche Hinweise darauf, dass diese Strukturen an verschiedenen genetischen Prozessen beteiligt sind, z. B. der Regulation der Replikation (► Abschn. 2.2), Transkription (► Abschn. 3.3) und Rekombination (► Abschn. 4.4.2 und ► Abschn. 6.3.3), aber auch häufig zu Instabilitäten der DNA führen, die sich als Mutationen manifestieren können (► Kap. 10). Eine lesenswerte aktuelle Übersicht über diese Phänomene geben Bacolla und Wells (2009).

➤ **Die DNA-Doppelhelix kann in unterschiedlichen Strukturformen vorliegen. Normalerweise bildet sie die rechtsgewundene B-Konfiguration aus. Bei bestimmten Basenfolgen und in bestimmten Stoffwechselsituationen kann sie jedoch eine linksgewundene Z-Konfiguration annehmen. Das hat strukturelle Konsequenzen, da die Doppelhelix in einen gestreckteren Zustand übergeht und die Vertiefungen an der Außenseite der Doppelhelix ihre Struktur verändern.**

Besonderes Interesse findet auch die Eigenschaft der DNA, **kurvenförmige Molekülbereiche** (engl. *curved DNA*) ausbilden zu

können (■ Abb. 2.6). Man hat solche DNA-Sequenzen aufgrund ihrer besonderen elektrophoretischen Eigenschaften entdeckt. Sie wandert nämlich bei der elektrophoretischen Trennung im Gel langsamer als es ihrer eigentlichen Größe entspricht. Das ist auf die veränderte sterische Struktur des DNA-Moleküls zurückzuführen, die die Wanderung durch die Poren eines Gels behindert. Die Biegung der Doppelhelix in eine kurvenförmige Gestalt wird durch die Basenfolge verursacht. Bestimmte Basenfolgen führen zu einer Änderung der Drehung der Basenpaare gegeneinander, da sonst sterisch unzulässige Überlappungen entstehen. Diese Drehung der Basen führt zu einer Abweichung von der B-Konfiguration, die an den Übergangsstellen einen Knick (engl. *kink*) in der Richtung der Doppelhelix und damit eine Abweichung ihrer Längsachse von der vorherigen Richtung verursacht. Insbesondere AA-Dinukleotide induzieren eine gebogene DNA-Struktur, wobei die Biegung in einer Ebene liegt, wenn sie in regelmäßigen Abständen relativ zur Doppelhelixwindung (z. B. alle 10 bis 11 Basenpaare) auftreten. Ähnliche Effekte werden noch für bestimmte andere Dinukleotide (z. B. AG oder GA) beobachtet, aber auch längere Sequenzeinheiten können Richtungsveränderungen bedingen.

Die funktionelle biologische Bedeutung solcher gebogenen DNA-Doppelhelices ist bisher nicht sehr gut verstanden. Es gibt Hinweise darauf, dass sie wesentliche Bedeutung für die Bindung (bzw. Verhinderung der Bindung) bestimmter Proteine haben. Dementsprechend hat man auch beobachtet, dass gebogene DNA-Bereiche Einfluss auf die Transkription (► Abschn. 3.3) und Rekombination (► Abschn. 4.4.2 und ► Abschn. 6.3.3) ausüben können.

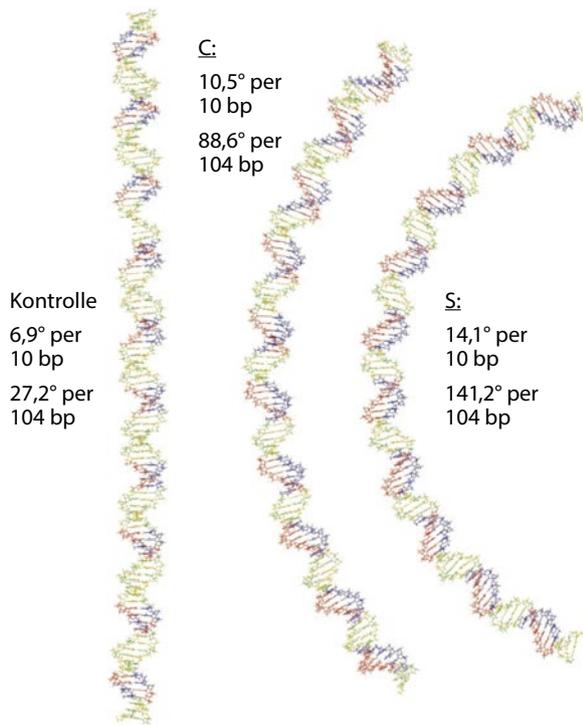


Abb. 2.6 Gebogene DNA-Struktur (*curved DNA*). DNA-Moleküle mit einer Länge von 104 bp werden hinsichtlich ihrer Krümmung verglichen: Alle Moleküle bestehen aus 10-maligen Wiederholungen einer Sequenz, wobei an den Positionen 21, 42, 63 und 84 jeweils einzelne Basenpaare eingefügt wurden, um so eine 10,5-bp-Wiederholung zu erhalten (Kontrolle: GCGAATTCGC, C: GCAAAAAGC, S: GCGAAAAC). In Abhängigkeit von der Sequenz wird eine deutliche Krümmung der DNA erzielt. Rot: Adenosin; blau: Thymin; gelb: Guanosin; grün: Cytidin. (Nach Strahs und Schlick 2000, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Aufgrund ihrer vielfältigen strukturellen Variabilität entwickelt sich die DNA zu einem idealen Molekül in der Nanotechnologie. Genetiker und Biochemiker haben DNA-Sequenzen und Strukturen mit neuen funktionellen Eigenschaften entdeckt, die die Expression bestimmter Gene verhindern oder Makromoleküle bei sehr niedrigen Konzentrationen entdecken können. Physikochemiker und Computerspezialisten können starre DNA-Strukturen konstruieren, die als Gerüst für den Aufbau von Material im molekularen Maßstab dienen; sie können einfache DNA-Rechenmaschinen bauen, Diagnostik-Automaten und DNA-Motoren. Die Verbindung des biologischen und technischen Fortschritts eröffnet ein großes Potenzial für die Elektronik sowie für therapeutische und diagnostische Anwendungen (Saccà und Niemeyer 2012).

DNA erweist sich trotz ihrer einförmigen chemischen Struktur als ein sehr flexibles Molekül, dessen spezifische Struktureigenschaften innerhalb kleiner Bereiche des Makromoleküls durch bestimmte Basenfolgen verändert werden können.

Bereits aus diesen wenigen Beispielen wird deutlich, dass die DNA-Doppelhelix bei genauerer Betrachtung keine einförmige, wenig differenzierte Struktur ist, sondern einer **Vielfalt von Strukturveränderungen** unterliegen kann, die im Zusammen-

hang mit der zellulären Funktion der DNA Bedeutung gewinnen (► Abschn. 7.3).

Das Strukturmodell der DNA-Doppelhelix (■ Abb. 2.2) lässt erkennen, dass der Außenbereich der Doppelhelix sehr wesentlich durch das Phosphodiester-Zucker-Rückgrat der DNA bestimmt wird. Der hohe Gehalt an negativ geladenen Phosphatgruppen, die nicht durch entsprechende positive Ladungen kompensiert werden, verleiht der DNA eine stark negative Gesamtladung. Diese physikalische Eigenschaft wird uns in Zusammenhang mit der Art der Verpackung der DNA im Zellkern noch näher interessieren (► Abschn. 6.2.2).

Ein besonders wichtiger Aspekt der Struktur der DNA-Doppelhelix ist deren Aufbau aus **zwei antiparallel orientierten Einzelsträngen**. Dem DNA-Modell können wir entnehmen, dass im **Phosphat-Zucker-Rückgrat** der DNA-Ketten die einzelnen Desoxyribosemoleküle durch **Phosphodiesterbrücken** zwischen ihrer 3'-OH-Gruppe und der 5'-OH-Gruppe des folgenden Desoxyribosemoleküls miteinander verbunden sind (■ Abb. 2.1d). Hierdurch entsteht eine Asymmetrie innerhalb der DNA-Kette, die zu einer 3'→5'-Orientierung der Desoxyribosemoleküle führt. Das Schema in ■ Abb. 2.2 lässt auch erkennen, dass die miteinander zur Doppelhelix vereinigten DNA-Ketten gegenläufig, also antiparallel angeordnet sind: Der 3'→5'-Orientierung des einen Strangs steht eine 5'→3'-Orientierung des anderen Strangs gegenüber. Diese strukturelle Eigenschaft der Doppelhelix muss uns deutlich vor Augen stehen, da sie wichtige biologische Konsequenzen hat, die später im Einzelnen erörtert werden.

Die beiden gepaarten Nukleinsäurestränge sind in entgegengesetzter Richtung orientiert, haben also den Charakter antiparalleler Ketten.

2.1.4 Physikalische Eigenschaften der Nukleinsäuren

In den 1950er-Jahren hatte man festgestellt, dass die DNA-Doppelhelix nicht nur denaturiert – also in Einzelstränge zerlegt – werden kann, sondern dass sich DNA-Einzelstränge unter geeigneten Ionen- und Temperaturbedingungen wieder zu einer Doppelhelix vereinigen können. Man bezeichnet diesen Vorgang als **Renaturierung** oder Reassoziierung. Die durch Renaturierung gebildeten Moleküle nennt man auch **Hybridmoleküle**, und man bezeichnet den Vorgang der Doppelstrangbildung als **Hybridisierung**. Der Begriff Hybridmolekül soll im Folgenden auf alle durch Hybridisierung bzw. Renaturierung erhaltenen Doppelstrangmoleküle angewandt werden, unabhängig davon, ob die Doppelstränge den Ausgangsmolekülen entsprechen oder nicht. Solche Hybridmoleküle können also aus vollständig komplementären DNA- und RNA-Einzelsträngen oder aus zwei komplementären RNA-Strängen gebildet werden, oder sie können auch aus Nukleinsäuresträngen entstehen, die nicht vollständig komplementär sind. In den Hybriddoppelsträngen befinden sich dann ungepaarte Abschnitte – man spricht von Fehlpaarungen (engl. *mismatching*). Einen solchen Doppelstrang nennt man auch eine **Heteroduplex**.

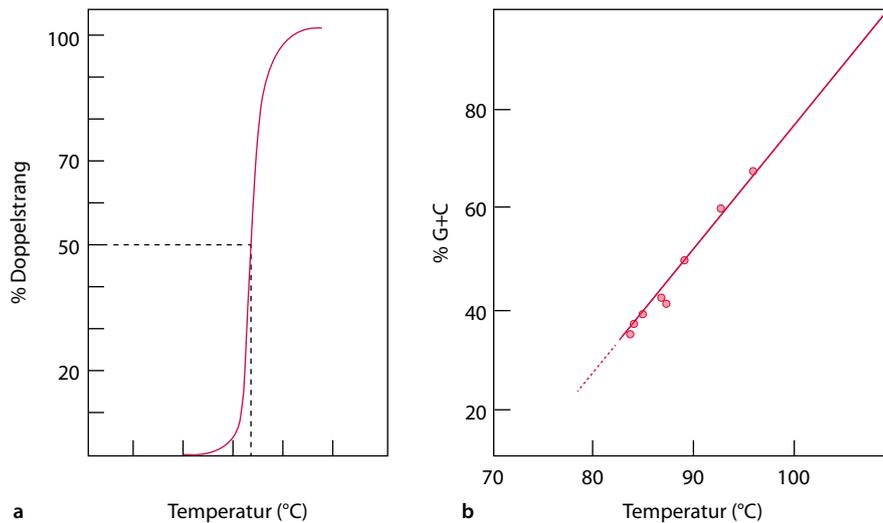


Abb. 2.7 Schmelzkurve von DNA. **a** Doppelsträngige Nucleinsäuren können durch Erhitzung in Einzelstränge aufgeschmolzen werden. Die Temperatur, bei der 50% der Moleküle als Einzelstrang vorliegen, ist der Schmelzpunkt (T_m). **b** Der Schmelzpunkt ist vom GC-Gehalt der Nucleinsäuren abhängig. Außerdem schmelzen RNA/RNA-Doppelstränge bei höherer Temperatur als sequenzgleiche DNA/DNA-Doppelstränge. DNA/RNA-Hybridstränge liegen in ihrer Schmelztemperatur zwischen der von Doppelstrang-DNA und -RNA. (Nach Marmur und Doty 1962, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Da die **Stabilität** der Doppelhelix durch die Basenpaarung bedingt ist, sind solche ungenau zusammengefügte Heteroduplexstränge weniger stabil als vollständig gepaarte Moleküle. Die Stabilität eines Doppelstrangs kann beispielsweise durch thermische Denaturierung ermittelt werden, da der Verlauf der temperaturabhängigen Denaturierung neben der Basenzusammensetzung von der Stabilität der Doppelhelix, also vom Anteil gepaarter und ungepaarter Basenpaare abhängig ist. Messen kann man Denaturierung durch Photometrie im Bereich des Absorptionsmaximums von Nucleinsäuren, das bei 260 nm liegt. Die Absorption von doppelsträngigen Nucleinsäuren ist bei einer Wellenlänge von 260 nm niedriger als die von Einzelsträngen. Aus einer thermischen Schmelzkurve (Abb. 2.7) kann man daher Rückschlüsse auf die Genauigkeit der Basenpaarung von Doppelsträngen erhalten, die in einem Hybridisierungsexperiment gebildet wurden. Je größer der Anteil ungepaarter Basenpaare ist, desto niedriger ist der **Schmelzpunkt** – die Temperatur, bei der 50% der Doppelstränge geschmolzen sind.

➤ **Einzelstrang-DNA lässt sich durch Basenpaarung komplementärer Stränge zur Doppelhelix renaturieren. Solche Hybridmoleküle können auch aus nicht vollständig komplementären DNA-Molekülen entstehen und weisen dann ungepaarte Abschnitte auf. Die entstandenen Doppelstränge werden in solchen Fällen als Heteroduplex bezeichnet. Das Ausmaß der Fehlpaarungen lässt sich durch Analyse der thermischen Schmelzeigenschaften der Doppelhelix ermitteln, da die Doppelhelix mit einem zunehmenden Anteil ungepaarter Regionen instabiler wird.**

Die Möglichkeit der **Hybridisierung von Nucleinsäuren** hat eine zentrale Bedeutung für die Aufklärung der Genomstruktur, für die Analyse von Genen, ihrer Feinstruktur und ihrer Lokalisation im Genom erlangt. Ein beachtlicher Teil moderner gentechnologischer Methodik macht Gebrauch von der Grundeigenschaft der Nucleinsäuren, sich in komplementären Abschnitten zu Hybriden oder sogar in Tripelhelixstrukturen zu vereinigen.

Für das Verständnis der allgemeinen Struktur des eukaryotischen Genoms haben **Renaturierungsversuche** mit genomischer DNA eine grundlegende Rolle gespielt. Von ausschlaggebender Bedeutung war die Erkenntnis, dass die Kinetik der Bildung von Doppelhelices aus Einzelsträngen Information über die **Komplexität eines Genoms**, also letztlich über die Anzahl unterschiedlicher DNA-Sequenzen, geben kann. Wie wir sehen werden, unterscheidet sich die so ermittelte Komplexität eines Genoms mitunter erheblich von der tatsächlichen Größe des Genoms in Nucleotiden, wie man sie aus der photometrisch oder anderweitig ermittelten DNA-Menge im haploiden Genom (einfacher Chromosomensatz) errechnen kann. Man spricht daher auch von **kinetischer Komplexität** eines Genoms (im Gegensatz zur Genomgröße, die stets die Menge von DNA im haploiden Genom angibt).

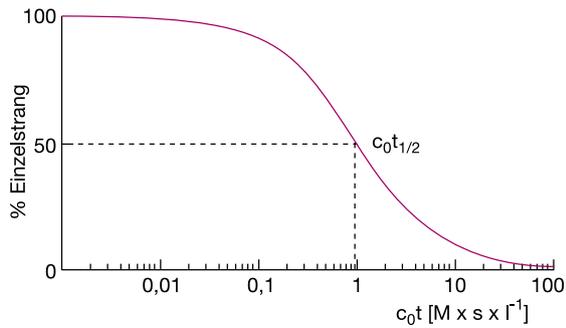
Die Bildung einer DNA-Doppelhelix aus Einzelsträngen folgt der Kinetik einer **bimolekularen chemischen Reaktion** (Reaktion 2. Ordnung), ist also konzentrations- und zeitabhängig. In der Reaktionsgleichung

$$-\frac{dc}{dt} = k_2[c]^2$$

bedeutet k_2 die Reaktionskonstante, die ein wichtiger Parameter für die Berechnung der kinetischen Komplexität einer DNA ist. Die Molarität von Nucleotiden in der Einzelstrangnucleinsäure wird durch c angegeben, und t ist die Zeit in Sekunden. Wenn man die Reaktionsgleichung in folgender Weise umformt, kann man ihre grafische Auswertung vereinfachen:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{1 + k_2 c_0 t}$$

In Abb. 2.8 ist die **Reaktionskinetik** auf der Grundlage dieser Gleichung als Prozentsatz der Renaturierung in Abhängigkeit vom Produkt aus der Anfangskonzentration c_0 (von Nucleotiden in $M \times l^{-1}$ in den Nucleinsäureeinzelsträngen) und der Zeit t (in s) in einer semilogarithmischen Grafik dargestellt. Der Vorteil dieser Darstellungsweise ist, dass Reaktionskinetiken ohne eine Korrektur für unterschiedliche Anfangskonzentrationen

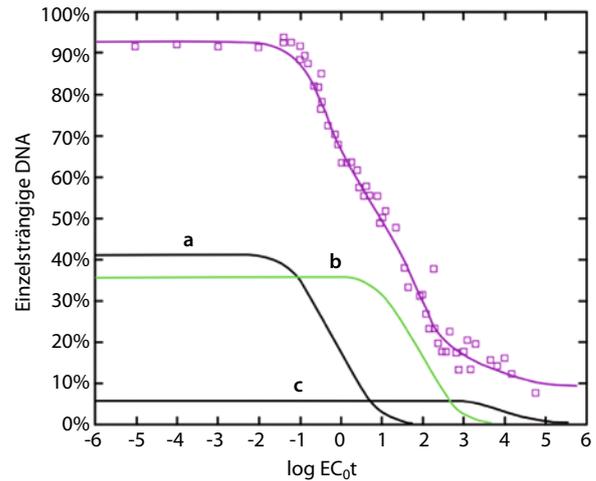


■ **Abb. 2.8** Renaturierungskinetik der DNA. Diese Darstellung des Verlaufs einer chemischen Reaktion 2. Ordnung wird als c_0t -Kurve (gesprochen cot) bezeichnet. Sie ermöglicht den direkten Vergleich der Reaktionskinetiken verschiedener DNA-Proben, da in der Darstellung Unterschiede in der Reaktionszeit und DNA-Konzentration (durch die Bildung des Produktes aus Anfangskonzentration der denaturierten Nukleotide $[c_0]$ und Zeit $[t]$) nicht zur Geltung kommen. Im $c_0t_{1/2}$ -Punkt sind 50% der Nukleotide zu Doppelsträngen renaturiert. Unterschiede verschiedener DNA-Proben im $c_0t_{1/2}$ -Wert zeigen direkt den Unterschied in der Komplexität der DNA an. Abweichungen vom sigmoiden Kurvenverlauf, wie er für die ideale Reaktion 2. Ordnung charakteristisch ist, zeigen die Zusammensetzung der DNA-Probe aus mehreren Fraktionen unterschiedlicher kinetischer Komplexität an, d. h. sie deuten auf das Vorhandensein repetitiver DNA-Sequenzen in der DNA-Probe

von Einzelsträngen direkt vergleichbar sind, da sich Anfangskonzentration und Reaktionszeit umgekehrt proportional zueinander verhalten und somit durch die Darstellung des Produktes beide Größen als variable Einzelparameter in der Grafik eliminiert sind. Aus ■ Abb. 2.8 ist auch zu erkennen, dass mithilfe des $c_0 \times t$ -Wertes, bei dem die Hälfte der Einzelstränge zum Doppelstrang reassoziert ist (genannt **$c_0t_{1/2}$ -Wert**), die relative kinetische Komplexität eines Genoms beschrieben werden kann. Hat man mehrere Reaktionskinetiken unter gleichen Bedingungen (Ionenstärke, Temperatur, Länge der renaturierenden Stränge) ermittelt, so kann man durch Vergleich der $c_0t_{1/2}$ -Werte der verschiedenen Reaktionskinetiken direkte Informationen über die relativen kinetischen Komplexitäten der untersuchten Genome erhalten.

➤ **Die Bildung einer Doppelhelix aus komplementären Nukleinsäureeinzelsträngen erfolgt reaktionskinetisch als bimolekulare Reaktion. Sie ist damit von der Konzentration der komplementären Stränge und der Reaktionszeit abhängig. Das gestattet es, durch Messung der Renaturierungskinetik Aufschlüsse über die Komplexität der renaturierenden Nukleinsäuresequenzen zu erhalten.**

Ein historisches Beispiel für die genomische DNA der Zwiebel (*Allium cepa*) gibt ■ Abb. 2.9. Dabei fällt auf, dass der Reaktionsverlauf nicht einer einfachen sigmoiden Kurve folgt. Vielmehr verläuft er flacher – oder sogar in mehreren Stufen. Dieses Reaktionsverhalten ist damit zu erklären, dass ein Teil der DNA-Sequenzen im haploiden Genom nicht nur einmal, sondern mehrfach vorhanden ist. Diese mehrfach vorhandenen DNA-Sequenzen wurden **repetitive DNA-Sequenzen** genannt (oder Wiederholungssequenzen; engl. *repetitive* oder *repeated DNA*). Der Reaktionsverlauf erklärt sich aus der Überlagerung der Re-



■ **Abb. 2.9** Eine c_0t -Kurve von genomischer DNA der Küchenzwiebel (*Allium cepa*). Die Analyse der DNA-Renaturierungskinetiken ist eine wichtige analytische Methode, um schnell einen Überblick über die Komplexität eines Genoms zu erhalten. Dazu wird die DNA in Fragmente von ~ 300 bp gespalten, anschließend mit Hitze denaturiert und durch langsames Abkühlen wieder renaturiert. Die hier dargestellte Renaturierungskinetik lässt den Schluss zu, dass das Genom der Zwiebel aus vier Komponenten besteht: zunächst palindromische DNA, die sich unabhängig von der DNA-Konzentration zurückfaltet (etwa 7,2%), und außerdem Fragmente, die nicht reagieren (9,3%). Drei Komponenten können aber genauer unterschieden werden und sind in den Einzelkurven a–c dargestellt: (a) hochrepetitive Sequenzen (Anteil: 41,2%), (b) mittelrepetitive Sequenzen (36,4%) und (c) Einzelkopiesequenzen (5,9%), die im Wesentlichen den codierenden Anteil enthalten. (Nach Stack und Comings 1979, mit freundlicher Genehmigung von Springer)

aktionskurven verschiedener DNA-Fraktionen, deren Einzelsequenzen mit jeweils spezifischer und unterschiedlicher Häufigkeit im haploiden Genom vorhanden sind. Die detaillierte Untersuchung dieser unterschiedlichen DNA-Fraktionen hat tief gehende Einblicke in die Organisation des eukaryotischen Genoms vermittelt.

Einige wichtige Gesichtspunkte der Zusammensetzung des Genoms aus Fraktionen mit unterschiedlicher Wiederholungshäufigkeit lassen sich direkt aus den Reaktionskinetiken ablesen. So ist festzustellen, dass in praktisch allen untersuchten Genomen neben repetitiven DNA-Sequenzen auch nicht wiederholte **Einzelkopiesequenzen** (engl. *unique sequences*) vorkommen. Die Reaktionskinetiken verdeutlichen weiterhin, dass jeder untersuchte Organismus ein ihm **eigentümliches Muster repetitiver Sequenzen** besitzt. Obwohl im Allgemeinen die Regel gilt, dass bei steigender Genomgröße auch der Anteil repetitiver Sequenzen steigt, kann das im Einzelfall nicht zutreffen. Über die Häufigkeitsverteilungen verschiedener repetitiver DNA-Fraktionen lassen sich selbst bei nahe verwandten Arten keine Vorhersagen machen, da sie sehr starken Veränderungen unterworfen sind.

➤ **Das Genom von Eukaryoten zeichnet sich durch den Besitz von Einzelkopie-DNA-Sequenzen und von repetitiven DNA-Sequenzen aus. Der Anteil beider Arten von Sequenzen ist starken Schwankungen unterworfen und variiert selbst zwischen nahe verwandten Arten.**

2.2 Die Verdoppelung der DNA (Replikation)

Die Befunde von Avery und seinen Mitarbeitern sowie von Hershey und Chase (► Abschn. 2.1.1) gaben eindeutige Hinweise darauf, dass nicht Proteine, sondern DNA die für die Vererbung verantwortliche chemische Verbindung ist. Fragt man nun nach der biologischen Bedeutung der DNA, so bietet es sich an, nach einer zentralen Eigenschaft des Erbmaterials zu fragen: Es muss sich im Zusammenhang mit Zellteilungen identisch verdoppeln können, um zu gewährleisten, dass alle nachfolgenden Generationen von Zellen mit der gleichen Erbinformation ausgestattet werden. Die Fähigkeit zur **identischen Verdoppelung** des Erbmaterials muss daher als eine seiner entscheidenden Grundeigenschaften angesehen werden.

Das **Watson-Crick-Modell** der DNA-Doppelhelix ist mit einer solchen Eigenschaft voll in Einklang zu bringen, wie beide Autoren selbst herausgestellt haben: »*We have recently proposed a structure for the salt of deoxyribonucleic acid which, if correct, immediately suggests a mechanism for its selfduplication*« (Watson und Crick 1953a). Trennen sich die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix durch Aufhebung der Basenpaarungen, so kann jeder der beiden Stränge als **Matrize** (engl. **template**) für die Synthese eines neuen komplementären Strangs dienen, sodass nach der Neubildung beider komplementärer Stränge zwei neue, strukturell aber völlig identische DNA-Doppelhelices vorliegen. Durch die genau festgelegten Möglichkeiten der Basenpaarung, nach denen sich ein Thymin jeweils nur mit einem Adenin und ein Guanin stets nur mit einem Cytosin paaren kann, ist auch die Abfolge der Basen in den neu synthetisierten Strängen identisch. Da nach diesem Modell jeweils einer der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix bereits vorhanden ist, der andere aber neu gebildet wird, spricht man von einer **semikonservativen Replikation** der DNA.

► **Die Struktur der DNA lässt erkennen, dass ihre Verdoppelung durch Neusynthese jeweils eines neuen, komplementären Strangs an jedem der beiden vorhandenen Stränge der Doppelhelix erfolgt. Dieser Vorgang wird als semikonservative Replikation bezeichnet.**

2.2.1 Semikonservative Replikation

Experimentell wurde das Modell einer semikonservativen Replikation der DNA auf zwei Ebenen bestätigt. An bakterieller DNA demonstrierten Matthew **Meselson** und Franklin W. **Stahl** 1958 den semikonservativen Charakter der Replikation mittels analytischer Ultrazentrifugationstechniken. Ein Jahr zuvor stellte Herbert **Taylor** cytologische Untersuchungsbefunde vor, die er an Pflanzenzellen erhalten hatte, aus denen er den gleichen Schluss der semikonservativen Replikation der DNA in eukaryotischen Zellen zog. Beide Befunde sollen im Folgenden in ihren Einzelheiten besprochen werden.

Die Experimente von Meselson und Stahl wurden an dem Bakterium *Escherichia coli* durchgeführt. Grundlage dieser Experimente war die Überlegung, dass bei einer geeigneten chemi-

schen Kennzeichnung des DNA-Einzelstrangs, der nach dem Watson-Crick-Modell während der Replikation neu synthetisiert wird, nach zwei Verdopplungsrunden die Hälfte der DNA-Moleküle diese chemischen Markierungen enthalten müsste, während die andere Hälfte völlig frei von solchen Markierungen sein sollte (■ Abb. 2.10a). Zur chemischen Markierung von DNA während der Neusynthese erweist sich der Gebrauch des schweren Stickstoffisotops ^{15}N geeignet, da es in Form von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ dem Kulturmedium beigefügt werden kann und dann in die heterozyklischen Basen der DNA eingebaut wird. Die Schwimmdichte (engl. *buoyant density*) der DNA wird hierdurch erhöht. Meselson und Stahl haben sich dieses Verfahren zunutze gemacht und Bakterien zunächst für 14 Generationen in einem ^{15}N -Medium wachsen lassen, sodass die bakterielle DNA mit diesem Stickstoffisotop gesättigt war. Nun wurde das Medium ausgewechselt, und die Bakterien wurden in einem Medium weiter gezüchtet, das einen Überschuss an $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ sowie ^{14}N -haltige Basen enthielt, sodass bei allen weiteren Replikationsrunden der DNA nur noch ^{14}N -haltige Basen in die DNA eingebaut wurden. Entscheidend für die weitere Analyse war nun, dass man ^{15}N - und ^{14}N -haltige DNA-Stränge aufgrund des Dichteunterschieds der N-Isotope durch **Dichtegradienten-Gleichgewichtszentrifugation** voneinander trennen und somit ihre relativen Mengen innerhalb der Gesamt-DNA ermitteln kann.

Führt man eine solche Analyse nach einer Generation Wachstum in ^{14}N -haltigem Medium durch, so findet man, dass die Doppelhelix im Gleichgewichtsgradienten eine Schwimmdichte besitzt, die einen Mittelwert zwischen der Dichte völlig ^{14}N -markierter DNA und völlig ^{15}N -markierter DNA darstellt (■ Abb. 2.10b). In diesem Fall müssen also die Hälfte der Basen das schwerere Isotop, die andere Hälfte das leichtere Isotop besitzen. Nach einer weiteren Generation Wachstum der Bakterien im ^{14}N -haltigen Medium weist nur noch eine Hälfte der DNA die mittlere Dichte auf, während die andere Hälfte durch eine niedrige Dichte gekennzeichnet ist. Diese Beobachtungen sind nur mit der Erklärung vereinbar, dass alle neu synthetisierten DNA-Stränge das ^{14}N -Isotop tragen und mit jeweils einem der alten (^{15}N -haltigen) DNA-Stränge gepaart sind. Meselson und Stahl (1958) haben ihre Ergebnisse in den folgenden drei Schlüssen zusammengefasst:

- »*The nitrogen of a DNA molecule is divided equally between two subunits which remain intact through many generations.*«
- »*Following replication, each daughter molecule has received one parental subunit.*«
- »*The replicative act results in a molecular doubling.*«

Die Wissenschaftler kamen also zu dem Schluss, dass die Ergebnisse der gegenwärtigen Experimente genau mit den Erwartungen aus dem Watson-Crick-Modell für DNA-Replikation übereinstimmen (»*The results of the present experiments are in exact accord with the expectations of the Watson-Crick model for DNA duplication*«).

Einen ganz ähnlichen Ansatzpunkt zur Beantwortung der Frage, wie die Duplikation des genetischen Materials verläuft, wählte Herbert Taylor 1957 in seinen Experimenten. Im Unterschied zu Meselson und Stahl, deren Versuche biophysikalischer

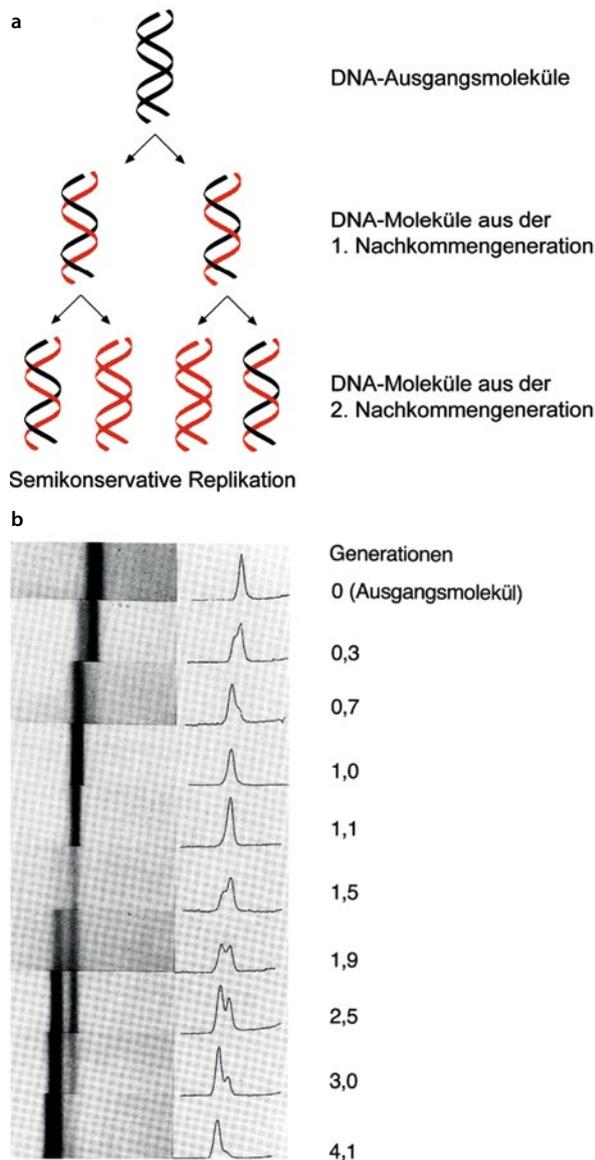


Abb. 2.10 Nachweis der semikonservativen Replikation der DNA durch Meselson und Stahl. **a** Schema der semikonservativen Replikation. Jeder der beiden Tochter-Doppelstränge sollte einen vollständigen, aus dem Ausgangs-Doppelstrang übernommenen Strang (*schwarz*) enthalten sowie einen zweiten, neu synthetisierten Strang (*rot*). In der 1. Generation beträgt das Verhältnis 1:1, in der 2. Generation 1:4. **b** Analyse der Auftrennung von DNA in der analytischen Ultrazentrifuge. Die Schwimmdichte der DNA steigt mit dem Anteil an ^{15}N -markierten Nukleotiden. Markiert man DNA, die ^{15}N -Isotope enthält, über einen oder mehrere Replikationszyklen mit ^{14}N -haltigen Nukleotiden, so werden die ^{15}N -Anteile der Markierung stufenweise verdrängt und die Schwimmdichte der DNA wird geringer. Die Abbildung zeigt die quantitative densitometrische Auswertung dieser Experimente mit Angabe der Anzahl der Zellgenerationen, über die Replikation in ^{14}N -Nukleotide-haltigem Medium erfolgte. (**a** nach Munk 2001, mit freundlicher Genehmigung von Springer; **b** nach Meselson und Stahl 1958, mit freundlicher Genehmigung der Autoren)

Natur waren, führte Taylor seine Versuche unter Verwendung cytologischer Methoden an Wurzelzellen der Pflanze *Bellevia romana* (auch *Hyacinthus romanus*, Hyazinthe) durch. Als wichtige neue cytologische Methode war gerade die Autoradiographie verfügbar geworden (► Technikbox 15). Diese Technik

bietet eine Auflösung, die ausreichend ist, um den Einbau radioaktiver DNA-Vorstufen innerhalb einer einzelnen Chromatide der Chromosomen zu lokalisieren (Chromatiden sind Halb-Chromosomen nach der Verdoppelung im Zellzyklus; ► Abschn. 6.3.1). Besonders geeignet ist für derartige Versuche ^3H -Thymidin, da es ausschließlich in DNA eingebaut wird und diese damit spezifisch markiert. Lässt man Zellen in Medium mit radioaktivem Thymidin wachsen, so findet man Radioaktivität ausschließlich in neu replizierter DNA der Chromosomen.

Die Versuche von Taylor entsprechen damit weitgehend denen von Meselson und Stahl: Es werden zunächst markierte Vorstufen während der Replikation in die DNA eingebaut (bei Meselson und Stahl ^{15}N , bei Taylor ^3H), und anschließend wird deren Verteilung (bei Meselson und Stahl durch Gleichgewichtszentrifugation von isolierter DNA in der Ultrazentrifuge, bei Taylor durch Autoradiographie von Chromosomen) in anschließenden Replikationszyklen der DNA in nicht markierten Medien untersucht. Während Meselson und Stahl von DNA-Doppelhelices ausgingen, die durch kontinuierliches Wachstum in markiertem Medium durchgehend ^{15}N -markiert waren, erlaubte Taylor die ^3H -Markierung während der Phase des Zellzyklus (► Abschn. 6.3), in dem die DNA verdoppelt wird. Das gestattet es, bereits nach einer weiteren Replikation in nicht radioaktivem Kulturmedium Hinweise auf die Art der Replikation zu erhalten.

Die Ergebnisse Taylors sind in **Abb. 2.11** schematisch zusammengefasst. Man beobachtet nach der Replikation in ^3H -Thymidin-haltigem Medium in der folgenden Metaphase zunächst ausschließlich vollständig markierte Chromatiden. Bereits nach einer weiteren Phase der DNA-Replikation in unmarkiertem Medium findet man, dass alle Chromosomen eine unmarkierte und eine markierte Chromatide besitzen. Nach einer weiteren Replikationsrunde ist die Hälfte der Chromosomen in beiden Chromatiden unmarkiert, während die andere Hälfte der Chromosomen jeweils eine markierte Chromatide aufweist. Diese Beobachtungen Taylors und seiner Mitarbeiter lassen sich völlig auf der Basis des Watson-Crick-Modells der DNA-Doppelhelix erklären, wenn man annimmt, dass **jede Chromatide aus einer einzigen DNA-Doppelhelix** besteht. Diese Frage war zur Zeit der Experimente Taylors sehr umstritten, da viele Wissenschaftler aufgrund cytologischer Beobachtungen annahmen, dass Chromatiden aus mehreren durchgehenden Längseinheiten bestehen. Die Experimente Taylors schließen eine solche Chromatidenstruktur zwar nicht grundsätzlich aus, erfordern jedoch für eine solche Erklärung komplizierte zusätzliche Annahmen über die Struktur und Verteilung von Längselementen der Chromatiden. Damit wurden die Beobachtungen Taylors zugleich ein starkes Argument für die Ansicht, dass eine Chromatide aus einer einzelnen DNA-Doppelhelix besteht. Diese Annahme wurde durch viskosimetrische Messungen an DNA von *Drosophila* unterstützt. DNA-Moleküle können in einer Länge isoliert werden, die der Länge einer DNA-Doppelhelix in einer Chromatide entspricht. Heute ist die Ansicht allgemein akzeptiert, dass eine Chromatide aus einer durchgehenden, kovalent geschlossenen DNA-Doppelhelix besteht.

► **Jede Chromatide besteht aus einer DNA-Doppelhelix. Die Doppelhelix ist damit das Grundelement der Chromosomen.**

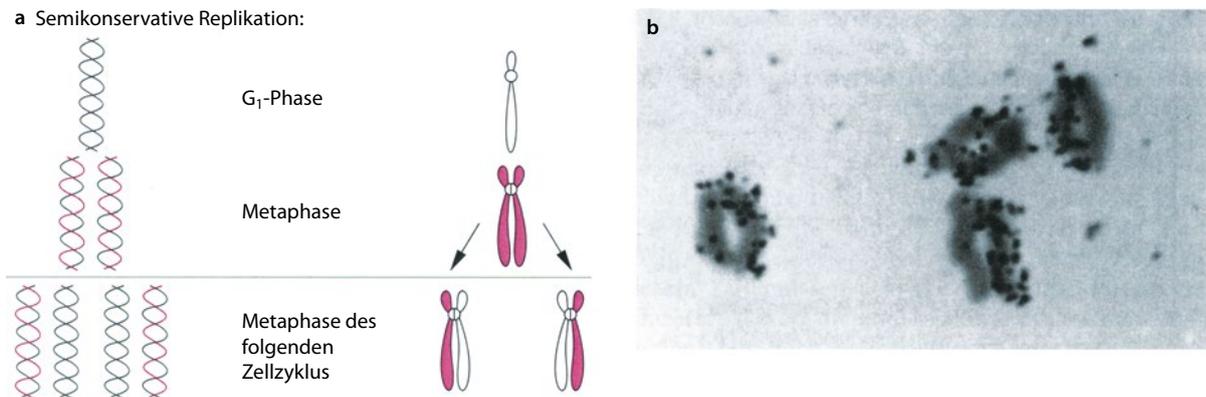


Abb. 2.11 Nachweis der semikonservativen Replikation der DNA durch Taylor und Mitarbeiter (1957) an Chromosomen der Hyazinthe (*Bellevia romana*). Mithilfe von ³H-Thymidin wird eine spezifische radioaktive Markierung der DNA erreicht, die im Autoradiogramm leicht zu lokalisieren ist. Lässt man Zellen für einen Zellzyklus in ³H-Thymidin-haltigem Medium wachsen, so wird die radioaktive Vorstufe während der S-Phase in die DNA eingebaut. **a** Betrachtet man die Metaphasechromosomen in der ersten folgenden Mitose, so findet man ausschließlich einheitlich radioaktiv markierte Chromatiden. Durch Behandlung mit Colchicin erreicht man, dass die beiden Chromatiden eines duplizierten Chromosoms im Centromerbereich zusammenhängen bleiben. Nach einem weiteren Zellzyklus, der in nicht radioaktivem Medium durchlaufen wurde, zeigen die Chromatiden eine Differenzierung hinsichtlich der radioaktiven Markierung. Eine der Chromatiden ist, wie nach dem ersten Zellzyklus, radioaktiv; die andere bleibt jedoch unmarkiert. **b** Bei einer weiteren Verdoppelung in nicht radioaktivem Medium trennen sich diese Stränge, sodass eine unmarkierte und eine halbmarkierte Doppelhelix gebildet werden. (Nach Taylor et al. 1957, mit freundlicher Genehmigung der Autoren)

Die Versuche von Taylor, Meselson und Stahl lieferten den Beweis für die semikonservative Replikation der DNA in Zellen, wie sie nach dem Watson-Crick-Modell als Vermehrungsmechanismus der DNA vorausgesagt worden war. Dieser semikonservative Replikationsmechanismus stellt sicher, dass die Struktur der Doppelhelix, und damit des Erbmaterials, vollständig erhalten bleibt und auf folgende Zellgenerationen – und damit auch auf neue Organismen – übertragen werden kann.

Wenn die beschriebenen Experimente uns auch zeigen, nach welchem Grundprinzip DNA identisch repliziert werden kann, so gewähren sie uns doch noch keinen Einblick in den tatsächlichen molekularen Verlauf der Replikation der DNA in der Zelle. Man muss sich nur vor Augen führen, dass in einigen Organismen, z. B. bei Bakterien und manchen Viren, die DNA als ringförmiges, kovalent geschlossenes Molekül vorliegt oder dass in anderen Fällen die Gesamtmenge an DNA im Genom, also die in einer einzelnen Zelle vorhandene Menge an DNA, eine Länge von einem Meter überschreiten kann, wenn man annimmt, dass die DNA ein einziges kovalentes Molekül darstellt. Selbst wenn es sich bei Eukaryoten um kürzere Moleküle handelt, wie wir schon aus unserer Kenntnis der Existenz mehrerer Chromosomen innerhalb eines Zellkerns ableiten können, bleiben grundlegende Fragen bestehen. Eine dieser Fragen bezieht sich beispielsweise auf einen physikochemischen Gesichtspunkt: Wie können sich die Doppelstränge der DNA im Chromosom während der Replikation voneinander trennen, obwohl hierzu doch eine kontinuierliche Drehbewegung der Doppelhelix erforderlich wäre? Dieser Gesichtspunkt hat in der frühen Diskussion der Frage nach dem Replikationsmechanismus eine wichtige Rolle gespielt. Wir können ihn heute beantworten, da wir wissen, dass im Chromosom Enzyme vorhanden sind, die die DNA öffnen und wieder schließen

können bzw. eine Rotation steuern (Topoisomerasen und Helikasen, Tab. 2.2). Hinzu kommen weitere, weitaus schwieriger zu beantwortende Fragen: Aus der klassischen Cytologie geht hervor, dass DNA ausschließlich im Zellkern vorhanden ist – hier liegt sie aber nicht als isoliertes Molekül vor, sondern ist in den Chromosomen mit Proteinen verbunden. Wie verhalten sich diese Proteine – oder die Chromosomen überhaupt – während der Replikation?

Es hat sich in der Folge gezeigt, dass die molekularen Mechanismen in Pro- und Eukaryoten im Prinzip vergleichbar sind: In beiden Fällen erfolgt die Replikation ausgehend von einem Startpunkt (engl. *origin of replication*) nach beiden Richtungen (bidirektional). Bei *E. coli* ist das Chromosom ringförmig und besitzt nur einen einzigen Replikationsstartpunkt; bei Eukaryoten sind verschiedene Startpunkte über das Chromosom verteilt. Die an der Replikation beteiligten Enzyme und zusätzlichen Faktoren sind bei Pro- und Eukaryoten sehr ähnlich; das Grundprinzip ist in Abb. 2.12 dargestellt. Besonders fünf Aspekte sind für alle Replikationsprozesse wesentlich:

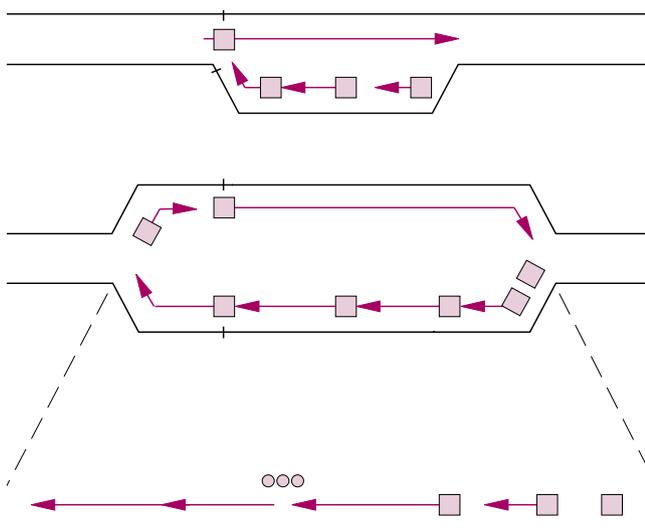
- Grundsätzlich fügen die Enzyme, die einen DNA-Strang auf der Grundlage der Basenkomplementarität in einen zweiten, komplementären Strang kopieren können (**DNA-Polymerasen**), die Nukleotide bei der DNA-Synthese ausschließlich an das 3'-OH-Ende des wachsenden Strangs an. Damit ist ein Wachstum nur in 5'→3'-Richtung möglich. Die Nukleotide liegen dabei als energiereiche Triphosphate vor (dNTPs: Desoxyribonukleotidtriphosphate); bei der Synthese werden zwei Phosphatreste als Pyrophosphat abgespalten. Die freigesetzte Energie wird dazu verwendet, die Phosphodiesterbindungen des Zucker-Phosphat-Grundgerüsts herzustellen.
- Bei der Besprechung der molekularen Struktur der DNA-Doppelhelix haben wir gesehen, dass die Basenpaarung zu

■ **Tab. 2.2** Replikationsproteine in Pro- und Eukaryoten

Funktion	Prokaryoten	Eukaryoten
Erkennung der Startsequenz	DnaA (1 Untereinheit)	ORC (6 Untereinheiten)
Beladende Helikase	DnaC (1 Untereinheit)	CDC6 (1 Untereinheit)
Replikative Helikase	DnaB (1 Untereinheit)	MCM (6 Untereinheiten)
Topoisomerase	Typ I und Typ II, Gyrase	Typ I und Typ II
Einzelstrang-bindendes Protein	SSB (1 Untereinheit)	RP-A (3 Untereinheiten)
Primase	DnaG (1 Untereinheit)	Pol α /Primase (4 Untereinheiten)
Polymerase/Exonuklease	Polymerase III (3 Untereinheiten)	Pol δ (3–4 Untereinheiten), Pol ϵ (5 Untereinheiten)
Klammerlader	γ -Komplex (5 Untereinheiten)	RF-C (5 Untereinheiten)
Klammer	β -Untereinheit	PCNA
Entfernen der Primer	Polymerase I; RNase H	FEN-1, RNase H
Reifung des Folgestrangs	DNA-Ligase (NAD-abhängig)	DNA-Ligase I (ATP-abhängig)

Nach Kelman 2000; Erläuterung der Abkürzungen im Text

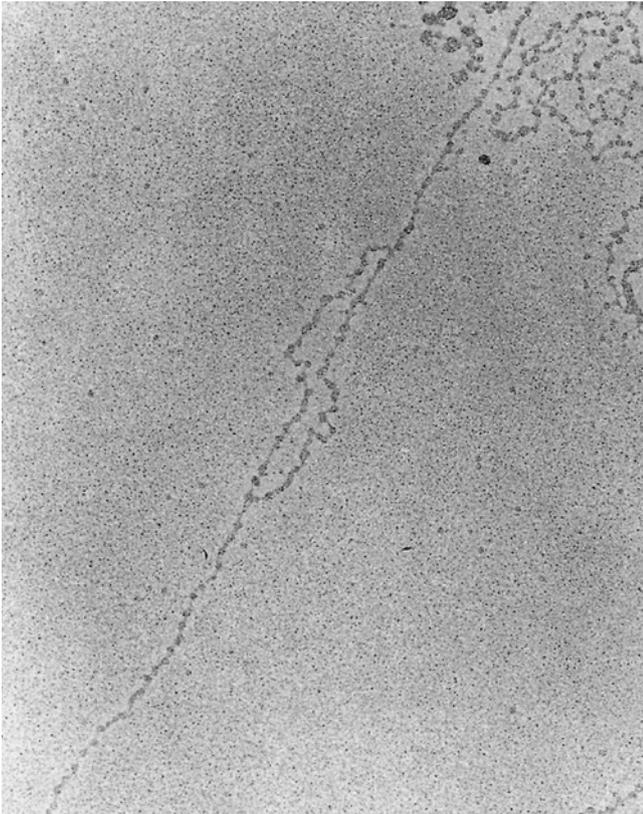
einer antiparallelen Anordnung beider DNA-Einzelstränge führt (■ Abb. 2.2). Das führt zu Problemen bei der Neusynthese beider DNA-Stränge, wenn diese am gleichen Initiationspunkt beginnt (■ Abb. 2.12). Einer der beiden Stränge kann dann nicht kontinuierlich synthetisiert werden. Es werden in diesem Fall kleine Teilstücke von weniger als 1000 Nukleotiden Länge synthetisiert, die nach ihrer Synthese



■ **Abb. 2.12** Molekularer Mechanismus der DNA-Replikation. Die Initiation der DNA-Synthese erfolgt im Replikationsursprung und verläuft zunächst nur in 5'→3'-Orientierung (Leitstrang; engl. *leading strand*) am 3'→5'-Strang der Doppelhelix (oben). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Synthese des komplementären DNA-Strangs (Folgestrang, engl. *lagging strand*) zunächst in Teilstücken (*Okazaki-Fragmenten*) erfolgt. Es bildet sich die Replikationsblase mit zwei Replikationsgabeln (Mitte). Unten ist ein Ausschnitt des Folgestrangs gezeigt, der Einzelheiten des Replikationsvorgangs erkennen lässt. Die Initiation der Replikation dieses Strangs erfordert Primer-RNA-Moleküle (*Quadrate*), die vor der Ligation der neu synthetisierten Okazaki-Fragmente nukleolytisch entfernt werden. Anschließend werden die Okazaki-Fragmente mithilfe einer Ligase (*Kreise*) ligiert

mithilfe einer **DNA-Ligase** kovalent miteinander verknüpft werden. Die Teilfragmente werden nach ihren Entdeckern **Okazaki-Fragmente** genannt (Okazaki und Okazaki 1969).

- DNA-Polymerasen können keinen neuen DNA-Strang ohne einen bereits vorhandenen Startpunkt herstellen. Als Startpunkte können DNA- oder RNA-Sequenzen dienen, die aufgrund ihrer Basenkomplementarität an den zu replizierenden DNA-Einzelstrang gebunden sind. Man bezeichnet solche Startsequenzen als **Primer**. Während der Replikation werden durch eine RNA-Polymerase (auch **Primase** genannt) zunächst kurze RNA-Primer erzeugt, die nur etwa 4 bis 12 Nukleotide lang sind. An diesen RNA-Primern kann dann die DNA-Polymerase ansetzen und einen fortlaufenden DNA-Strang synthetisieren.
- Aus ■ Abb. 2.12 ist erkennbar, dass zur Neusynthese der Doppelstrang der DNA über einen gewissen Abstand hinweg geöffnet werden muss. An diesen Prozessen sind **Helikasen** und **Topoisomerasen** beteiligt. In die sich öffnende Replikationsgabel hinein kann ein DNA-Strang in 5'→3'-Richtung kontinuierlich synthetisiert werden. Er wird als **Leitstrang** (engl. *leading strand*) bezeichnet. Der Gegenstrang, der in der Form von Okazaki-Fragmenten synthetisiert wird, wird **Folgestrang** (engl. *lagging strand*) genannt. Es entstehen auf diese Weise zwei **Replikationsgabeln** (engl. *replication forks*), die zur Bildung von **Replikationsaugen** oder -blasen (engl. *replication bubble*) führen. Solche Replikationsaugen lassen sich elektronenmikroskopisch an replizierender DNA demonstrieren (■ Abb. 2.13).
- Ein für die Erörterung der Mutationsmechanismen (► Abschn. 10.2) wichtiger Gesichtspunkt ist die **Fehlerrate**, mit der DNA-Polymerasen Nukleotide in die neu synthetisierten DNA-Stränge einbauen. Die Fehlerhäufigkeit liegt bei 10^{-5} bis 10^{-6} . Sie würde damit zu Veränderungen von Nukleotiden in einem großen Teil der replizierenden Gene führen. Durch **Reparaturmechanismen** (► Abschn. 10.6) sinkt jedoch die effektive Fehlerrate auf 10^{-9} bis 10^{-11} .

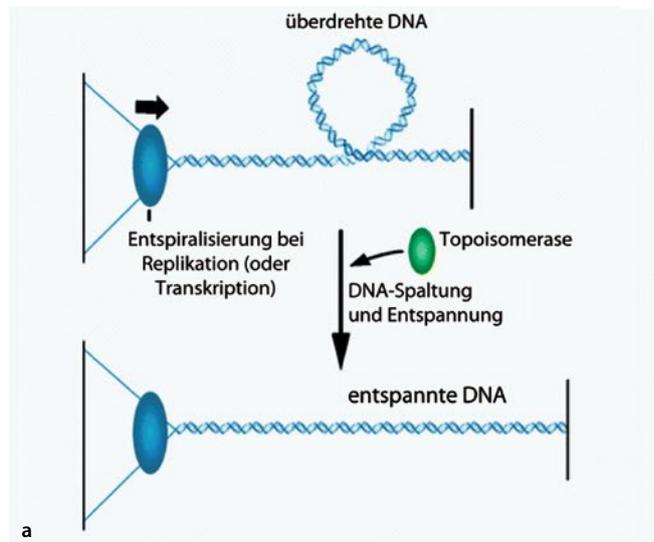


■ **Abb. 2.13** Replikation der DNA in Kernen des zellulären Blastoderms von *Drosophila melanogaster*. Die Replikationsblase ist deutlich zu erkennen. Die angrenzenden Replikationsstartpunkte sind noch nicht aktiviert. Die DNA ist mit Nukleosomen bedeckt. (Nach McKnight und Miller 1977, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

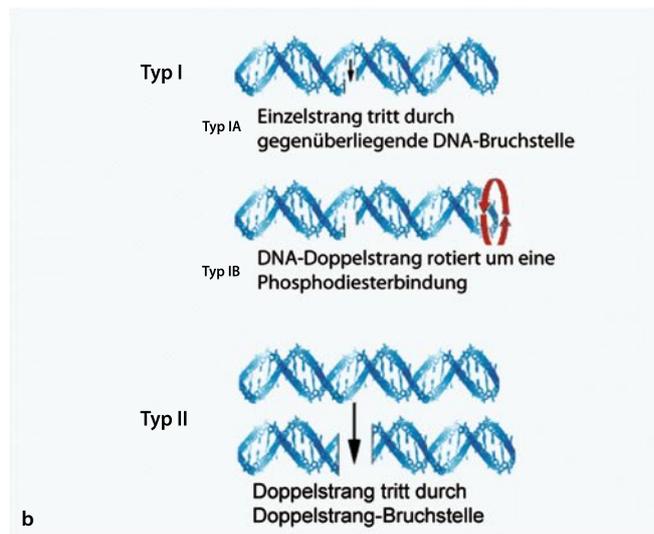
- Die Replikationsenzyme, DNA-Polymerasen, können nur in 5'→3'-Richtung Nucleotide anfügen. Deshalb muss einer der beiden DNA-Stränge in kleineren Teilsequenzen, den Okazaki-Fragmenten, synthetisiert werden. Da die DNA-Polymerase zur DNA-Synthese ein 3'-OH-Ende als Startpunkt benötigt, wird am 5'→3'-Strang zunächst ein RNA-Primer synthetisiert, an dessen 3'-Ende die DNA-Polymerase die DNA-Synthese beginnt. Teilfragmente von etwa 1000 Nucleotiden werden dann, nach Abbau der RNA durch die Polymerase-eigene 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, kovalent aneinander gebunden.

Ein grundsätzliches topologisches Problem der DNA-Replikation ergibt sich aus ihrer Helixstruktur. Wenn mit fortschreitender Replikation die Helix entspiralisiert wird, geht dies nur, indem immer wieder Brüche in die Helix eingeführt werden, um so ein Verdrillen (engl. *supercoiling*) zu vermeiden. Die dafür zuständigen Enzyme werden als **Topoisomerasen** bezeichnet und in zwei Klassen (I und II) unterteilt. Topoisomerase I ist in der Lage, die Windungszahl der DNA um eins zu erhöhen, während Topoisomerase II diese Zahl um zwei reduziert (■ Abb. 2.14).

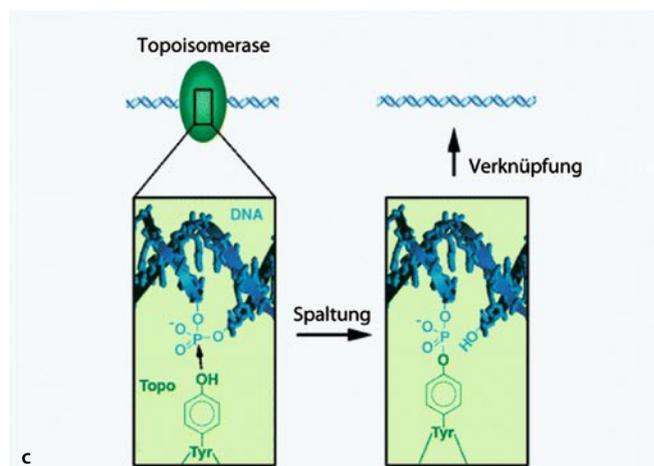
In ■ Abb. 2.14a ist ein DNA-Fragment zusammen mit einer gerade replizierenden Region dargestellt (Replikationsauge), und die Replikationsmaschinerie an der Replikationsgabel ist durch ein Stäbchen zwischen den beiden frisch synthetisierten DNA-



a



b



c

■ **Abb. 2.14** DNA-Topologie und Topoisomerase. **a** Die Entspiralisierung der DNA erzeugt eine Verspannung der Helix, die durch DNA-Topoisomerasen aufgelöst wird. **b** Die verschiedenen Klassen der Topoisomerasen. **c** Der katalytische Zyklus der Topoisomerasen vom Typ I: Das Enzym bindet an die DNA, die nukleophile Reaktion des Tyrosins im reaktiven Zentrum führt zur Spaltung des DNA-Rückgrats. Nach der Entspannung verknüpft das Enzym die DNA-Enden erneut und löst sich ab. (Nach Leppard und Champoux 2005, mit freundlicher Genehmigung von Springer)

Strängen symbolisiert. Die topologischen Konsequenzen einer voranschreitenden Replikationsgabel und die Funktionen der Topoisomerasen hängen nun davon ab, ob die Replikationsmaschinerie im zellulären Raum rotieren kann.

Stellen wir uns vor, dass das Stäbchen nicht um die Helixachse der noch nicht replizierten DNA vor der Replikationsgabel rotiert (der Replikationsapparat kann an die Membran gebunden und daher immobilisiert sein). In dem Maße, wie die Replikationsgabel voranschreitet, zwingt das Stäbchen die helikalen Windungen der DNA vor sich in einen immer kürzeren Bereich, und die DNA wird überdreht oder positiv *supercoiled*. Hinter der Replikationsgabel wird das Replikationsauge immer größer. Wenn dagegen das Stäbchen rotieren kann, können die positiven »Supercoils« vor der Replikationsgabel auf die Region hinter der Gabel verteilt werden, was zu einer Zwischendrehung der replizierten DNA führt und/oder zu einem Überdrehen der unreplizierten DNA hinter der Replikationsgabel.

Ein weiteres Problem tritt auf, wenn sich zwei aufeinander zubewegende Replikationsgabeln vereinigen. In dem Maße, in dem das parentale, unreplizierte DNA-Fragment immer kürzer wird, müssen Topoisomerasen die endgültige Trennung der beiden neu replizierten Stränge vornehmen: entweder eine Topoisomerase II mit einem Schnitt durch beide Einzelstränge oder eine Topoisomerase I mit einem Schnitt des Einzelstrangs an der Verbindung des Einzelstrangs mit dem Doppelstrang.

Der Mechanismus der katalytischen Wirkung beider Topoisomerasen ist unterschiedlich. Topoisomerase I löst die Phosphodiesterbindung nur eines DNA-Strangs und lässt den zweiten, nicht unterbrochenen Strang den geöffneten Strang durchqueren; dabei bleibt sie selbst an die offenen Enden kovalent gebunden. Danach wird der unterbrochene Strang wieder geschlossen, sodass die Windungszahl nunmehr um eins erhöht ist. Topoisomerase II hingegen induziert einen Doppelstrangbruch und verschiebt die Doppelhelix durch sich selbst, um sie dann wieder kovalent zu schließen (■ Abb. 2.14b).

Nach den **gemeinsamen** Aspekten der DNA-Replikation bei Pro- und Eukaryoten (siehe auch ■ Tab. 2.2) sollen nun die spezifischen Eigenheiten diskutiert werden.

➤ **Aus der Helixstruktur der DNA ergibt sich ein grundsätzliches topologisches Problem der DNA-Replikation: Wenn mit fortschreitender Replikation die Helix entspiralisiert wird, geht dies nur, indem immer wieder Brüche in die Helix eingeführt werden, um so ein Verdrillen zu vermeiden. Die dafür zuständigen Enzyme werden als Topoisomerasen bezeichnet.**

2.2.2 Mechanismen der Replikation bei Prokaryoten

Bakterien müssen ihre Genome kopieren, bevor sie sich in zwei Tochterzellen teilen können. Jeder Zellzyklus startet an einer bestimmten chromosomalen Region, die als *oriC* bezeichnet wird (engl. *chromosomal replication origin*). Fehler beim Start der Replikation führen zu suboptimalem Bakterienwachstum – daher ist es für Bakterien von besonderer Bedeutung, diesen ersten

kritischen Schritt der DNA-Replikation, den Zusammenbau des »Orisoms« (Protein-*oriC*-Komplex), präzise zu regulieren. Obwohl Orisomen in den meisten Bakterien vorkommen, stammen unsere Kenntnisse überwiegend aus dem bakteriellen Modellsystem *Escherichia coli* (*E. coli*). Eine Übersicht über die Initiationsphase der bakteriellen Replikation gibt ■ Abb. 2.15.

In der **Initiationsphase** wird um den Replikationsstartpunkt herum eine kleine Blase entspiralierter DNA gebildet, das Replikationsauge. Der *oriC* des ringförmigen *E. coli*-Chromosoms besteht aus 245 bp. Die Trennung der beiden Doppelstränge beginnt in einer AT-reichen Region, die schon dadurch eine gewisse Instabilität aufweist; sie enthält dreimal die Sequenz 5'-GATCTATTATTT-3'. In unmittelbarer Nähe zu dieser AT-reichen Region befinden sich die klassischen Erkennungssequenzen für das DnaA-Protein (5'-TTATNCACA-3'), die insgesamt fünfmal vorkommen und als DnaA- oder R-Boxen bezeichnet werden. Trotz der geringen Sequenzunterschiede hat das DnaA-Protein unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Boxen. Das »aktive« DnaA-Protein (im Komplex mit ATP) bindet mit geringerer Affinität an die AT-reiche Region oberhalb der DnaA-Boxen. Wenn diese Region durch andere Komponenten entspiralisiert wird, stabilisiert sich die Bindung von DnaA durch dessen hohe Affinität an die einzelsträngige DNA. Für die Umwandlung des Initiations- in den **offenen Komplex** ist eine Mindestmenge von DnaA-Protein notwendig. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass etwa 20 bis 30 DnaA-Monomere an einem aktiven Replikationskomplex beteiligt sind. Die Bindung von »aktivem« DnaA an die DnaA-Boxen ist dann der erste Schritt beim Zusammenbau des Initiationskomplexes und erfolgt mit hoher Affinität. Zu diesem Initiationskomplex gehören auch DnaB, eine *E. coli*-Helikase, sowie weitere Hilfsproteine und Kontrollfaktoren. Offensichtlich erlauben auch die abgestuften Affinitäten und Kooperationseffekte durch andere Mitglieder des Komplexes eine präzise Regulation.

Die doppelsträngige Region des Initiationskomplexes umfasst zunächst etwa 28 bp. Wenn Einzelstrang-bindende Proteine (engl. *single-stranded DNA-binding proteins*, SSB) anwesend sind, vergrößert sich diese Region auf 44 bis 46 bp. Da Einzelstrang-DNA, die mit SSB bedeckt ist, ein schlechtes Substrat für die DnaB-Helikase ist, müssen die SSBs mithilfe des DnaA-Proteins »aufgeladen« werden. Dieser Ladekomplex enthält zwei Doppelhexamere von DnaB und des eigentlichen »Ladeproteins« DnaC, jeweils ein Doppelhexamer für jede Replikationsgabel. DnaC verlässt den Komplex unmittelbar nach oder schon während des Ladevorgangs. Das dabei hydrolysierte ATP aktiviert die Helikase-Aktivität des DnaB-Proteins. Dabei rutschen die DnaB-Hexamere in 5'→3'-Richtung weiter und vergrößern das Replikationsauge auf etwa 65 bp. Die Primase tritt zu dem Initiationskomplex hinzu und synthetisiert die Primer für die beiden Leitstränge.

Nun kann die Gleitkammer der Polymerase (engl. *sliding clamp*), ein ringförmiges Dimer der β -Untereinheit der DNA-Polymerase III, auf die startbereite Matrize aufgeladen werden. Dadurch wird die intrinsische ATPase-Aktivität des DnaA-Proteins aktiviert. Durch ATP-Hydrolyse wird das »aktive« DnaA-Protein wieder inaktiviert und die Bildung weiterer Initiations-

2.2 · Die Verdoppelung der DNA (Replikation)

komplexe verhindert. Der jetzt vorliegende Gesamtkomplex aus DNA und Proteinfaktoren wird auch als »Replisom« bezeichnet (■ Abb. 2.15).

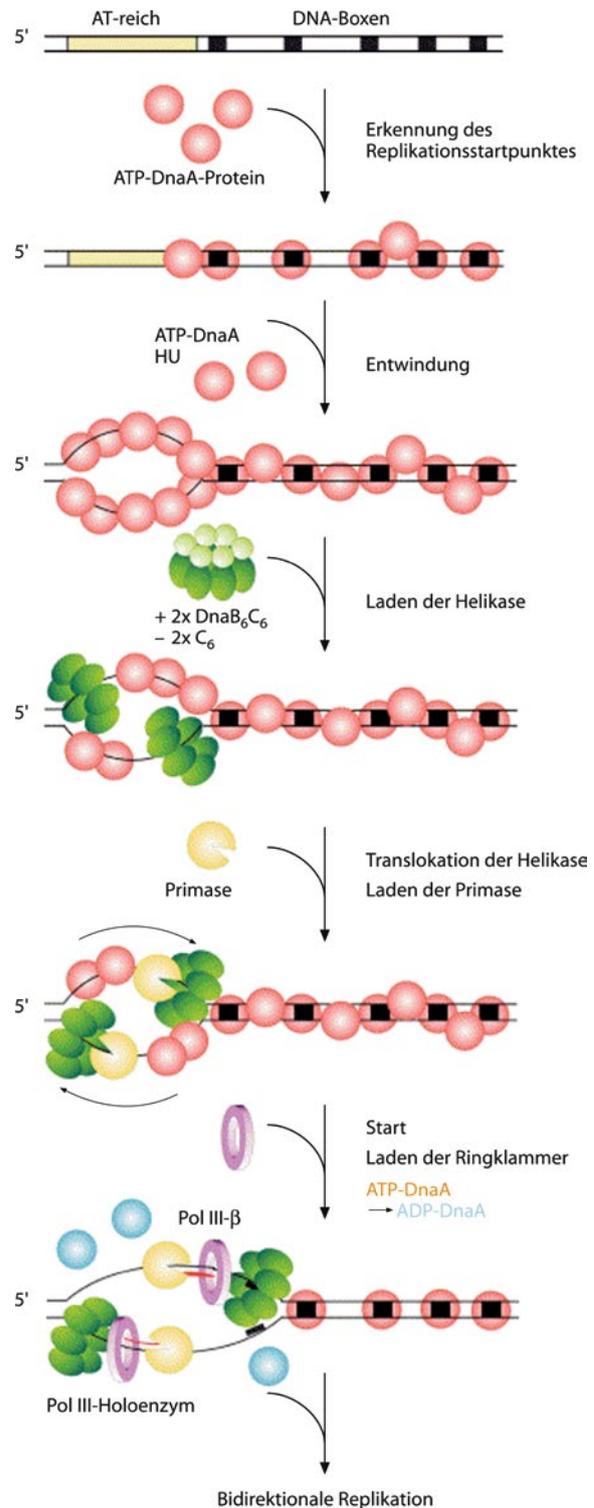
Nach der Initiationsphase tritt die DNA-Replikation in die Elongationsphase ein. Dabei wird der Leitstrang kontinuierlich synthetisiert, wohingegen der Folgestrang diskontinuierlich unter Bildung der Okazaki-Fragmente synthetisiert wird. Eine Übersicht über die dabei ablaufenden zyklischen Prozesse und die vielfältigen Cofaktoren gibt ■ Abb. 2.16.

✿ In verschiedenen genetischen Ansätzen ist es gelungen, die Faktoren zu identifizieren, die für die bakterielle Replikation essenziell sind. Dazu wurden solche *E. coli*-Mutanten gesucht, die in der DNA-Replikation offensichtlich Defizite aufweisen. Eine typische Strategie isoliert dabei Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, autonom replizierende, aber extrachromosomale DNA-Moleküle zu erhalten (z.B. ein Mini-F-Plasmid, ► Abschn. 4.2.1). Über 60 Mutanten wurden auf diese Weise identifiziert und wichtige Faktoren wie die B-Untereinheit der Gyrase (*gyrB*), eine Untereinheit des HU-Proteins (*hupB*) oder die RecD-Untereinheit des RecBCD-Enzyms (*recD*; zur Übersicht siehe Kato 2005).

Bei *E. coli* sind fünf DNA-Polymerasen bekannt (DNA-Polymerase I–V). Viele DNA-Polymerasen besitzen zusätzliche Exonuklease-Aktivitäten und können somit auch Nukleotide aus einer Kette entfernen. Dabei entfernt die 5'→3'-Exonuklease die RNA-Nukleotide des Primers, und die 3'→5'-Exonuklease beseitigt falsch gepaarte DNA-Nukleotide. Die DNA-Polymerase III ist das Hauptenzym der Replikation, während die DNA-Polymerase I die RNA-Primer abbaut und danach die Lücken wieder auffüllt. Polymerase I überwiegt mengenmäßig die übrigen DNA-Polymerasen erheblich. In der Bakterienzelle sind etwa 300 bis 400 DNA-Polymerase-I-Moleküle vorhanden. Die Polymerase II ist mit etwa 40 Molekülen vertreten, während von der DNA-Polymerase III nur etwa 10 Moleküle vorhanden sind. Die DNA-Polymerasen II, IV und V sind auch an Reparaturmechanismen beteiligt. Eine Übersicht über bakterielle DNA-Polymerasen gibt ■ Tab. 2.3.

✿ Die DNA-Polymerase I wurde in den frühen 1950er-Jahren vor allem durch Severo Ochoa und Arthur Kornberg durch klassische biochemische Verfahren isoliert und charakterisiert; beide wurden für diese Arbeiten 1959 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Als Kornberg jedoch 1957 seine beiden grundlegenden Manuskripte beim *Journal of Biological Chemistry* eingereicht hatte, wurden sie zunächst von den Gutachtern abgelehnt: »It is very doubtful that the authors are entitled to speak of the enzymatic synthesis of DNA«; »polymerase is a poor name«. Aufgrund des Einspruchs des Chefredakteurs konnten die Arbeiten aber 1958 erscheinen (Lehmann et al. 1958, Bessmann et al. 1958). Heute wird die DNA-Polymerase I auch als »Kornberg-Polymerase« bezeichnet; sein Sohn Roger D. Kornberg erhielt 2006 den Nobelpreis für Chemie für die Strukturaufklärung der eukaryotischen RNA-Polymerase II.

Ermittelt man die **Replikationsgeschwindigkeit** der DNA in einem *E. coli*-Chromosom, so findet man, dass diese unabhän-



■ **Abb. 2.15** Schematische Darstellung der Initiation der DNA-Replikation bei *E. coli*. Das aktivierte DnaA-Protein erkennt den Replikationsstartpunkt anhand der DnaA-Boxen und der oberhalb liegenden AT-reichen Sequenzen (HU: Histon-ähnliches DNA-Bindeprotein). Der Replikationsstartpunkt wird im Bereich der AT-reichen Sequenzen aufgeschmolzen und die Helikasen geladen (je 2 DnaB- und DnaC-Komplexe aus je 6 Untereinheiten). Nach einer Umorganisation der Helikasen wird die Primase zum Initiationskomplex geladen. Das *Priming* erfolgt nach dem Beladen der Gleitklammer und der ATP-Hydrolyse des aktivierten DnaA-Komplexes. Die Polymerase III beginnt zu arbeiten, und die Replikation läuft bidirektional ab. (Nach Messer 2002, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

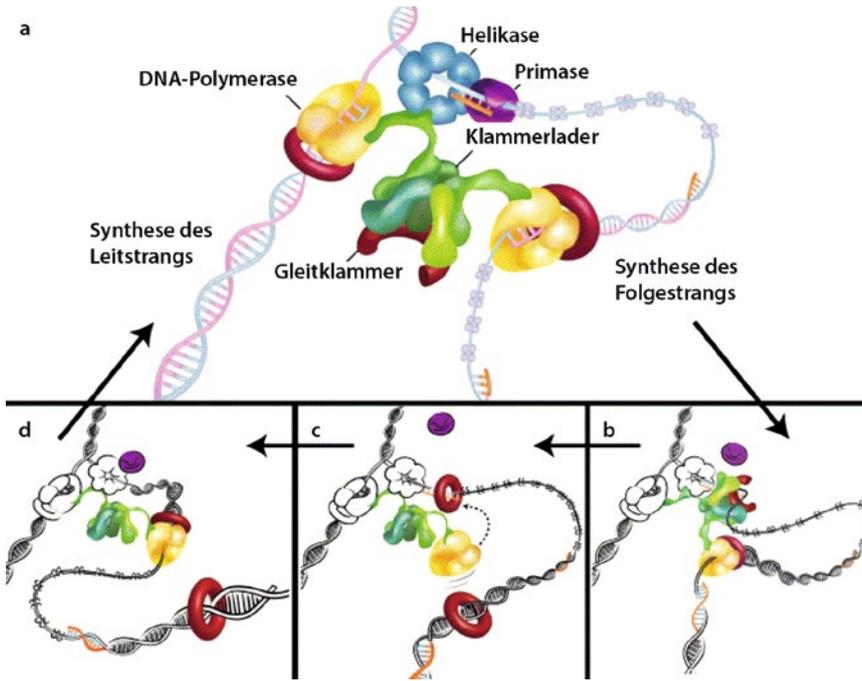


Abb. 2.16 Der Zyklus der DNA-Synthese am Folgestrang. **a** Während die DNA-Polymerase Okazaki-Fragmente am Folgestrang synthetisiert, öffnet der Klammerlader eine neue Gleitklammer; die Helikase bringt erneut eine Primase an die Replikationsgabel, um die Synthese des nächsten Fragments zu starten. **b** Nach der Synthese der RNA-Primer verdrängt der Klammerlader die Helikase und lädt die Gleitklammer auf die Verbindung des neuen Primers mit der DNA-Matrize. **c** Die Vollendung der Okazaki-Fragmente bewirkt die Verlagerung der DNA-Polymerase an die neu geladene Gleitklammer. **d** Die DNA-Polymerase synthetisiert das neue Okazaki-Fragment und vervollständigt damit den Zyklus. Die Entspiralisierung an der Replikationsgabel und die Synthese des Leitstrangs werden während des ganzen Zyklus fortgesetzt. (Nach Langston und O'Donnell 2006, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

gig von den Wachstumsbedingungen etwa 500 bis 1000 bp je Sekunde beträgt. Das wirft die Frage auf, wie ein Bakterium mit einer Chromosomenlänge von 4×10^6 bp bei bidirektionaler Replikation sich unter günstigen Bedingungen alle 20 min teilen kann, da die Replikation des Chromosoms etwa 40 min beansprucht. Dieses Problem wird von der Zelle dadurch gelöst, dass die Initiationsfrequenz der Replikation am Replikationsstartpunkt von der Wachstumsgeschwindigkeit gesteuert wird. Bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit beginnt die Initiation einer neuen Replikationsrunde bereits vor Vollendung der vorangehenden Replikation, sodass das Chromosom in diesem besonderen Fall mehr als zwei Replikationsgabeln besitzt.

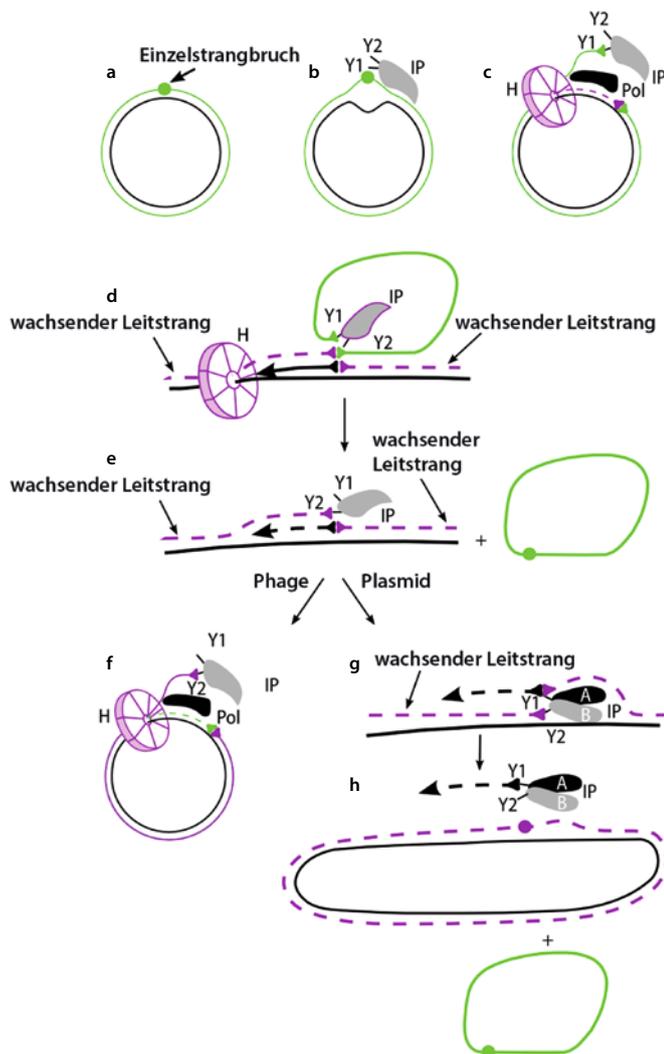
Die bakterielle Replikation beginnt am *oriC* und benötigt zunächst die Bindung des aktiven DnaA-Proteins, der DnaB- und DnaC-Proteine sowie Einzelstrang-bindender Proteine. Unter ATP-Verbrauch wird die DNA-Polymerase »aufgeladen« und die Replikation gestartet.

Als Besonderheit soll hier außerdem die **DNA-Replikation von Plasmiden** (► Abschn. 4.2) und Bakteriophagen (► Abschn. 4.3) erwähnt werden, die nach dem Mechanismus des *rolling circle* (■ Abb. 2.17) abläuft. Diese Form der DNA-Replikation verwendet eine ringförmig geschlossene DNA als Matrize. In der Initiationsphase bindet ein sequenzspezifisches Initiatorprotein an eine hochkonservierte doppelsträngige Startsequenz. Diese

Tab. 2.3 Hauptklassen prokaryotischer DNA-Polymerasen

Enzym	Untereinheit (kDa)	Funktion
Pol I	103	»Kornberg-Enzym«: Entfernung der RNA-Primer, Auffüllen der Lücke, Korrektur; 5'→3'- und 3'→5'-Exonuklease-Aktivität ^a
Pol II	88	DNA-Reparatur; 3'→5'-Exonuklease-Aktivität
Pol III	α: 130	Katalytische Untereinheit
(Core)	ε: 28	Korrektur; 3'→5'-Exonuklease-Aktivität
	τ: 71	Verbindung der Pol-III-Dimere
	θ: 10	Funktion unbekannt
Pol IV	40	DNA-Reparatur
Pol V	UmuC: 46 UmuD: 15	DNA-Reparatur

^a Durch Behandlung mit der Protease Trypsin wird das Gesamtprotein in zwei Fragmente gespalten. Der C-terminale Teil enthält die 3'→5'-Exonuklease zusammen mit der DNA-Polymerase-Aktivität (»Klenow-Fragment«).



■ **Abb. 2.17** Rolling circle-Replikation. **a** Doppelsträngige Form des Replikons. **b** Das Initiationsprotein (IP), das zwei Tyrosin-Reste enthält (Y1 und Y2), bindet an einen Einzelstrangbruch und schmilzt die umgebende Region auf. **c** Nach dem Aufbau des Replikons beginnt die 3'-Verlängerung des Leitstrangs (rot). Das IP bleibt über seine beiden Tyrosin-Reste mit dem 5'-Ende des verdrängten Leitstrangs verbunden (grün); der verdrängte Leitstrang ist mit Einzelstrang-Bindeproteinen bedeckt. **d** Wenn die Replikationsgabel einen Zyklus der Replikation beendet hat, stoppt die Maschine, nachdem der Leitstrang um ein kurzes Fragment bis zur Einzelstrangbruchstelle verlängert wurde. Diese Verlängerung (schwarz) verdrängt die Verbindung zwischen dem alten (grün) und dem wachsenden (rot) Leitstrang; Y2 spaltet diese Verbindung. **e** Eine Umesterung (Angriff der Phosphotyrosin-Bindung zwischen Y1 und dem 5'-Ende des Leitstrangs durch das freigesetzte 3'-Ende des verdrängten Leitstrangs) verdrängt das IP, der Leitstrang schließt sich und wird als einzelsträngiger DNA-Ring freigesetzt (grün). Das IP wird jetzt über das Y2 mit dem 5'-Ende des wachsenden Leitstrangs verbunden. Die Helikase (H) und das Polymerase-III-Holoenzym (Pol) haben den Komplex verlassen. Die Schritte **a–e** verlaufen bei Phagen und Plasmiden in gleicher Weise. **f** In Phagen wird jetzt der Replikationskomplex wieder zusammengesetzt und die 3'-Verlängerung des Leitstrangs beginnt erneut. Dieser Schritt ist identisch mit **c**, außer dass das IP mit dem verdrängten Leitstrang über Y2 statt Y1 verbunden ist. **g** Im Plasmid verdrängt das 5'-Ende des neuen Leitstrangs (der mit dem IP über Y2 [Untereinheit B] verbunden ist) sein eigenes 3'-Ende, das dadurch von Y1 (Untereinheit A) gespalten werden kann. **h** Nach der Spaltung greift das freie 3'-OH-Ende des neuen Leitstrangs die Y2-DNA-Bindung an; diese Umesterung bewirkt den Ringschluss des Leitstrangs und setzt das IP frei. (Nach Novick 1998, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

Bindung des Initiatorproteins ist verbunden mit der Einführung eines Einzelstrangbruchs und der Ausbildung einer haarnadel-förmigen Schleife als Terminationssignal. Das Initiatorprotein wird kovalent über einen Tyrosin-Rest im aktiven Zentrum an das freie 5'-Phosphat-Ende gebunden. Mithilfe einer Helikase und stabilisierenden Einzelstrang-bindenden Proteinen wird ein Stück DNA-Einzelstrang freigelegt, an dessen freien 3'-OH-Ende die DNA-Polymerase III den Leitstrang synthetisiert, bis sie das Terminationssignal erreicht (ca. 10 Basen vor der Schnittstelle). Nach einer Serie verschiedener Schnitte und Neuverknüpfung der einzelsträngigen DNA wird der zirkuläre Einzelstrang freigesetzt und zum Doppelstrang vervollständigt. Dieser Prozess benötigt die Bildung eines RNA-Primers mithilfe der RNA-Polymerase und nachfolgend die Verlängerung der Primer durch DNA-Polymerase I und III. Schließlich werden die freien Enden verbunden und die gebildete DNA durch DNA-Gyrase in die verdrehte (*supercoiled*) Form überführt. Im Gegensatz zur Replikation einer Plasmid-DNA wird die Phagen-DNA häufig repliziert, üblicherweise etwa 20-mal.

2.2.3 Mechanismen der Replikation bei Eukaryoten

Die DNA-Replikation eukaryotischer Zellen ist wesentlich komplexer als bei Prokaryoten, da bei Eukaryoten die Zellteilung nicht nur mit dem Wachstum des jeweiligen Gesamtorganismus, sondern auch mit gewebespezifischen Differenzierungsmustern verbunden ist. Außerdem kommt aufgrund der chromosomalen Organisation des eukaryotischen Genoms im Zellkern ein zusätzlicher Komplexitätsgrad hinzu: Wie wir im ► Abschn. 6.2.2 im Detail besprechen werden, ist die DNA bei Eukaryoten um Proteinkomplexe gewickelt, die im Wesentlichen aus Histonproteinen bestehen und als Nukleosomen bezeichnet werden. Dabei entsteht eine perlenschnurartige Struktur (■ Abb. 6.12). Die Replikation des Genoms findet auch nur in einer bestimmten Phase des Zellzyklus statt. Dieser ist in vier Schritte unterteilt, die G₁-, S-, G₂- und M-Phase: Die erste Phase, G₁ (eng. *gap*), beginnt am Ende der Zellteilung und ist durch Zellwachstum gekennzeichnet. Nachdem die G₁-Phase abgeschlossen ist, wird die DNA in der S-Phase (S = Synthese) repliziert. Nach einer erneuten Wachstumsphase (G₂) teilt sich die Zelle während der M-Phase (M = Mitose) in zwei Tochterzellen. Als Schalter zwischen den verschiedenen Phasen fungieren Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDKs) und CDCs (engl. *cell division cycle*) (für Details des Zellzyklus ► Abschn. 5.2).

Eine naheliegende Frage bezüglich der eukaryotischen DNA-Replikation ist, ob die DNA eines jeden Chromosoms in einem einzigen Schritt verdoppelt wird (vergleichbar dem Mechanismus bei Prokaryoten) oder ob sie in Teilschritten repliziert. Eine erste Antwort hierauf haben autoradiographische Studien über das Replikationsverhalten von Chromosomen geben können. Antonio Lima-de-Faria erkannte schon 1959, dass bestimmte Chromosomenabschnitte zu einem späteren Zeitpunkt replizieren als die übrigen Chromosomenbereiche.

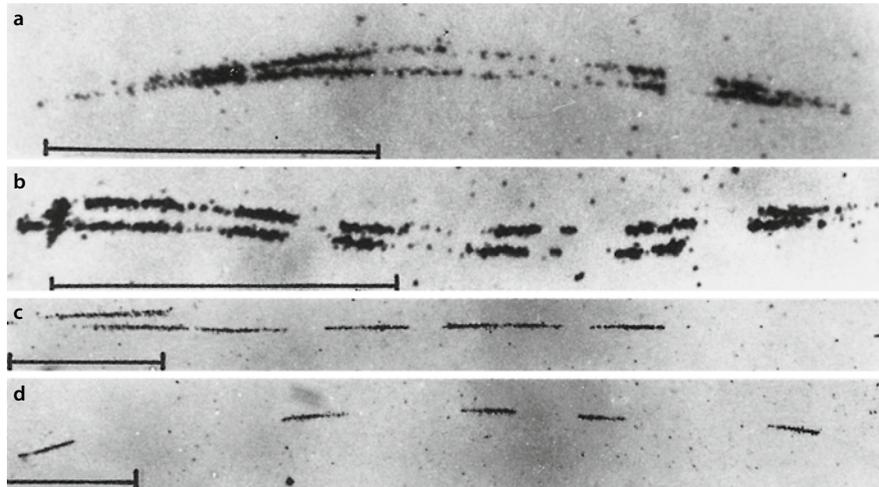


Abb. 2.18 Autoradiographische Demonstration von Replikationsstartpunkten in der DNA aus Kulturen menschlicher Zellen. In **a** und **b** sind die beiden Enden der Replikationsgabeln sichtbar. Weitere Replikationsstartpunkte befinden sich innerhalb der Gabel. In **c** und **d** ist erkennbar, dass eine Initiation der Replikation mehrfach innerhalb begrenzter DNA-Bereiche erfolgt ist. Der Längenmarker zeigt 50 μm an. (Aus Huberman und Tsai 1973, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

➤ **Eukaryotische Chromosomen replizieren nicht kontinuierlich von einem Ende zum anderen, sondern verschiedene Chromosomenteilbereiche können zu unterschiedlichen Zeiten replizieren.**

✿ Spreitet man gereinigte DNA-Moleküle aus kurzzeitig mit ^3H -Thymidin markierten menschlichen Zellen und führt an solchen Präparaten eine Autoradiographie durch, so findet man DNA-Moleküle, die mit mehrfachen Unterbrechungen radioaktiv markiert sind. Die Markierungsmuster weisen darauf hin, dass die Replikation der DNA an unterschiedlichen, voneinander getrennten Stellen beginnt und bidirektional verläuft, da die Radioaktivität häufig symmetrisch um zwei unmarkierte Mittelregionen angeordnet ist (Abb. 2.18). Die mittleren Abstände der Replikationsstartpunkte betragen im Mittel deutlich über 100.000 Basen (= 100 kb; 1 Kilobase [kb] = 1000 Basen) und könnten sogar bei 500 kb liegen. Ein Genom muss Tausende von Replikationseinheiten besitzen, selbst wenn diese im Mittel 500 kb lang sind. Ein haploides menschliches Genom (3×10^9 bp), das innerhalb von etwa 8 h repliziert wird, sollte etwa 10.000 bis 20.000 Replikationsstartpunkte besitzen.

➤ **Die Replikation der DNA beginnt an bestimmten Replikationsstartpunkten und läuft von dort aus nach zwei Seiten. Es gibt in eukaryotischen Chromosomen Zehntausende von DNA-Sequenzen, an denen die Replikation zu unterschiedlichen Zeiten beginnen kann.**

☞ Es gibt Anzeichen dafür, dass das differenzielle Replikationsverhalten mit der Aktivität oder Inaktivität der betreffenden DNA-Region in dem jeweiligen Zelltyp korreliert (Abschn. 6.4). Das würde bedeuten, dass der Beginn der Replikation an bestimmten Replikationsstartpunkten gewebespezifisch reguliert wird. Ein Beispiel für gewebespezi-

fische Unterschiede im Gebrauch von Replikationsstartpunkten können wir in der Frühentwicklung von *Drosophila* finden (Abschn. 12.4). Nach der Befruchtung erfolgt im *Drosophila*-Ei alle 10 min eine Kernteilung. Das Intervall zwischen zwei Kernteilungen dient weitgehend der Replikation des Genoms, die in etwa 5 min abgeschlossen sein muss. Um dieses Ziel bei einer Replikationsgeschwindigkeit von etwa 2,6 kb je Minute zu erreichen, sind 20.000 bis 50.000 Replikationsstartpunkte im Genom von *Drosophila* erforderlich. Diese werden in den frühen Kernteilungen wahrscheinlich alle verwendet und auch gleichzeitig aktiviert. Übereinstimmend damit wurde experimentell festgestellt, dass der mittlere Abstand der Replikationsstartpunkte in der Frühentwicklung bei etwa 8 kb liegt. In anderen Zelltypen von *Drosophila* ist dieser Abstand wesentlich größer und liegt in Speicheldrüsen im Mittel bei etwa 30 kb.

➤ **Der Zeitpunkt des Replikationsbeginns an verschiedenen eukaryotischen Replikationsstartpunkten kann gewebespezifisch reguliert werden.**

Nachdem wir nun in der Frage der Zahl der Replikationsstartpunkte einen der ersten wesentlichen Unterschiede zwischen der Replikation bei Bakterien (ein Replikationsstartpunkt) und höheren Zellen (mehrere Zehntausend Startpunkte) gesehen haben, wollen wir uns nun den molekularen Details der eukaryotischen DNA-Replikation zuwenden. Ähnlich wie bei Prokaryoten finden wir eine Initiations-, Elongations- und Terminationsphase.

Die Initiationsphase ist gekennzeichnet durch den Aufbau des präreplikativen Komplexes an den entsprechenden Startsequenzen. Diese Startsequenzen wurden zunächst bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als »autonom-replizierende Sequenzen« (ARS) beschrieben, da sie z. B. in künstlichen Chromosomen (engl. *artificial chromosomes*) ausreichen, um

2.2 · Die Verdoppelung der DNA (Replikation)

DNA-Synthese zu erlauben. Die Länge der ARS-Regionen in Hefen gleicht mit etwa 200 bp ungefähr der des Replikationsstarts von Bakterien. Obwohl man bestimmte konservierte Elemente in den ARS-Regionen gefunden hat, weichen diese doch in der Mehrheit der Nukleotide voneinander ab, sodass man insgesamt nur **Consensussequenzen** angeben kann. Schon bei einer anderen Hefe, *Schizosaccharomyces pombe*, sind die Sequenzen, die den Replikationsstart steuern, über 800 bis 1000 bp verteilt. Die einzelnen Elemente umfassen etwa 20 bis 50 bp und zeigen keine deutlichen Sequenzhomologien zu denen von *S. cerevisiae*. Die Replikationsstartpunkte der Metazoa sind insgesamt schlechter definiert und können sich über Tausende von Basenpaaren erstrecken. Das andere Extrem sind die Replikationsstartpunkte der frühen Embryonen von *Drosophila* und *Xenopus*, die offensichtlich kaum Sequenzspezifitäten zeigen, vermutlich um eine besonders schnelle DNA-Replikation und damit verbundene Zellteilung zu ermöglichen.

Der Komplex, der den Replikationsstartpunkt erkennt (engl. *origin recognition complex*, **ORC**) und als **Initiator der Replikation** wirkt, besteht bei Eukaryoten aus sechs Einzelkomponenten (ORC1p→6p). Der ORC wurde zwar ursprünglich in *S. cerevisiae* charakterisiert, aber Folgestudien zeigten, dass er in analoger Form auch in *Drosophila*, *Xenopus* und in menschlichen Zellen vorkommt. Der ORC bindet in der G₁-Phase des Zellzyklus (► Abschn. 6.3.1) in ATP-abhängiger Weise an die AT-reichen Regionen des Replikationsstarts, wobei er Einzelstrangbereiche von einer Größe von 80 bis 85 Basen bevorzugt. Die ORC-Bindung an das Chromatin ist nicht in allen Spezies vom Zellzyklus abhängig. So bleibt der ORC bei Hefen und *Drosophila* zunächst an den Replikationsstart gebunden, bis er während der Mitose vom Chromatin entfernt wird.

Eine wichtige Rolle beim Zusammenbau des gesamten Initiationskomplexes spielt **CDC6** (engl. *cell division cycle*): Es ist ein ATP-bindendes Protein, das während der G₁-Phase kurz vor der Initiation der DNA-Replikation exprimiert wird. Das Protein wird unmittelbar nach der Initiation der DNA-Replikation in der S-Phase wieder abgebaut. Man nimmt an, dass das CDC6-Protein – in Verbindung mit ORC – für die zeitliche Kontrolle der Initiationsphase verantwortlich und am Beladen des Initiationskomplexes mit der Helikase beteiligt ist.

Der dritte Komplex, der für die Initiationsphase der eukaryotischen DNA-Replikation notwendig ist, wird als **MCM** (engl. *minichromosome maintenance*)-Komplex bezeichnet. Er besteht in allen Eukaryoten aus sechs Untereinheiten (MCM2–7). Einige der Untereinheiten des MCM-Komplexes haben ATP-abhängige DNA-Helikase-Aktivitäten, DNA-abhängige ATPase-Aktivitäten und die Fähigkeit, an einzelsträngige DNA zu binden.

Der Zusammenbau des MCM-Proteins am Chromatin ist in **Abb. 2.19** dargestellt: Er benötigt die koordinierte Funktion von ORC und CDC6 sowie eines weiteren Proteins, **CDT1** (engl. *chromatin licensing and DNA replication factor 1*). CDT1 bindet an den C-Terminus von CDC6 und beschleunigt die Bindung des MCM-Komplexes an Chromatin; *Cdt1*-Mutationen in *S. pombe* führen zu einem Block der DNA-Replikation. Interessanterweise können ORC und CDC6 vom Chromatin entfernt werden, wenn der MCM-Komplex am Chromatin gebunden ist, ohne dass die DNA-Replikation beeinträchtigt wird. Die Anwesenheit von

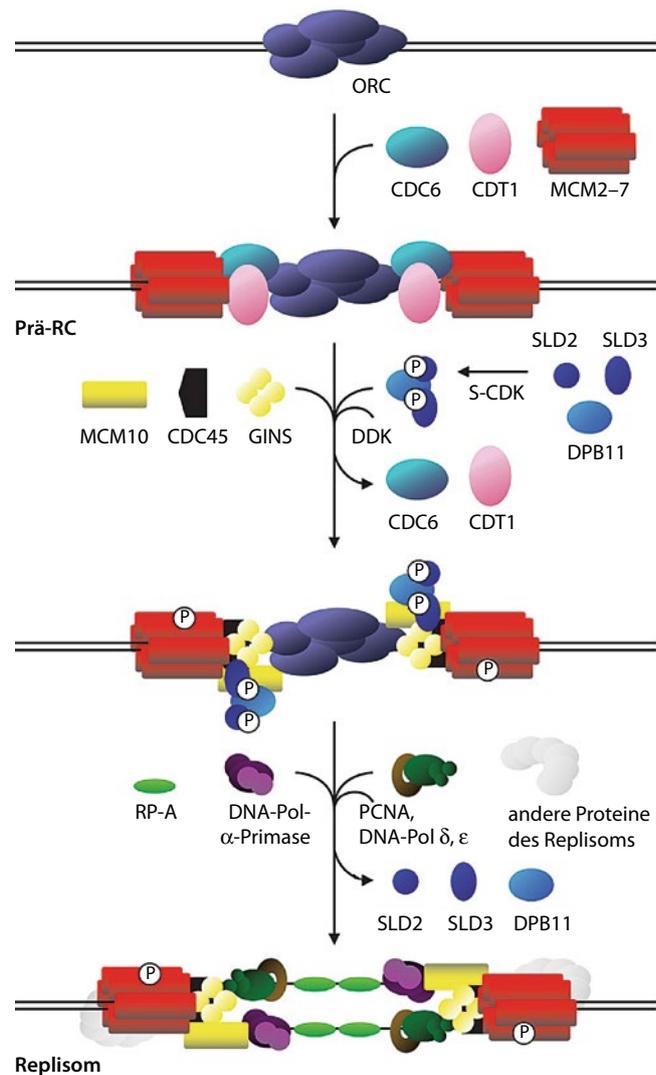


Abb. 2.19 Die Initiation der DNA-Replikation bei Eukaryoten. Die Bildung des präreplikativen Komplexes (Prä-RC) findet vor der S-Phase statt: Die Aktivierung des Prä-RCs und die Initiation der Replikation benötigen die Aktivitäten von CDKs (Cyclin-abhängigen Kinasen) und DDK (DBF4-abhängige CDC7-Kinase; DBF4: *dumbbell former*; CDC: *cell division cycle*). Die Darstellung ist vereinfacht, und viele Proteine des Replisoms können nicht gezeigt werden. CDT1: *chromatin licensing and DNA replication factor 1*; DPB11: DNA-Polymerase B (II); GINS: *Go, Ichi, Nii und San*: japanisch für fünf, eins, zwei und drei; MCM: *minichromosome maintenance*; ORC: Komplex zur Erkennung des Replikationsursprungs (engl. *origin recognition complex*); RP-A: Replikationsprotein A (Bindepotein für DNA-Einzelstränge); DNA-Pol-α-Primase: startet die DNA-Polymerase; DNA-Pol δ bzw. ε: fortschreitende DNA-Polymerasen; PCNA: Gleitklammer; SLD: *synthetically lethal with Dpb11-1*. (Nach Bryant und Aves 2011, mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press)

Nukleosomen (besonders Histon H3) in unmittelbarer Nachbarschaft von ARS ist offensichtlich für die Ausbildung des **präreplikativen Komplexes** notwendig. Nach der DNA-Replikation wird der MCM-Komplex übrigens wieder vom Zellkern ins Cytoplasma exportiert und wartet dort bis zur DNA-Replikation vor der nächsten Zellteilung, um dann erneut in den Zellkern transportiert zu werden. Alle Komponenten dieses Systems (CDC6, MCM und ORC) können durch CDKs phosphoryliert werden.



<http://www.springer.com/978-3-662-44816-8>

Genetik

Graw, J.

2015, Etwa 800 S. 610 Abb. in Farbe., Hardcover

ISBN: 978-3-662-44816-8