

7.1	Der Zellzyklus	210
7.1.1	Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus	210
7.1.2	Die Regulation des Zellzyklus	210
7.1.3	Substrate der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen	212
7.1.4	Wirkung exogener Faktoren auf den Zellzyklus	212
7.1.5	Apoptose oder der programmierte Zelltod	213
7.2	Die Replikation der DNA	215
7.2.1	Das Prinzip der semikonservativen DNA-Replikation	215
7.2.2	Das Replikon als Grundeinheit der Replikation	216
7.2.3	Für die Replikation benötigte Enzymaktivitäten	217
7.3	Veränderungen der DNA-Sequenz	224
7.3.1	Reparatur von DNA-Schäden	225
7.3.2	Rekombination, Transposition und Retrotransposition	227
7.4	Gentechnik	229
7.4.1	Vektoren zum Einschleusen fremder DNA in Zellen	229
7.4.2	Herstellung spezifischer DNA-Sequenzen	232
7.4.3	Gentechnik und Grundlagen- wissenschaften	236
7.4.4	Biotechnische Anwendungen der Gentechnologie	238

Die Informationen für den Aufbau eines Organismus, seine Differenzierung und die Aufrechterhaltung von individuellen Funktionen ist auf einem oder wenigen DNA-Molekülen niedergelegt. Die Vermehrung der DNA, die DNA-Replikation, und die Zellteilung sind im Lebenszyklus einer Zelle in wohlgeordneten und streng kontrollierten Zellzyklusphasen voneinander getrennt. Die DNA-Replikation wird über komplexe Multienzymssysteme reguliert und katalysiert. Kontrollmechanismen sorgen dafür, dass die Fehlerrate bei der DNA-Replikation sehr niedrig gehalten wird. Spontan oder durch physikalische oder chemische Noxen verursachte DNA-Schädigungen werden durch effiziente Reparatursysteme behoben. Die genauen Kenntnisse dieser Vorgänge haben es auch erleichtert, mit molekularbiologischen Methoden die Diagnose von genetischen Veränderungen der DNA schneller und spezifischer durchzuführen. Durch Entwicklung spezifischer Hemmstoffe einzelner Schritte der DNA-Replikation kann die Replikation von Mikroorganismen, aber auch von Tumorzellen effizient gehemmt werden.

7.1 Der Zellzyklus

Bei der Zellteilung laufen bestimmte Vorgänge in einer Zelle in einer geordneten Reihenfolge ab, wobei die Zelle zunächst ihren Inhalt verdoppelt um sich dann in zwei identische Tochterzellen zu teilen. Bei Vielzellern finden das ganze Leben hindurch Zellteilungen statt. Auch beim Menschen müssen abgestorbene Zellen durch neue ersetzt werden. Es gibt aber auch menschliche Zellen, wie Nerven- oder Muskelzellen, die sich überhaupt nicht teilen, andere Zellen, wie die Leberzellen, teilen sich einmal pro Jahr, wieder andere, wie Darmepithelzellen oder Vorläuferzellen der Blutzellen, teilen sich häufiger als einmal pro Tag. Störungen im Zellzyklus bilden häufig die Grundlage für das Zustandekommen von bösartigen Erkrankungen wie Krebs. Daher ist das Wissen um die molekularen Mechanismen der Zellzyklusregulation ein wichtiger Schlüssel zur Behandlung von solchen Erkrankungen.

7.1.1 Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus

Bei der Erzeugung zweier identischer Tochterzellen muss die gesamte genetische Information der DNA sorgfältig repliziert und ganz genau auf die Tochterzellen verteilt werden, so dass jede Zelle bei der Teilung eine Kopie des gesamten Genoms erhält. Darüber hinaus muss die übrige Zellmasse verdoppelt werden, weil sonst aus jeder Zellteilungsrunde kleinere Zellen hervorgehen würden. Dabei muss die Zelle auf äußere Signale wie Wachstumsfaktoren reagieren, die ihr mitteilen, wann weitere Zellen gebraucht werden.

! Der Zellzyklus umfasst 4 Phasen.

Nach der Zellteilung, der Mitose, tritt die Zelle in die Interphase ein. Aufgrund fehlender Wachstumsfaktoren, fehlender Substrate oder als Antwort auf bestimmte Signale geht die Zelle in die G_0 -Phase (G , engl. gap, Lücke). Aus dieser Ruhephase können die Zellen auf Wachstumsfaktorsignale hin wieder in den Zellzyklus eintreten. Sie befinden sich dann in der G_1 -Phase, die

durch ein Zellwachstum und die Synthese von Proteinen charakterisiert ist, die für die DNA-Replikation benötigt werden (Abb. 7.1).

In der nächsten Phase, der S-Phase, wird die DNA repliziert, so dass die Zelle am Ende dieser Phase tetraploid ist. In der anschließenden G_2 -Phase stellt die Zelle sicher, dass die DNA-Replikation erfolgreich abgeschlossen wurde. Zudem bereitet sie sich auf die nächste Zellteilung, die Mitose (M-Phase) vor. Bei einer schnellwachsenden Säugerzelle dauert ein Zellzyklus etwa 24 Stunden, davon entfallen auf die G_1 -Phase 12 h, die S-Phase 6 h, die G_2 -Phase 6 h und auf die Mitose 30 min.

7.1.2 Die Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird genau kontrolliert. Damit wird verhindert, dass die nächste Zellzyklusphase begonnen wird, bevor die vorhergehende Phase beendet ist. Es macht keinen Sinn, die DNA-Synthese einzuleiten, wenn nicht genügend Nucleotide und Enzyme für diesen Prozess vorhanden sind. Es hätte für die Zelle ebenfalls katastrophale Folgen, wenn die Mitose eingeleitet

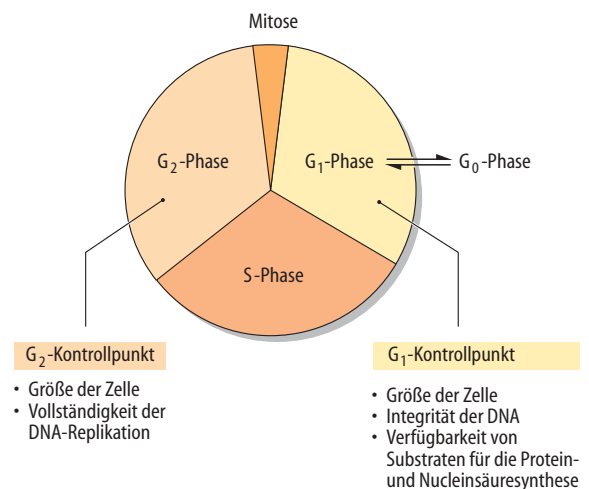


Abb. 7.1. Die einzelnen Phasen des Zellzyklus mit zwei Restriktionspunkten. (Einzelheiten s. Text)

würde, obwohl die DNA-Synthese noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Für diese Kontrolle hat die Zelle sog. Restriktionspunkte eingerichtet, an denen eine Überprüfung stattfindet, bevor der nächste Schritt erfolgt (☞ Abb. 7.1). Die Entscheidung, einen Restriktionspunkt zu passieren, wird durch externe Faktoren sowie von einem inneren Uhrwerk der Zelle bestimmt. Dieses innere Uhrwerk besteht aus den Cyclinen und den Cyclin-abhängigen Proteinkinasen. Der Verlust der Abhängigkeit der Zellzyklusprogression durch externe Wachstumsfaktoren und der Verlust der Zellzykluskontrolle an den Restriktionspunkten der Zelle ist das Charakteristikum von Tumorzellen. Die Aktivitäten der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (*cdks*, engl. cyclin dependent kinases) werden über verschiedene Faktoren und Prozesse reguliert.

Regulation über die Synthese und Abbau von Cyclinen.

!

Cycline stellen eine Gruppe von strukturell verwandten Proteinen dar, deren Gehalt in der Zelle in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen oszilliert. Cycline bestimmen den Zeitpunkt der Aktivierung der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen und deren Substratspezifitäten, sie sind die regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinasen. Ihr Gehalt in der Zelle wird über die Synthese und über den Abbau reguliert (☞ Abb. 7.2). Cycline binden an die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen und regulieren dadurch deren enzymatische Aktivität. Ein Cyclin-Molekül kann an unterschiedliche *cdks* binden und dadurch funktionelle Kinasen bilden.

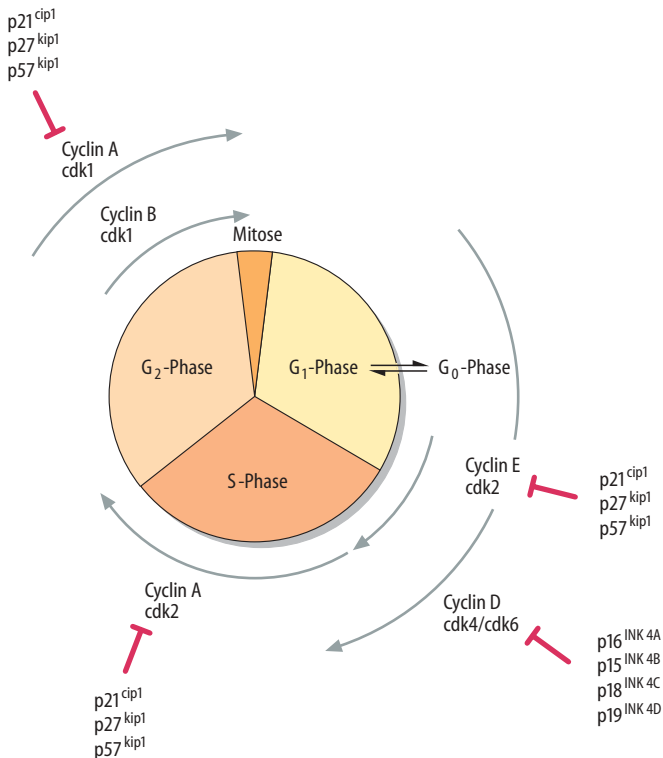
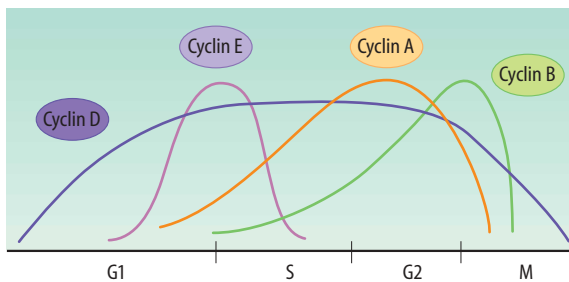


Abb. 7.2. Oben: Zeitlich regulierte Expression von Cyclinen während des Zellzyklus. Unten: Assoziation von Cyclinen mit *cdks* während des Zellzyklus und ihre Inhibitoren. Einzelne Cycline können mit verschiedenen *cdks* und *cdks* können mit verschiedenen Cyclinen komplexieren

! Die Aktivität der cdk's wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert

Cdk's bilden eine Familie von Proteinen, die eine hohe Konservierung der Aminosäuresequenz in den funktionellen Domänen besitzen. Am Beispiel des *cdk1* kann man zeigen, dass es inhibierende und stimulierende Phosphorylierungen der *cdk's* gibt. Eine Phosphorylierung von *cdk1* an der Aminosäure Threonin 161 durch eine *cdk*-aktivierende Kinase (*CAK*, Cyclin H/*cdk7*/*Mat1*) ist eine absolut notwendige Voraussetzung für die Kinaseaktivität von *cdk's*. Die *wee1*-, *mik1*- und *myt1*-Kinasen phosphorylieren *cdk1* an Threonin 14 und Tyrosin 15. Diese Aminosäuren liegen im aktiven Zentrum der *cdk's* und die Phosphorylierung an beiden Aminosäuren führt zu einer Inaktivierung der *cdk's*. Wenn die Zelle zur Zellteilung bereit ist, wird *cdk1* durch die **Proteinphosphatase** *cdc25C* dephosphoryliert, wodurch das *cdk1* im Komplex mit Cyclin B1 seine volle Aktivität erhält und die Zelle wird zum Eintritt in die Mitosephase stimuliert (☞ Abb. 7.3).

! Cyclin abhängige Proteinkinasen werden über Inhibitoren reguliert.

Es gibt zur Zeit zwei bekannte Familien von Inhibitorfamilien. Zum einen die *p21^{Cip1}*-Familie, die verschiedene Cyclin-abhängige Proteinkinasen inhibieren können, zum anderen die Familie der *p16^{INK4a}*-verwandten Inhibitoren, zu denen zusätzlich die Proteine *p18^{INK4C}* und *p19^{INK4D}* gehören. Diese Inhibitorfamilie beschränkt ihre Hemmung im wesentlichen auf die *G₁* spezifischen Cyclin/*cdk4*/*cdk6*-Komplexe (☞ Abb. 7.2 b).

! Die subzelluläre Lokalisation der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen reguliert ihre Aktivität.

Alle Cycline haben in ihrer Aminosäuresequenz ein Kernlokalisierungssignal, mit dessen Hilfe sie in den Zellkern transportiert werden. Den *cdk's* fehlt ein solches Kernlokalisierungssignal, so dass man davon ausgeht, dass sie mit den Cyclinen in den Zellkern transportiert werden. Im Zellkern befinden sich wichtige Substrate, deren Aktivitäten über eine Phosphorylierung reguliert werden (☞ Abb. 7.3).

7.1.3 Substrate der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen

In der *G₂*-Phase und am Beginn der M-Phase sind nukleäre Lamine und Mikrotubuli-assoziierte Proteine wichtige Substrate der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen. In der *G₁*-Phase des Zellzyklus ist das Wachstums-suppressorprotein Rb (Retinoblastom-Protein) ein zentrales Substrat. Das Rb-Protein ist im Ruhezustand der Zelle hypophosphoryliert. In der Mitte der *G₁*-Phase wird das Rb-Protein durch Cyclin D/*cdk4* oder

Cyclin D/*cdk6* phosphoryliert, was zu der Freisetzung des im hypophosphorylierten Zustand gebundenen Transkriptionsfaktors E2F führt. E2F bindet zusammen mit einem weiteren Faktor DP1 an Promotorregionen (S. 247 ff.) der DNA, wodurch die Transkription derjenigen Gene erfolgt, deren Produkte für den weiteren Verlauf der *G₁*- und S-Phase benötigt werden.

Das Retinoblastomprotein ist in mehr als 60% aller beim Menschen auftretenden Tumoren deletiert oder zur funktionellen Inaktivität verändert. In solchen Fällen entzieht sich die Zelle der oben beschriebenen Regulation der *G₁*-Phase durch Cyclin-abhängige Proteinkinasen.

7.1.4 Wirkung exogener Faktoren auf den Zellzyklus

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass Säugetierzellen in Zellkultur nur dann proliferieren, wenn dem Kulturmedium Serum zugesetzt wird. Serum enthält eine Reihe von mitogen wirkenden Wachstumsfaktoren (☞ Tabelle 7.1). In Abwesenheit dieser Faktoren gehen Zellen in die *G₀*-Phase des Zellzyklus über oder sterben durch Apoptose (S. 213). Im letzten Jahrzehnt ist unser Wissen über die Signalweiterleitung von Zelloberflächenrezeptoren bis zu den nukleären Transkriptionsfaktoren sehr stark gewachsen. Dabei stellt der am besten untersuchte MAP (*engl.* mitogen activated protein) Kinaseweg einen Schlüsselmechanismus dar, über den Wachstumsfaktorsignale an der Zellmembran intrazellulär weitergeleitet und umgesetzt werden.

Intrazelluläre Signalkaskade ☞ Abb. 7.4 stellt die heutigen Vorstellungen über einen von mehreren Signaltransduktionswegen der mitogenen Wachstumsfaktoren vor. Nach Bindung des Liganden werden spezifische Tyrosylreste der jeweiligen Rezeptoren phospho-

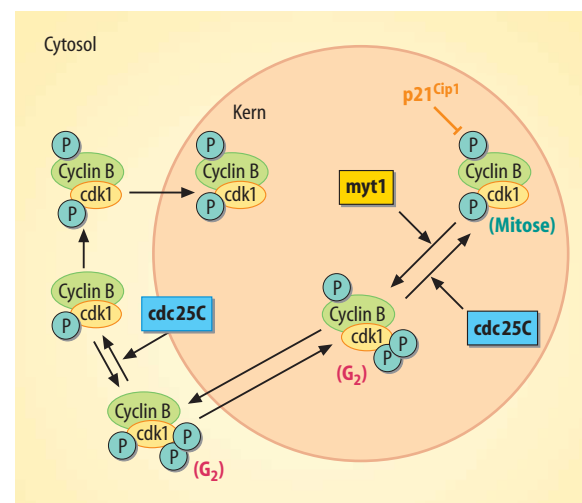


Abb. 7.3. Regulation der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen durch Phosphorylierung und unterschiedliche subzelluläre Lokalisation

Tabelle 7.1. Wachstumsfaktoren im Serum (Auswahl)

Faktor	Funktion
Plättchen-Wachstumsfaktor(PDGF)	Dient als sog. Kompetenzfaktor, d. h. führt dazu, daß Zellen für andere Wachstumsfaktoren sensitiv werden.
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Dienen als Progressionsfaktoren, d. h. stimulieren Proliferation von Zellen, die durch PDGF kompetent gemacht wurden.
Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)	
Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II)	Dienen als Proliferations- und Differenzierungsfaktoren.

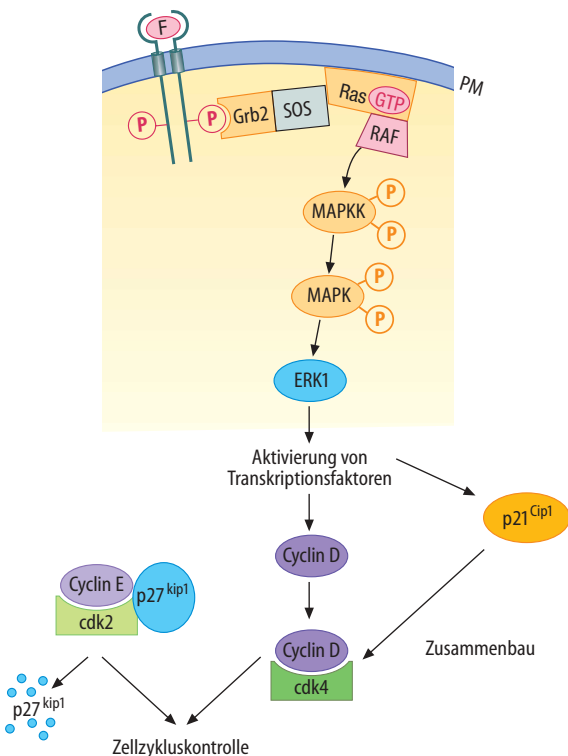


Abb. 7.4. Steuerung des Zellzyklus durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren. Die Bindung von Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren führt über bestimmte Adaptorproteine zu einer Aktivierung einer Proteinkinase-Kaskade. Diese Signalweiterleitung resultiert schließlich in der Aktivierung von Proteinen der ERK-Familie, die über verschiedene Mechanismen auf den Zellzyklus einwirken. GRB2 ist ein Adapterprotein mit SH2-Domänen, SOS katalysiert den Austausch von GDP mit GTP am zur Familie der kleinen G-Proteine gehörigen Ras-Protein. Dieses aktiviert die Raf-Kinase, was in einer Kaskade zur Aktivierung der MAP-Kinase führt

ryliert und dienen dann als Bindungsstellen für eine Reihe von Adaptorproteinen. Diese verfügen hierzu über eine sog. *SH2-Domäne* (engl. src homology domain), die ursprünglich in der viralen src-Kinase (S. 320) entdeckt wurde. Für die Induktion der für die mitogene Antwort verantwortlichen Gene ist dabei die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) von besonderer Bedeutung. Sie wird durch eine Phosphorylierungskaskade, analog der beim Glykogenabbau (S. 415 ff.) verwendeten, aktiviert, wobei das primäre Ereignis die Aktivierung der *Raf-Kinase* durch ein als *Ras* bezeichnetes G-Protein ist. Ras ist seinerseits über

die Adaptorproteine *SOS* und *Grb 2* mit den Rezeptortyrosinkinasen verknüpft.

Ein multifunktionelles Zwischenprodukt in dieser Kaskade stellt das ERK1- (engl. extracellular signal-regulated kinase-) Protein dar.

- ▶ ERK1 wirkt direkt auf die Expression des Cyclin D1, indem es Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und ETS aktiviert, die an den Cyclin D1 Promotor binden.
- ▶ ERK1 wirkt darüber hinaus auf den Zusammenbau der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen ein.
- ▶ ERK1 fördert den Abbau von Proteinen der p21-Familie der Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Proteinkinasen.

Außer den genannten aktivierenden Faktoren kann der Zellzyklus durch extrazelluläre Faktoren auch gehemmt werden. Besonders gut ist dies für den transformierenden Wachstumsfaktor β 1 (TGF β 1) belegt. Dieser blockiert den Übergang zwischen der G₁- und S-Phase dadurch, dass er ein Inhibitorprotein (Kip1) aktiviert, welches das Cyclin E aus seiner Bindung an cdk2 verdrängt.

7.1.5 Apoptose oder der programmierte Zelltod

Bei vielzelligen Organismen ist die Differenzierung der verschiedenen Gewebe und Organe während der Wachstumsphase sowie die Aufrechterhaltung konstanter Organgrößen und die Involution von Organen unter den verschiedensten physiologischen und pathologischen Bedingungen nicht nur vom ungestörten Ablauf der Zellproliferation und -differenzierung abhängig, sondern auch davon, dass Zellen unter entsprechenden Bedingungen eliminiert werden können (☞ Tabelle 7.2). So kommt es während der Embryonalentwicklung von Säugetieren zur Zerstörung funktionsloser Neurone oder zur Eliminierung autoreaktiver T-Lymphocyten (S. 1128). Beim Erwachsenen findet sich die Entfernung von Zellen speziell bei den Organen, die einer reversiblen Expansion unterliegen. Beispiele hierfür sind das Epithel der Brustdrüse oder der Prostata. Wahrscheinlich ist die Entfernung und Abtötung nicht gebrauchter Zellen ein in allen Geweben des Organismus vorkommender Vorgang, der z. B.

Tabelle 7.2. Organe, in denen eine physiologische Apoptose stattfindet (Auswahl)

Organ	Auslöser
Lactierende Milchdrüse	Prolactinabfall
Prostata	Mangel an Androgenen
Leber	Hunger
Lymphocyten	Glucocorticoide
Neuronen	Mangel an NGF


auch für das Schicksal virusbefallener Zellen oder mancher Tumorzellen von großer Bedeutung ist.

! Apoptose und Nekrose sind klar unterscheidbar.

Schon durch in den 50er Jahren durchgeführte, meist morphologische Untersuchungen wurde klar, dass die oben aufgeführten Eliminierungen von Zellen nach einem genau festgelegten Programm erfolgen, weswegen man sie auch als programmierten Zelltod oder **Apoptose** bezeichnete. Zu diesem Begriff gehört morphologisch, dass nur einzelne, individuelle Zellen in einem sonst gesunden Organ abgetötet werden. Ihr Sterben beginnt mit einer Schrumpfung des Zellkerns, relativ spät kommt es zum Zerfall der Plasmamembran in viele Vesikel und so zur Auflösung der Zelle. Die DNA der betroffenen Zellen wird rasch abgebaut und bildet häufig Bruchstücke, die den Nucleosomen-assoziierten DNA-Fragmenten entsprechen. Die getöteten Zellen bzw. das aus ihnen entstandene Material wird rasch von benachbarten Makrophagen aufgenommen; es kommt nicht zu Entzündungsreaktionen oder Antikörperbildung. Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter

RNA- und Proteinbiosynthese. Dies macht die Apoptose klar unterscheidbar von der **Zellnekrose**, die häufig mehrere Zellen eines geschädigten Organs betrifft, bei der es zur Zellschwellung und zum Verlust der Membranintegrität, aber erst relativ spät zum DNA-Abbau kommt und bei der regelmäßig eine entzündliche und immunologische Reaktion zu beobachten ist.

Signalkaskaden zur Auslösung der Apoptose führen zur Aktivierung von Caspasen. !

Es gibt heute viele Wege, über die die Apoptose ausgelöst wird.  Abb. 7.5 zeigt den **Todesrezeptorweg** (engl. death receptor) und den **mitochondrialen Weg**.

- ▶ Beim mitochondrialen Weg kommt es infolge eines externen Signals zu einer Aktivierung von Proteinen der bcl-2-Familie und der bax-Subfamilie. Dies führt zur Anheftung dieser Proteine an die Mitochondrienmembran, was wiederum zu einer Freisetzung von Cytochrom *c* (S. 537) führt. Cytochrom *c* bindet an das cytosolische Protein Apaf-1, das Caspasen aktiviert. Caspasen sind Cysteinproteasen (S. 294) mit einer Spezifität für Asparaginsäure in einer Polypeptidsequenz. Aktivierte Caspasen spalten ein breites Spektrum von verschiedenen Proteinen und verändern damit deren Funktion.
- ▶ Ein anderer Weg der Apoptose läuft über einen Liganden/Rezeptorkomplex (Fas/CD95) in der Plasmamembran. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor wird auf der cytosolischen Seite des Rezeptors die Bindung eines Adaptermoleküls stimuliert, welches wiederum Caspasen rekrutiert. Über eine Kaskade von verschiedenen Proteolysereaktionen mit verschiedenen Caspasen kommt es letztlich zur Apoptose der Zelle.

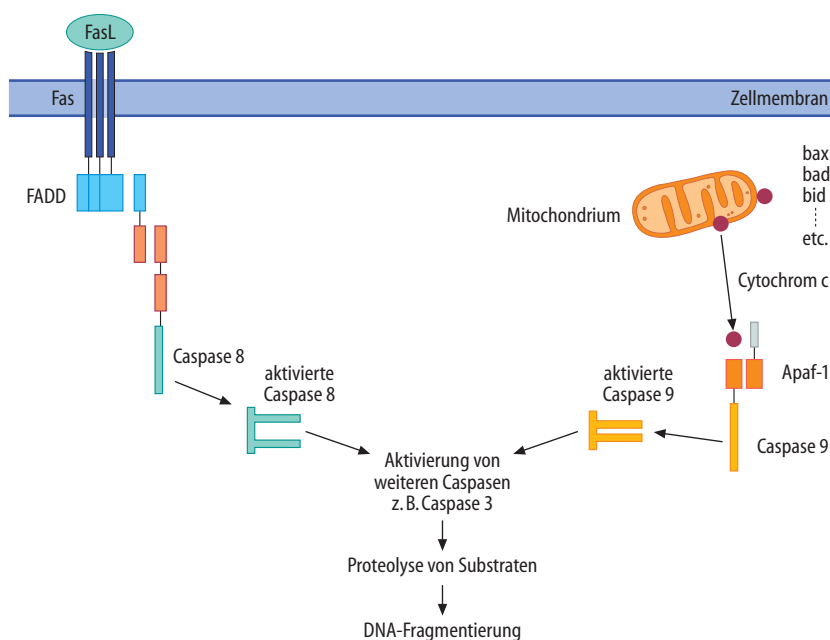


Abb. 7.5. Mechanismen, die eine Apoptose auslösen können. Dargestellt ist eine Induktion der Apoptose über einen Liganden/Rezeptor-Weg von der Plasmamembran ausgehend und der mitochondrialen Weg der Apoptoseauslösung. (Weitere Einzelheiten s. Text)

Fehler in der Apoptose führen zur Entstehung von Tumoren und zum Auftreten von Tumorzellen, die gegen eine cytotoxische Therapie resistent sind. Fehler in der Apoptose spielen aber auch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen.

Die Beteiligung der gleichen Schlüssel-moleküle bei der Induktion der Apoptose wie auch der Regulation der Zellproliferation (z. B. p53, S. 1167) zeigt, dass intrazelluläre Signalwege, je nach den Erfordernissen, die Zelle in die eine oder andere Richtung dirigieren können.

wichtig

KERNAUSSAGEN

Bei vielzelligen Organismen wie dem Menschen finden das ganze Leben lang Zellteilungen statt. Dabei verdoppelt die Zelle ihren Inhalt bevor sie sich in zwei identische Tochterzellen teilt. Zellteilungen werden in streng regulierten und kontrollierten Phasen des Zellzyklus vorbereitet.

Zur Regulation dieser einzelnen Phasen hat die Zelle ein endogenes Kontrollsystem, eine innere Uhr, die von Cyclin-abhängigen Proteinkinasen ausgeübt wird.

Cyclin-abhängige Proteinkinasen werden reguliert über:

- ▶ Synthese und Abbau von Cyclinen und Anlagerung der Cycline an die katalytischen cdk-Untereinheiten;
- ▶ Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktion der cdk's;
- ▶ Inhibitor-moleküle;
- ▶ subzelluläre Lokalisation.

Substrate der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen sind Strukturproteine der Zelle und Proteine, die mit Transkriptionsfaktoren wechselwirken, oder Transkriptionsfaktoren selbst. Zellproliferation wird exogen über Wachstumsfaktoren reguliert, die ihre Information über eine Signaltransduktionskaskade ins Zellinnere bis in den Zellkern weitergeben. Solche Signalkaskaden beruhen auf multiplen, hintereinander geschalteten Phosphorylierungsreaktionen, die darüber hinaus auch zur Verstärkung des Signals führen. Die Apoptose dient der gezielten Eliminierung von Zellen in einem multizellulären Organismus. Sie wird ebenfalls über verschiedene Signalkaskaden in der Zelle reguliert, wobei ein gemeinsamer Endpunkt aller Wege die Aktivierung von proteolytisch wirkenden Caspasen ist.

wenn die Zelle durch entsprechendes Wachstum und Biosynthesen der Bausteine die für die anschließende Teilung erforderliche Masse erhalten hat. Ferner kann die Zellteilung in der Mitose erst dann stattfinden, wenn die gesamte DNA der Zelle vollständig repliziert ist.

Ursprünglich wurden die mit der Replikation verknüpften enzymatischen Vorgänge ausschließlich an Bakterienzellen, v. a. an *E. coli*, untersucht. Da sich diese Organismen durch eine besonders hohe Replikationsrate auszeichnen und ihre DNA beliebig mutiert werden kann, sind sie nach wie vor hervorragende Werkzeuge für diese Untersuchungen. Die Übertragung der an Prokaryoten gewonnenen Erkenntnisse auf eukaryote Organismen und damit auch auf Säugetiere ist in den letzten Jahren erfolgreich gelungen. Dabei hat sich herausgestellt, dass das Prinzip der Replikation bei pro- und eukaryoten Organismen identisch ist, dass jedoch bei den letzteren infolge der größeren Komplexität ihres Genoms kompliziertere Regulationsvorgänge vorliegen.

7.2.1 Das Prinzip der semikonservativen DNA-Replikation

Nachdem gezeigt worden war, dass mit Ausnahme einiger Viren (Kap. 10) in allen Organismen die DNA in Form eines Doppelstrangs aus zwei antiparallel verlaufenden Einzelsträngen vorliegt (S. 148), stellte sich die Frage nach dem Mechanismus ihrer Verdopplung. Matthew Meselson und Franklin Stahl zeigten schon 1958 in einem eleganten Experiment, dass die DNA-Replikation **semikonservativ** erfolgt (👁️ Abb. 7.6). Sie verwendeten hierzu *E. coli*-Bakterien, die sie über viele Generationen in einem Medium gezüchtet hatten, das das schwere Stickstoffisotop ^{15}N anstatt des normalen Isotops ^{14}N enthielt. Nach Synchronisierung der *E. coli*-Bakterien stellten sie das Medium auf das normale Isotop ^{14}N um. Die Ausgangs-DNA und die DNA der ersten und zweiten Generation wurde in einem CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Während sie zu Beginn des Experiments natürlich nur eine DNA-Bande mit der dem Stickstoffisotop ^{15}N entsprechenden Dichte nachweisen konnten, fand sich nach einer Generation in der isolierten DNA eine Dichte, die genau zwischen der ^{15}N - und ^{14}N -markierten DNA lag. Nach zwei Generationen fanden sich zwei DNA-Spezies, von denen die eine die Dichte der normalen ^{14}N -markierten DNA aufwies, die zweite die intermediäre Dichte. Dieses Ergebnis konnte nur durch die Annahme erklärt werden, dass es bei der DNA-Replikation zu einer Aufspaltung der beiden Doppelstränge kommt, von denen dann jeder als Matrize für die Synthese eines neuen Strangs dient. Damit besteht jeder aus einer Replikation hervorgegangene DNA-Doppelstrang aus einem parentalen und einem neu synthetisierten Einzelstrang. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Mechanismus der semikonservativen Replikation nicht auf

7.2 Die Replikation der DNA

Die korrekte **Replikation** der DNA ist das zentrale Ereignis im Zellzyklus. Sie ist eine Voraussetzung für die während der M-Phase erfolgende mitotische Teilung und damit die molekulare Grundlage für die Weitergabe der genetischen Information auf die Tochterzellen. Dass es sich bei der DNA-Replikation um einen sehr genau kontrollierten Prozess handeln muss, geht allein aus der Überlegung hervor, dass sie erst dann erfolgen kann,

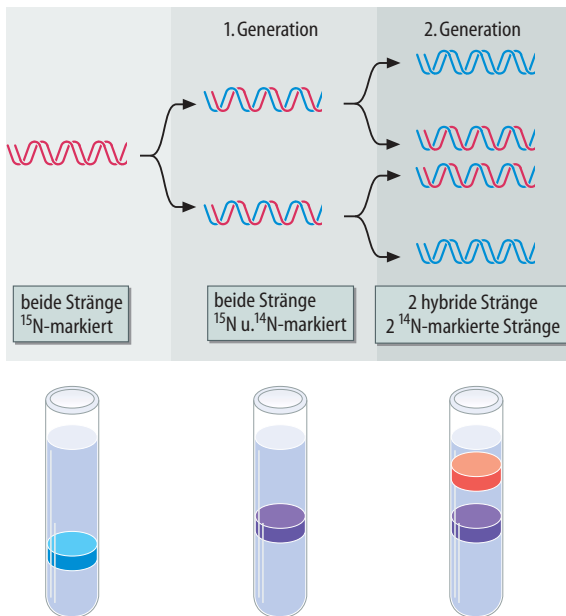


Abb. 7.6. Nachweis des semikonservativen Mechanismus der DNA-Replikation. *E. coli*-Bakterien bauen das schwere Stickstoffisotop ^{15}N in die DNA ein, die dadurch schwerer wird. Lässt man derartige Bakterien in einem Medium mit dem normalen Isotop ^{14}N weiter wachsen, so zeigt die DNA nach einer Generation ein intermediäres Gewicht zwischen derjenigen der ^{15}N - bzw. ^{14}N -markierten DNA, in der zweiten Generation jedoch zu 50 % ^{14}N -markierte DNA und DNA der intermediären Dichte. Die einzelnen Formen der DNA können auf einem Dichtegradienten analysiert werden

Bakterienzellen beschränkt ist, sondern universal für alle Organismen gilt, deren Genom aus doppelsträngiger DNA besteht.

7.2.2 Das Replikon als Grundeinheit der Replikation

Der Befund, dass die DNA-Replikation semikonservativ erfolgt, gibt zunächst noch keine Antwort auf die Frage nach den zugrunde liegenden enzymatischen Mechanismen. Auch hier waren Untersuchungen an bakteriellen Systemen, die im Vergleich zu eukaryoten Zellen wesentlich weniger DNA in nur einem ringförmigen bakteriellen Chromosom enthalten, äußerst hilfreich. Sie zeigten klar, dass die Replikation des bakteriellen Chromosoms an einer definierten Stelle des Chromosoms, dem sog. **Replikationsursprung** (engl. origin of replication) beginnt. Die Stelle, an der die neu synthetisierte DNA sichtbar wird, wird auch als **Replikationsgabel** bezeichnet. Von dort aus verläuft die bakterielle Replikation entlang des ringförmigen Chromosoms, so dass am Ende zwei ringförmige Doppelstränge entstanden sind (👁️ Abb. 7.7). Als **Replikon** bezeichnet man dabei diejenige Einheit der DNA, in der die einzelnen Schritte der Replikation stattfinden. Jedes Replikon muss über einen Replikationsursprung verfügen. Da bakterielle Chromosomen nur einen Replika-

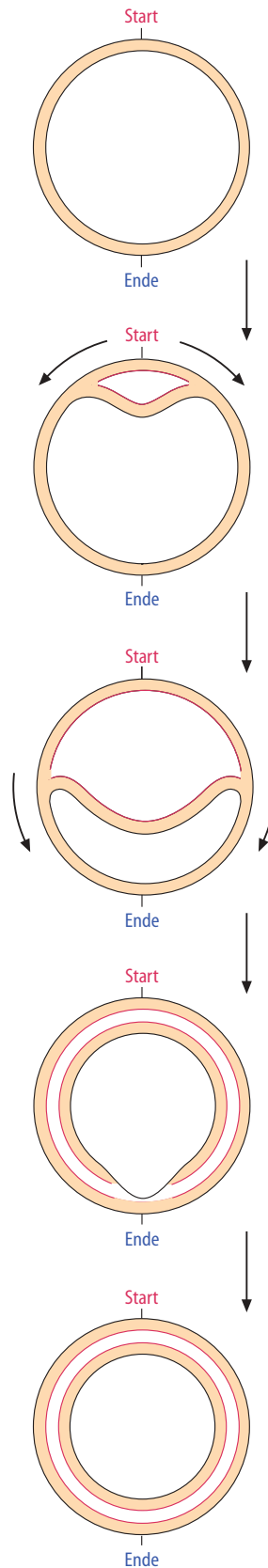


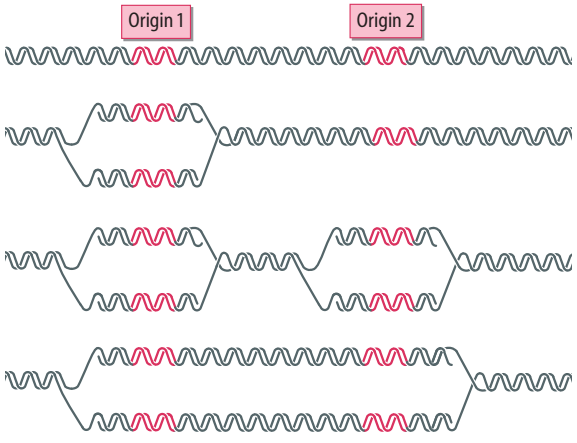

Abb. 7.7. Replikation des aus einem Replikon bestehenden ringförmigen bakteriellen Chromosoms

tionsursprung enthalten, stellen sie auch nur ein Replikon dar.

! Replikationsblasen vergrößern sich bidirektional.

Eine wichtige Frage für die DNA-Replikation war diejenige nach der Richtung, in der sich die am Replikationsursprung entstehende Replikationsgabel bewegt. Prinzipiell ist hier eine unidirektionale und eine bidirektionale Replikation möglich, dementsprechend müssen jeweils eine bzw. zwei funktionelle Replikationsgabeln entstehen. Durch Untersuchung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von replizierender DNA ist diese Frage nicht zu entscheiden. Wenn jedoch während der DNA-Replikation radioaktive Desoxyribonucleotide zugegeben werden, werden die synthetisch aktiven Replikationsgabeln markiert: im Falle der unidirektionalen Replikation nur eine, bei bidirektionaler Replikation jedoch beide. Dabei hat sich gezeigt, dass pro- und eukaryote Chromosomen während der S-Phase des Zellzyklus durch bidirektionale Replikation verdoppelt werden.

! Bei der Replikation des eukaryoten Genoms treten multiple Replikationsblasen auf.

Die Replikation der eukaryoten DNA ist auf die S-Phase des Zellzyklus beschränkt. Bei Säugetieren dauert diese etwa 6 Stunden, in denen die etwa 3×10^9 Basenpaare verdoppelt werden sollen. Auf Grund der maximalen Aktivität der für die Replikation verantwortlichen DNA-Polymerasen (s.u.) ist es von vornherein ausgeschlossen, dass jedes Chromosom nur ein Replikon darstellt. Es enthält vielmehr eine große Zahl unterschiedlicher Replikons, die jeweils zu unterschiedlichen Zeiten der S-Phase repliziert werden. Der Ablauf der DNA-Replikation in Anwesenheit vieler Replikationsblasen ist schematisch in  dargestellt. Die Replikation erfolgt in den Replikationsblasen bidirektional und wird dadurch beendet, dass zwei aufeinander zulaufende Replikationsblasen miteinander verschmelzen. Wie aus  zu entnehmen ist, sind die Replikons bei eukaryoten Zellen relativ klein und replizieren die DNA wesentlich langsamer als die bakteriellen Replikons. Einer der Gründe hierfür mag in dem wesentlich komplexeren Aufbau des eukaryoten Chromatins (S. 149) liegen.

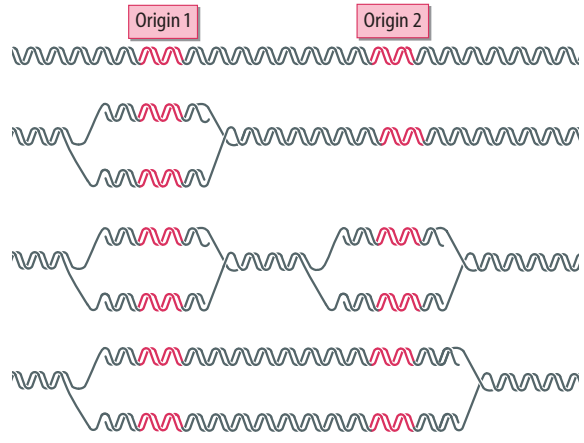


Abb. 7.8. Replikation der eukaryoten DNA mit Hilfe multipler Replikationsblasen. (Einzelheiten s. Text)

7.2.3 Für die Replikation benötigte Enzymaktivitäten

In Anbetracht der Komplexität der Chromatinstruktur ist es einleuchtend, dass Zellen einen außerordentlich komplizierten Apparat zur Replikation ihrer DNA benötigen. Vom Konzept her kann man diesen Vorgang in die drei Stadien

- ▶ Initiation,
- ▶ Elongation und
- ▶ Termination

einteilen (die gleiche Einteilung wird auch für Transkription und Proteinbiosynthese (Kapitel 8 und 9) verwendet.


Die Initiation beginnt damit, dass ein Replikationsursprung von entsprechenden Proteinkomplexen erkannt und damit der Start der DNA-Replikation festgelegt wird. Damit dieser erfolgen kann, muss an dieser Stelle der DNA-Doppelstrang in die beiden Einzelstränge getrennt werden, was einem Schmelzen der DNA (S. 161) entspricht. So lange die neu synthetisierten Stränge zur Verfügung stehen, muss verhindert werden, dass die beiden parentalen Stränge wieder reassoziieren. Für die Elongation der DNA wird ein auch als **Replisom** bezeichneter Proteinkomplex benötigt, der sich am Replikationsursprung zusammenlagert

Tabelle 7.3. Pro- und eukaryote Replikons. *bp* Basenpaare

Organismus	Replikons	Durchschnittliche Länge	Replikationsgeschwindigkeit	Beispiel
Bakterium	1	4200 kb	50 000 bp/min	(<i>E. coli</i>)
Hefe	500	40 kb	3600 bp/min	(<i>S. cerevisiae</i>)
Fruchtfliege	3500	40 kb	2600 bp/min	(<i>D. melanogaster</i>)
Maus	25 000	150 kb	2200 bp/min	(<i>M. musculus</i>)
Pflanze	35 000	300 kb		(<i>V. faba</i>)

und danach an der Replikationsgabel entlangwandert. Die Termination der DNA-Replikation erfolgt durch das Zusammentreffen zweier Replikationsgabeln. Bei linearen DNA-Molekülen treten besondere Probleme auf, die später besprochen werden (S. 222).

! Vor dem Start der DNA-Replikation ist eine lokale Denaturierung der DNA notwendig.

Bei Prokaryoten liegen wesentlich mehr gesicherte Kenntnisse über die Initiation der DNA-Replikation vor als in eukaryoten Zellen. Wie aus  Abb. 7.9 hervorgeht, sind bei *E. coli* wenigstens fünf Proteine für diesen Vorgang notwendig.

- ▶ Das **DnaA-Protein** bindet an spezifische Sequenzen des Replikationsursprungs und öffnet hierbei den Doppelstrang. Für diesen Vorgang wird ATP benötigt.
- ▶ Durch das **DnaB-Protein** wird die DNA nach beiden Richtungen hin entspiralisiert, so dass bereits zwei Replikationsgabeln präformiert werden.

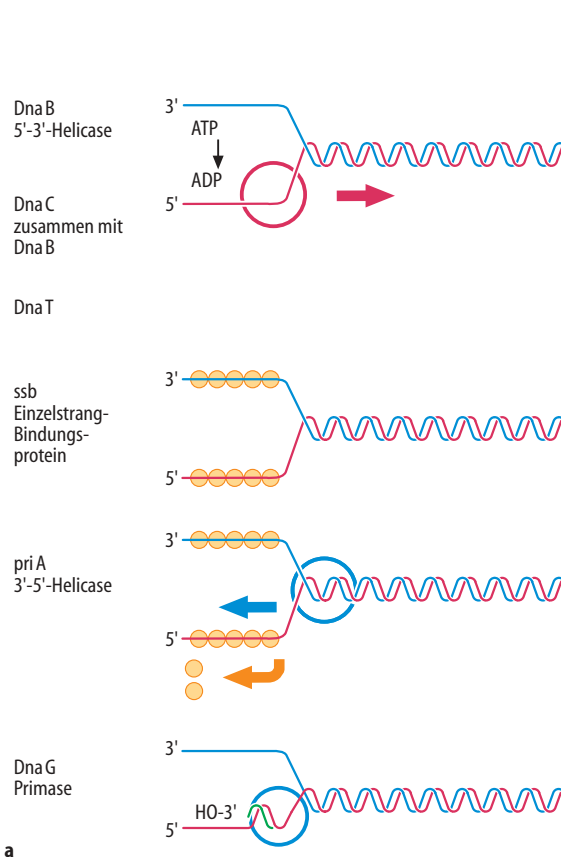
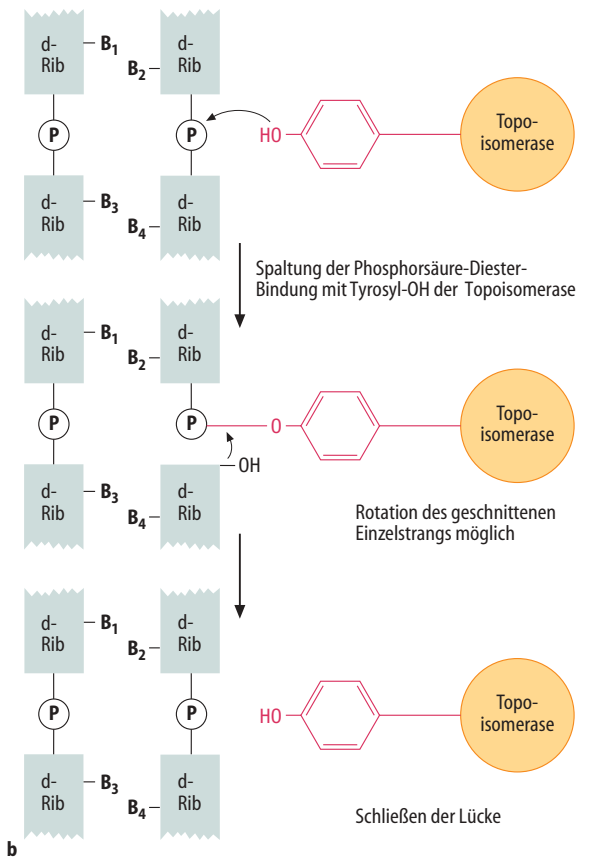


Abb. 7.9 a, b. Initiation der DNA-Replikation bei *E. coli*. **a** Für die Initiation der Replikation muss zunächst durch eine Helicase (DnaB) zusammen mit dem Produkt des DnaC-Gens, einer weiteren Helicase, eine lokale Entwindung der DNA stattfinden. Die dadurch entstehende Verdrillung des oberhalb gelegenen DNA-Stücks wird durch Topoisomerasen (**s. b**) aufgehoben. Einzelstrangbindungsproteine verhindern die Reassoziierung der beiden Einzelstränge, anschließend werden mit Hilfe des Dna G-Primasekomplexes die Primer synthetisiert. **b** Mechanismus der DNA-Topoisomerase I. Ein Tyrosylrest des Topoisomeraseproteins greift an einer DNA-Phosphodiester-Bindung an, so dass ein Strangbruch entsteht. Das Tyrosyl-OH bildet mit dem DNA-Phosphat eine energiereiche Bindung aus. Die beiden Enden der DNA-Doppelhelix können nun umeinander rotieren. Da die Bindungsenergie im Phosphotyrosin des Enzymsubstratkomplexes gespeichert ist, kann in einer reversiblen Reaktion der Strangbruch geschlossen werden

- ▶ Die Reassoziierung der beiden Einzelstränge wird dadurch verhindert, dass ein als **SSB** (*engl.* single strand binding protein) bezeichnetes Protein an die einzelsträngige DNA bindet.
- ▶ Die durch die Entspiralisierung entstandene Spannung des DNA-Doppelstranges wird schließlich durch die **DNA-Topoisomerase II** beseitigt.

Aufgrund der vorliegenden Daten muss man annehmen, dass die DNA-Replikation durch Regulation der Initiationsphase gesteuert wird.

Bei Eukaryoten sind die Verhältnisse wegen der Komplexität des eukaryoten Genoms wesentlich komplizierter. Bei der Hefe ist ein DNA-Motiv gefunden worden, das dieselbe Funktion hat wie der bakterielle Replikationsursprung und welches als **ARS** (*engl.* autonomously replicating sequence) bezeichnet wird. Darüber hinaus haben sich auch in Eukaryoten Einzelstrangbindungsproteine nachweisen lassen.



merase I. Ein Tyrosylrest des Topoisomeraseproteins greift an einer DNA-Phosphodiester-Bindung an, so dass ein Strangbruch entsteht. Das Tyrosyl-OH bildet mit dem DNA-Phosphat eine energiereiche Bindung aus. Die beiden Enden der DNA-Doppelhelix können nun umeinander rotieren. Da die Bindungsenergie im Phosphotyrosin des Enzymsubstratkomplexes gespeichert ist, kann in einer reversiblen Reaktion der Strangbruch geschlossen werden