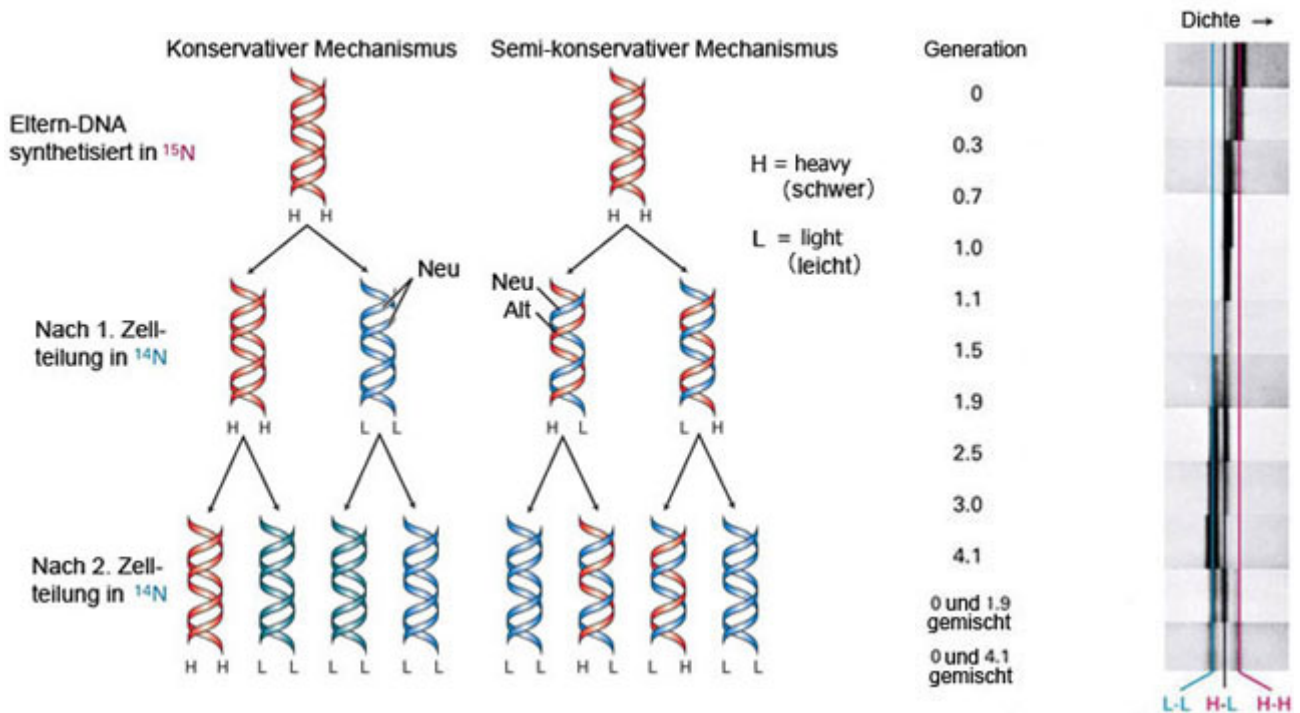


3 DNA-Synthese (Replikation)

- 3.1 Ursprung der Replikation
- 3.2 Primase
- 3.3 DNA-Polymerasen
- 3.4 Leitstrang-Synthese
- 3.5 Folgestrang-Synthese
- 3.6 DNA-Polymerase I von *E. coli*
- 3.7 DNA-Ligase
- 3.8 Superspiralisierung
- 3.9 Topoisomerasen
- 3.10 Telomerasen
- 3.11 Organisation des Eukaryotischen Genoms
- 3.12 Hemmstoffe der Replikation
- 3.13 Der Zellzyklus

Die DNA-Replikation erfolgt semikonservativ.

Der DNA-Doppelstrang wird geöffnet und jeder Einzelstrang determiniert jeweils einen komplementären Tochterstrang. Durch fortlaufende Synthese entstehen zwei neue DNA-Doppelstränge, welche je zur Hälfte aus einem alten und einem neu synthetisierten Strang bestehen.



Bilder: Nachweis der semikonservativen Replikation in *E. coli* durch Dichtegradientenzentrifugation. Die Lage einer DNA-Bande hängt von ihrem Gehalt an ^{14}N und ^{15}N ab. Nach 1,0 Generationen sind alle DNA-Moleküle Hybride mit gleichen Mengen an ^{14}N und ^{15}N , und es ist keine Eltern-DNA (^{15}N) mehr übrig.

3.1 Ursprung der Replikation

Die DNA Replikation fängt generell an einem bestimmten Ort an, dessen DNA-Sequenz sehr AT-reich ist. In *E. coli* wird der Replikationsstartpunkt "Ori C" genannt .

Der Replikationsstartpunkt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* heisst ARS (autonomously-replicating sequence). Replikationsursprünge in menschlicher DNA wurden bis anhin nicht identifiziert.

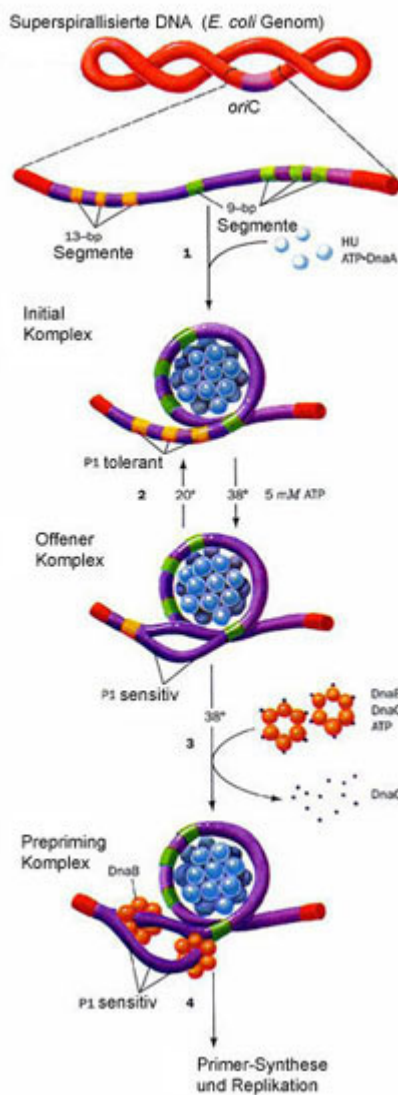


Bild: Replikationsinitiation in *E. coli*. Durch sequenzspezifische Bindung von DnaA, B und C Proteinen wird die Doppelhelix an dieser Stelle geöffnet, so dass die Primer-Synthese stattfinden kann. Das DnaA-Protein bindet spezifische AT-reiche Sequenzen, während DnaB und DnaC für die Trennung der DNA-Stränge notwendig sind. DnaB ist eine ATP-abhängige DNA-Helikase, die als Homohexamer wirkt.

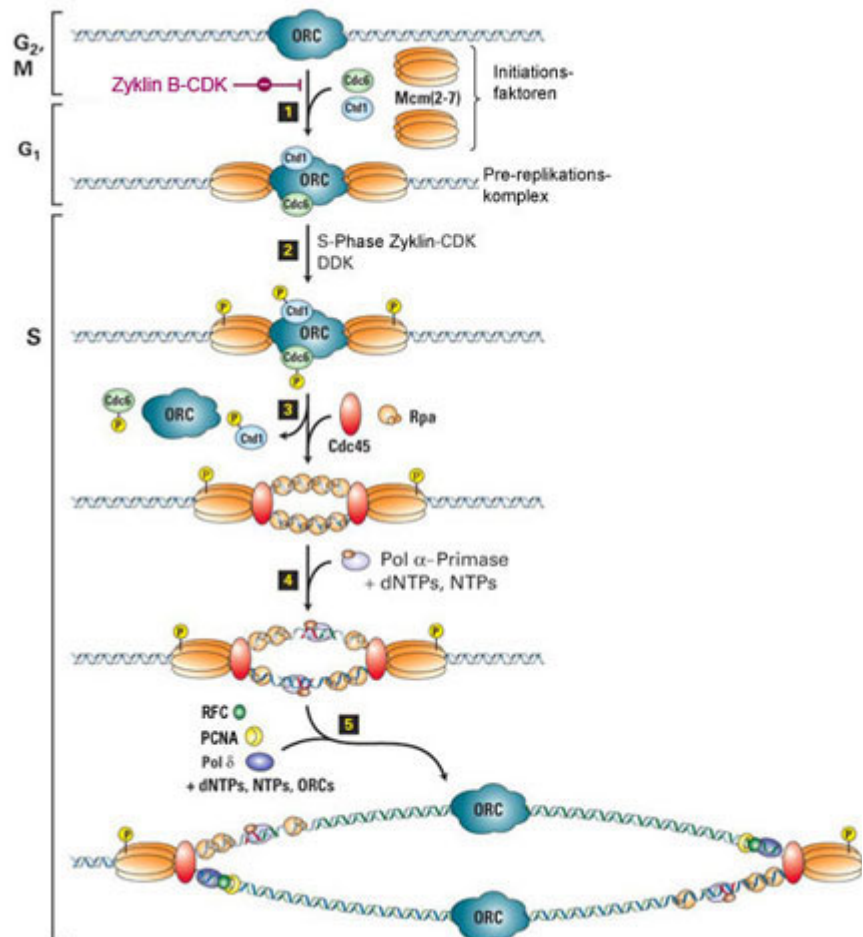


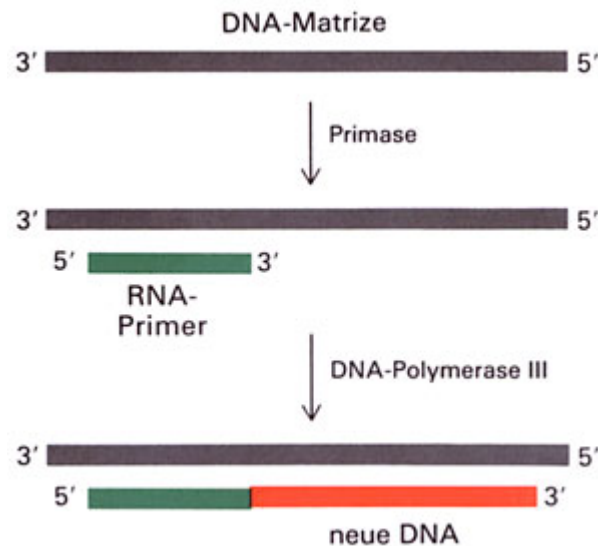
Bild: Replikationsinitiation in Eukaryoten. Der Replikationsursprung wird in G2/M-Phasen des Zellzyklus vom (inaktiven) Origin Recognition Complex (ORC) gebunden. Während der G1-Phase wird ORC von der (inaktiven) MCM2-7-Helikase und anderen zellzyklus-abhängigen Faktoren gebunden (origin licensing). Am Anfang der S-Phase werden MCM2-7 und ORC phosphoryliert, was zur Dissoziation von ORC und Aktivierung von MCM2-7 führt. Der Ursprung wird geöffnet, was die Bindung des Primase/Polymerasekomplexes ermöglicht. Sobald die Replikation angefangen hat, werden die Ursprungssequenzen von ORG wieder gebunden, um weitere Replikationsrunden zu vermeiden.

3.2 Primase

Neue DNA kann nicht ohne das Vorhandensein eines Primers synthetisiert werden. Ein RNA-Primer (aus ungefähr 5 Nucleotiden) wird von der Primase synthetisiert und ermöglicht den Start der DNA-Synthese. Die Primase ist eine RNA-Polymerase, die an der DNA-Replikation beteiligt ist.

In *E. coli* ist die Primase vom DnaG-Gen codiert, und ist Bestandteil eines „Primosoms“.

In Eukaryoten assoziiert die Primase mit DNA-Polymerase- α .

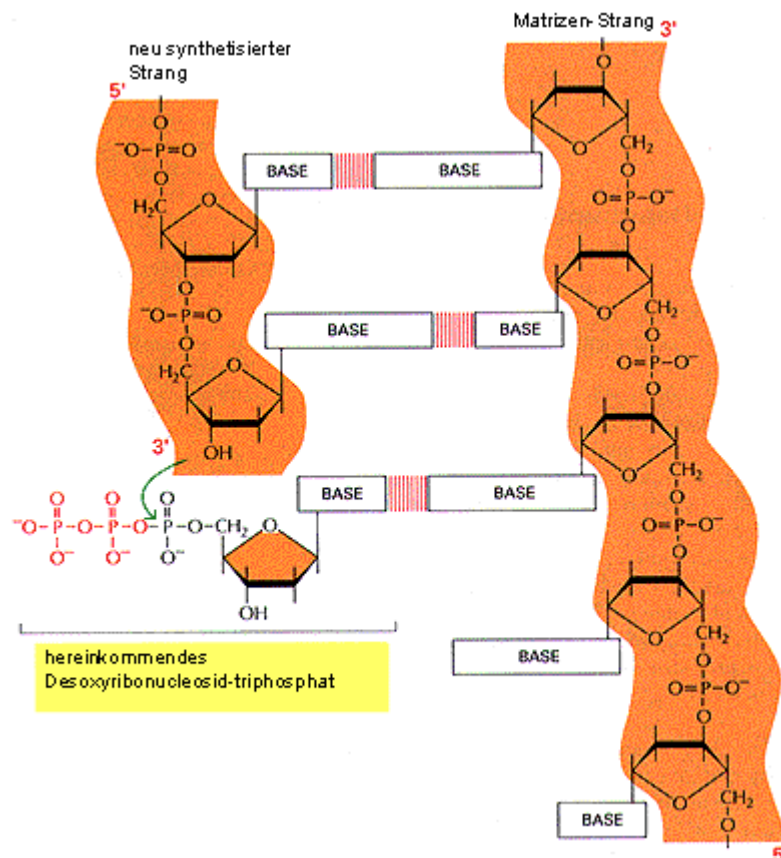


3.3 DNA-Polymerasen

Die DNA-Polymerase ist das Enzym, welches die schrittweise Addition von Desoxyribonucleotid-Einheiten an den wachsenden DNA-Strang katalysiert. Das Prinzip dieser Addition besteht im nucleophilen Angriff der 3'-OH-Gruppe des wachsenden Strangs auf das innerste (α) Phosphoratom des neuen Desoxyribonucleosid-triphosphats.

Demnach ist die Verlängerung der DNA-Kette nur in 5'—>3'-Richtung möglich. Die DNA-Polymerase braucht folgende Komponenten, um eine DNA-Kette zu synthetisieren:

- Sämtliche vier Desoxyribonucleosid-triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; abgekürzt mit dNTP). Die Hydrolyse des Pyrophosphats (PP_i) ist die treibende Kraft der Synthese.
- Mg²⁺.
- Primer (Startermolekül), d.h. eine freie 3'-OH-Gruppe eines bereits vorhandenen DNA- (oder RNA-) Strangs.
- DNA-Matrize.

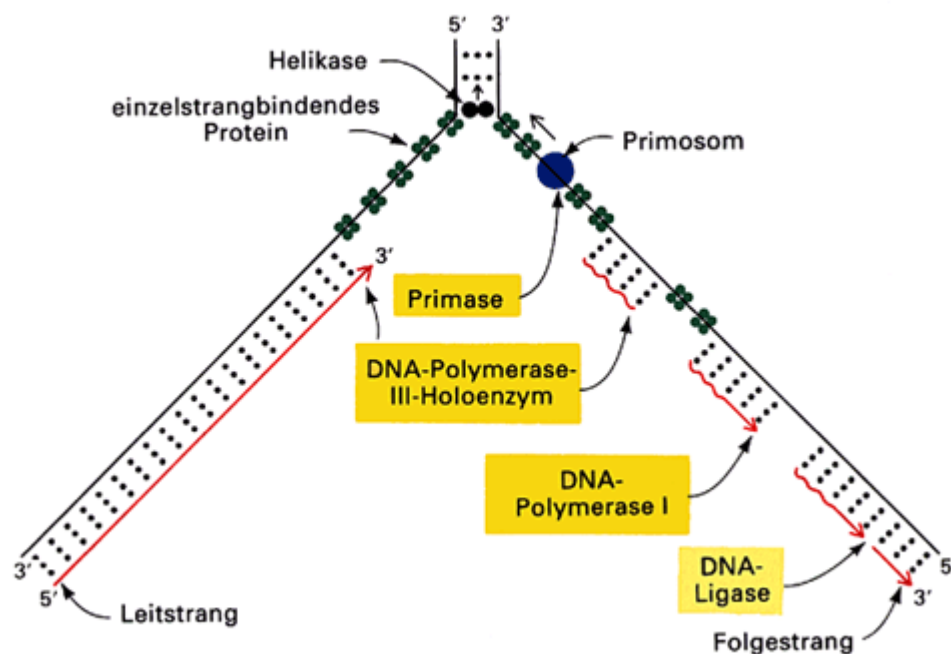


In unserem Prototyp-Organismus, *Escherichia coli*, sind 5 DNA-Polymerasen identifiziert worden: Pol I - V. Pol I ist vorwiegend an der Folgestrang-Reparatur und bei der DNA-Reparatur beteiligt. Die Rolle der Pol II liegt höchstwahrscheinlich auch bei der DNA-Reparatur. Pol III, die als ein Holoenzym vorkommt, das aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist, ist für die Replikation des bakteriellen Genoms verantwortlich. Die Pol IV und Pol V Enzyme sind bei der SOS-Antwort, bzw. beim Überqueren von DNA-Schäden ("By-pass"), notwendig (siehe Kapitel 4).

Ausser dem Pol-III Holoenzym erfordert die DNA-Replikation in *E. coli* auch das Einzelstrangbindungsprotein Ssb (Single Strand Binding protein), das die einzelsträngige DNA stabilisiert, und die DnaB-Helikase, die die DNA entwindet.

Nach heutigem Wissen sind mindestens 15 Proteine direkt an der bakteriellen DNA-Replikation beteiligt. Man nimmt an, dass die Komplexität des Replikationsapparates notwendig ist, um u.a. die sehr hohe Wiedergabetreue zu gewährleisten. Die Fehlerquote beträgt etwa 1 pro 10^9 bis 10^{10} kopierter Basenpaare.

In Eukaryoten sind bis anhin zwölf DNA-Polymerasen entdeckt worden: Pol α , Pol δ und Pol ϵ sind an der DNA-Replikation beteiligt, Pol β sorgt für die Basenexzisionsreparatur (siehe 4.2), Poly repliziert das mitochondriale Genom, und die Polymerasen ζ , η , θ , ι , κ und λ überqueren DNA-Schäden als sogenannte By-pass-Polymerasen (siehe 4.6). Pol μ spielt höchstwahrscheinlich bei der VDJ-Rekombination und der "Class-Switch-Rekombination" von Immunoglobulin-Genen eine Hauptrolle (siehe 6.3c).



3.4 Leitstrang-Synthese

In *E. coli* wird der Leitstrang kontinuierlich von Pol III synthetisiert. Die Prozessivität der Pol III wird von der ringförmigen β -Untereinheit garantiert. Die β -Untereinheit, auch „gleitende Klammer“ genannt, ist ein Homodimer (gelb und rot), das die DNA-Matrize (blau) umschließt. Das Aufladen der „gleitenden Klammer“ auf die DNA wird von der γ -Untereinheit („Clamp Loader“) ausgeführt; diese Reaktion geschieht unter ATP-Verbrauch.

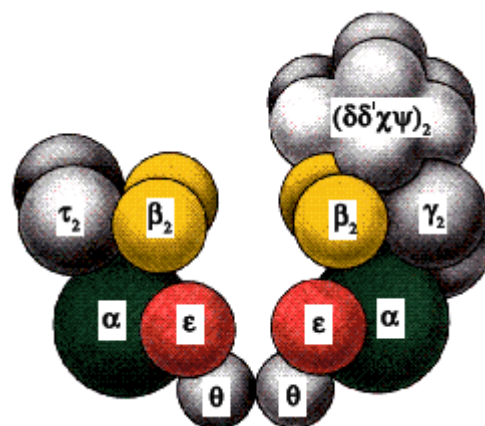


Bild: Pol III Holoenzym

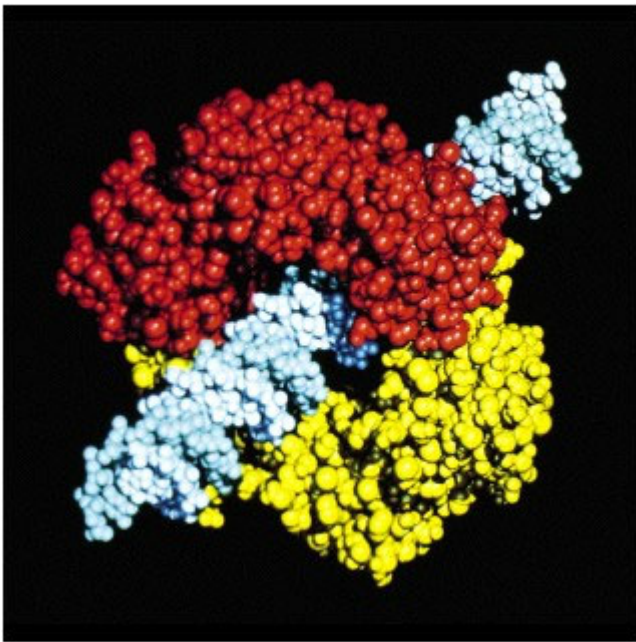


Bild: β -Untereinheit der Polymerase III

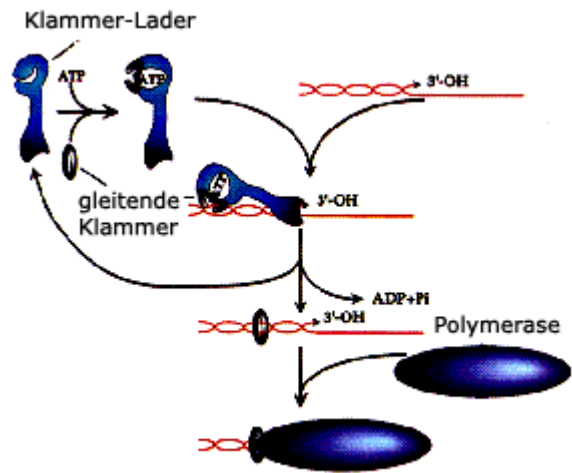


Bild: γ -Untereinheit („Clamp Loader“)

In Eukaryoten wird die Leitstrang-Synthese von Polymerase- δ katalysiert. Die „gleitende Klammer“-Funktion wird von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), einem Homotrimer, erfüllt. RFC (Replication Factor C) ist der „Klammer-Lader“.

Die Rolle des Ssb wird in Eukaryoten von RPA (Replication Protein A) erfüllt. In menschlichen Zellen wird die Rolle der replikations-assoziierten DNA-Helikase höchstwahrscheinlich vom MCM2-7-Komplex erfüllt. Bei der SV40-Replikation wird diese Aufgabe vom „Large T antigen“ übernommen (siehe Bild unten).

(a) SV40 DNA Replikationsgabel

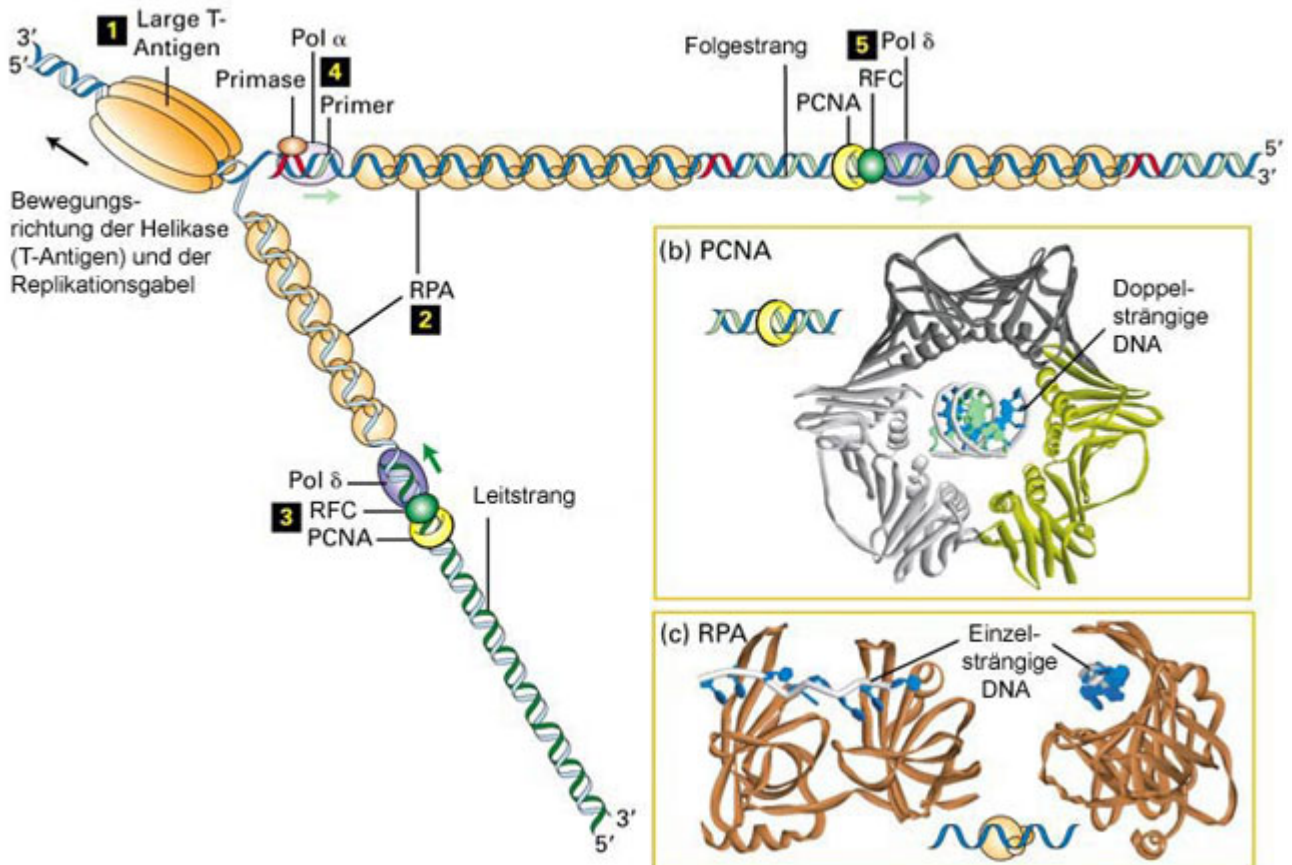
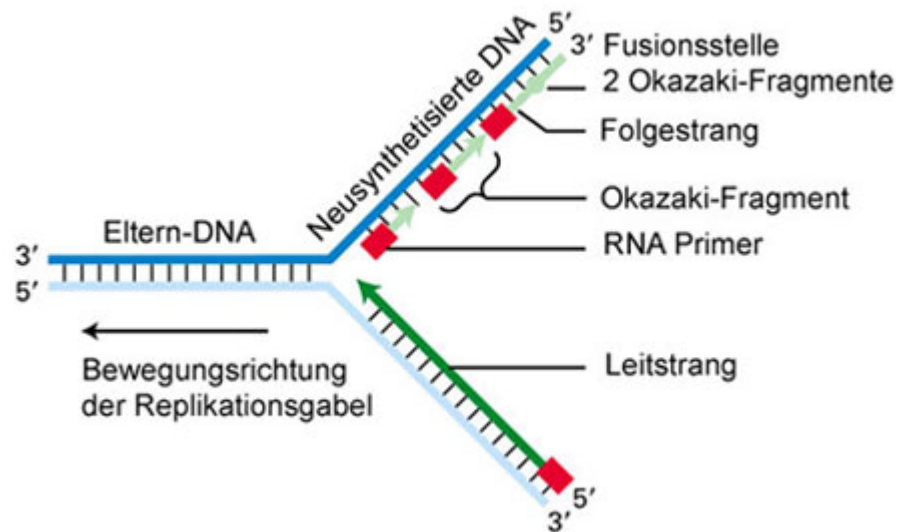


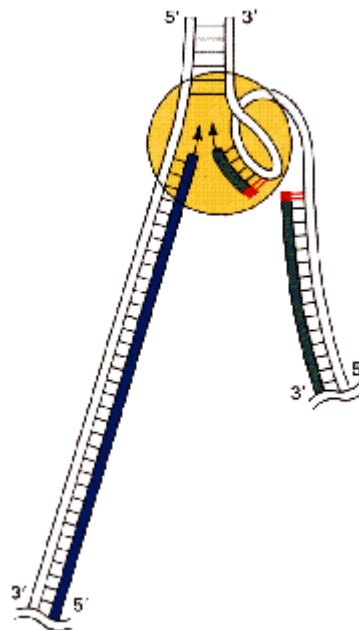
Bild: Replikation der SV40-DNA

3.5 Folgestrang-Synthese

Der Folgestrang, welcher scheinbar von der Replikationsgabel wegwächst, wird stückweise aufgebaut. Diese sogenannten Okazaki-Stücke besitzen jeweils einen RNA-Primer, der von der Primase (resp. Primase/Pol- α Komplex in Eukaryoten) synthetisiert wird und dann von Pol III (resp. von Pol- δ/ϵ) verlängert wird.

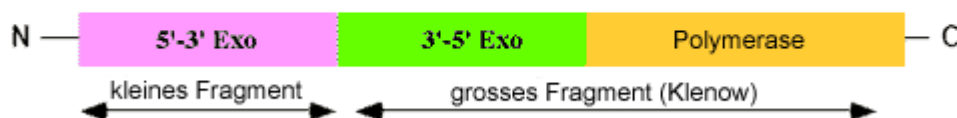


Die Bildung einer Schleife ermöglicht das Wachstum des Folgestrangs in 3' \rightarrow 5'-Richtung, obwohl das Anhängen der einzelnen Nucleotide in 5' \rightarrow 3'-Richtung erfolgt.

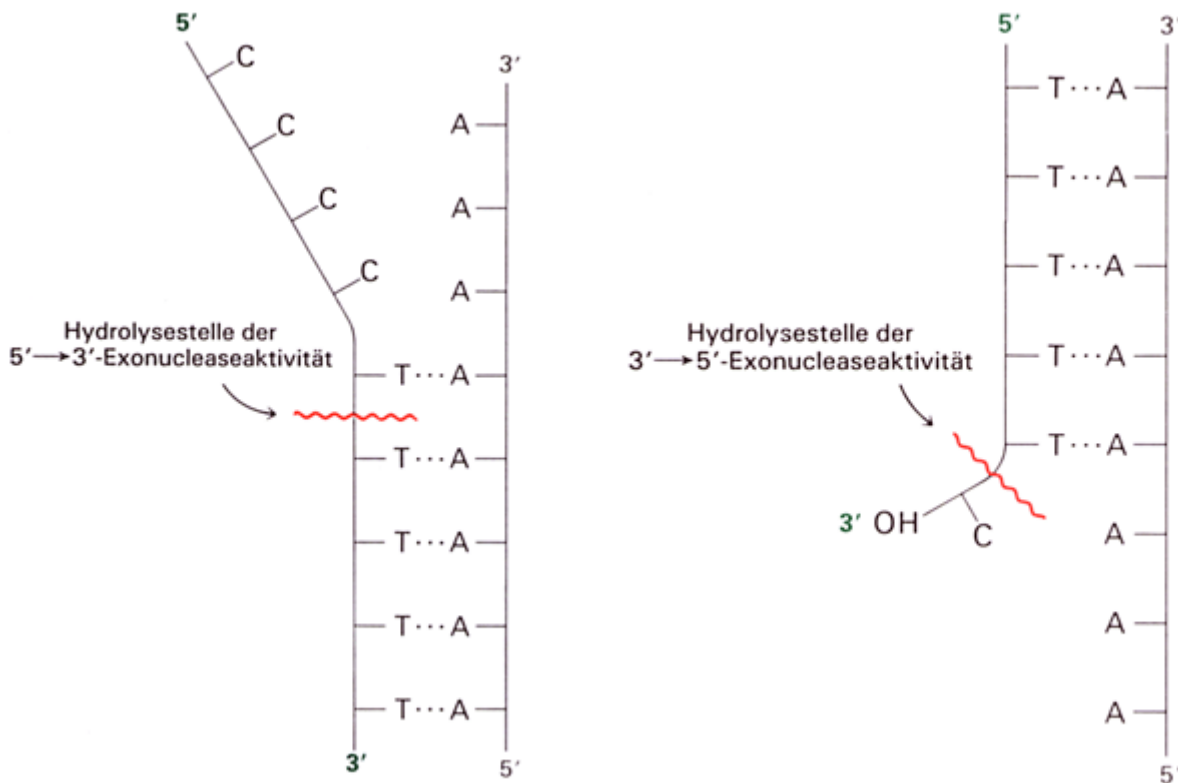


3.6 DNA-Polymerase I

Die DNA Polymerase I besitzt drei enzymatische Aktivitäten in einer einzigen Polypeptidkette

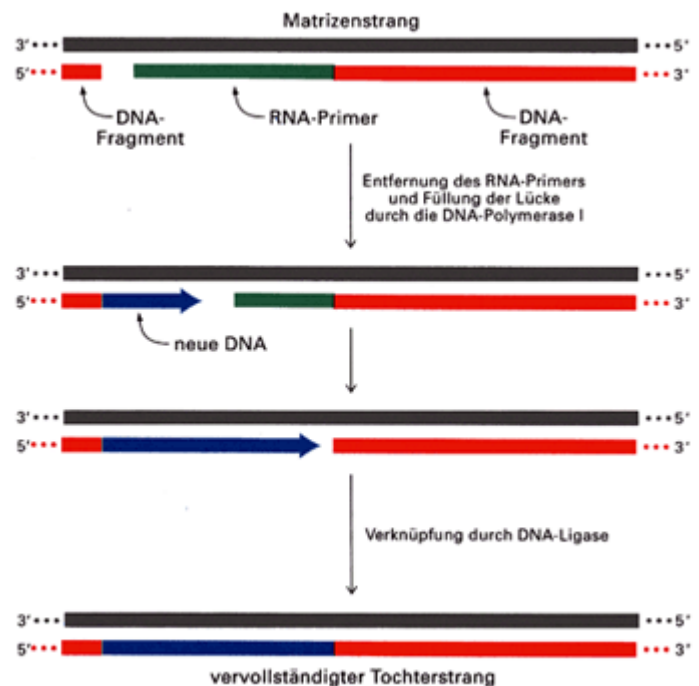
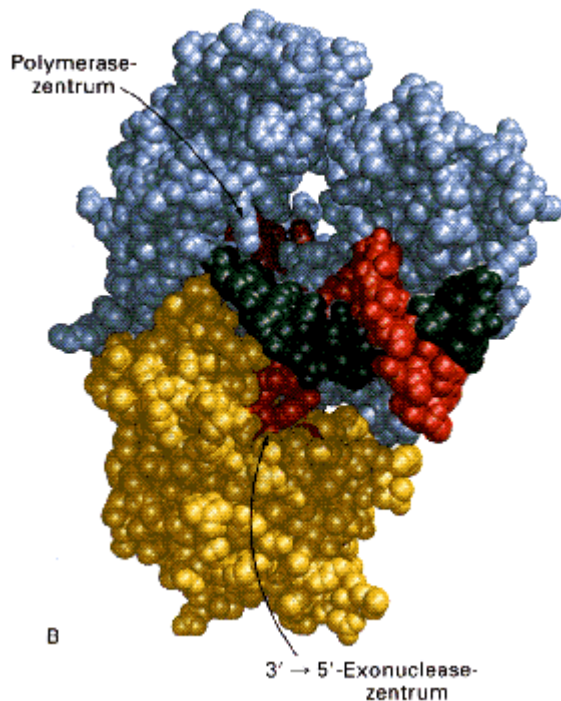


Die DNA-Polymerase I-Aktivität füllt die Lücken zwischen benachbarten Okazaki-Stücken auf.



Die 5'-3'-Exonuclease wird beim Abbau der RNA-Primer der Okazaki-Stücke gebraucht.

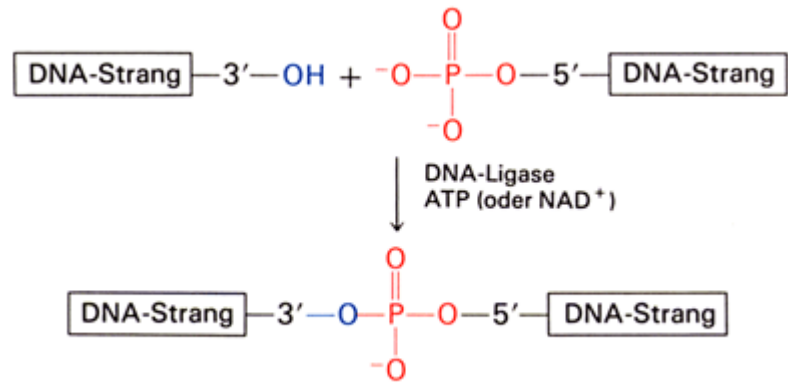
Die 3'-5'-Exonuclease wird beim Korrekturlesen („proofreading“) gebraucht.



In Eukaryoten ist die 5'→3'-Exonuclease Funktion von Pol I durch die "Flap Endonuclease 1" (FEN1) ersetzt. Das Korrekturlesen ist von der 3'→5'-Exonuclease Untereinheit der Pol-δ/ε katalysiert.

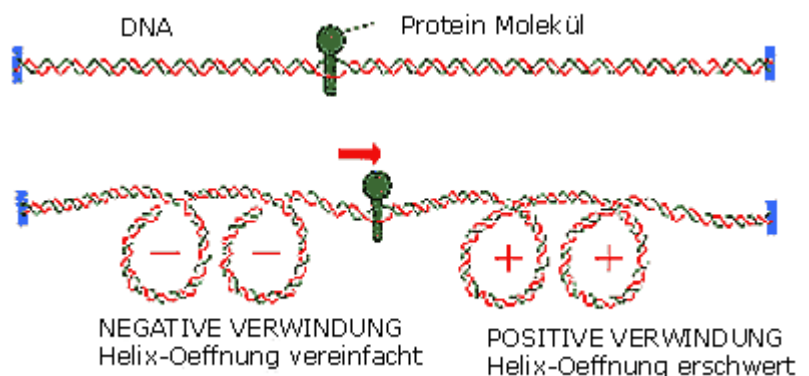
3.7 DNA-Ligase

Die DNA-Ligase verknüpft DNA-Enden in Doppelhelixregionen. Das Enzym katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende des einen DNA-Fragments und der 5'-Phosphatgruppe am Ende des anderen Fragments.



3.8 Superspiralisierung

Die meisten natürlich vorkommenden DNA-Moleküle sind negativ superspiralisiert (untergewunden). Die negative Superspiralisierung bereitet die DNA auf Prozesse vor, die eine Trennung der beiden Stränge erfordern. Dazu gehören die Replikation, die Rekombination und die Transkription. Die Verwindungszahl der DNA ist aber ein dynamisches Phänomen. Prozesse, die Proteinbewegungen auf der DNA-Matrize erfordern, ändern kontinuierlich den Superspiralisierungsgrad vor und hinter sich.



Superspiralisiert



Entspannt



Wenn Lk die Verwindungszahl (linking number) der DNA ist, Tw (twisting number) der Zahl der Watson-Crick-Windungen entspricht und Wr die Anzahl der Superhelixwindungen bezeichnet, besteht die folgende Beziehung:

$$Lk = Tw + Wr$$

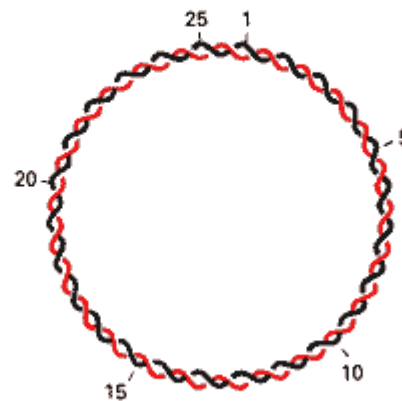
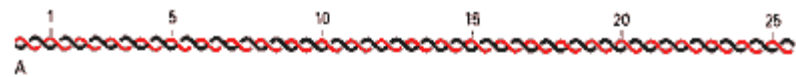
Das Ausmass der Superspiralisierung einer DNA kann durch die Superhelixdichte σ ausgedrückt werden:

$$\sigma = (Lk - Lk_0)/Lk_0$$

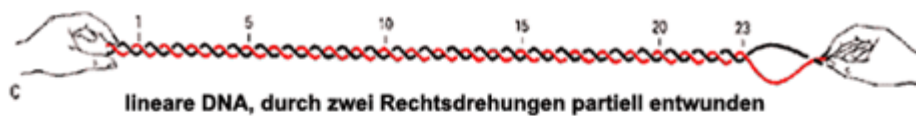
(Lk_0 entspricht der Verwindungszahl des entspannten zirkulären DNA-Moleküls.)

Beispiel: $(23 - 25)/25 = -2/25 = -0.08$

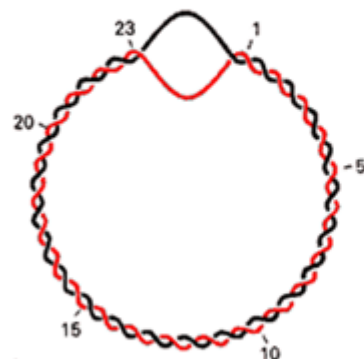
Die Superhelixdichte σ der *in vivo* superspiralierter DNA ist in der Regel -0.06



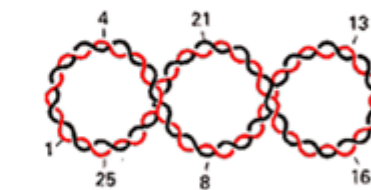
B $Lk = 25, Tw = 25, Wr = 0$
entspannte zirkuläre DNA



C lineare DNA, durch zwei Rechtsdrehungen partiell entwunden



D $Lk = 23, Tw \approx 23, Wr \approx 0$
partiell entwundene zirkuläre DNA



E $Lk = 23, Tw \approx 25, Wr \approx -2$
negative Superhelix rechtsgängig

3.9 Topoisomerasen

Die Überführung verschiedener Topoisomere (DNA-Moleküle mit unterschiedlicher Verwindungszahl) einer DNA ineinander wird durch Enzyme katalysiert, die man als Topoisomerasen bezeichnet. Diese Enzyme verändern die Verwindungszahl der DNA, indem sie einen dreistufigen Prozess katalysieren:

- 1) Spaltung eines oder beider DNA-Stränge.
- 2) Durchtritt eines DNA-Abschnitts durch die entstandene Lücke.
- 3) Verknüpfung der DNA-Bruchstelle.

Topoisomerase I

Die Typ-I-Topoisomerasen spalten nur einen DNA-Strang. Die Reaktion der Entspannung einer negativ-superspiralisierten DNA ist thermodynamisch gesehen mit Energiegewinn verbunden. Die Verwindungszahl der superspiralisierten DNA ändert sich bei jedem Katalysedurchgang um 1.

Die Topoisomerase I von *E. coli* relaxiert nur negativ-superhelikale DNA. Die menschliche Topoisomerase I (und Topoisomerase III) relaxieren sowohl negativ- als auch positiv-superspiralisierte DNA.

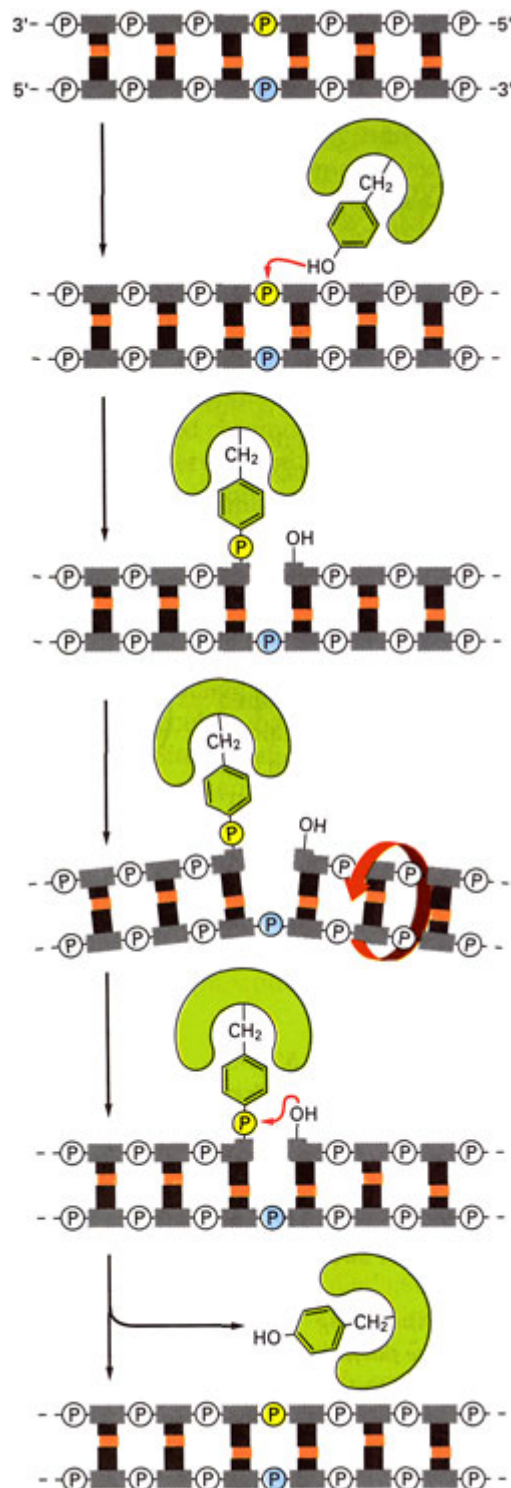


Bild: Das eine Ende der DNA-Doppelhelix kann gegenüber dem anderen Ende nicht rotieren

Typ I DNA-Topoisomerase mit Tyrosin in der aktiven Stelle

DNA-Topoisomerase bindet kovalent an ein DNA-Phosphat und öffnet dabei eine Phosphodiesterbindung in diesem Strang

Die beiden Enden der DNA-Doppelhelix können nun relativ zueinander rotieren

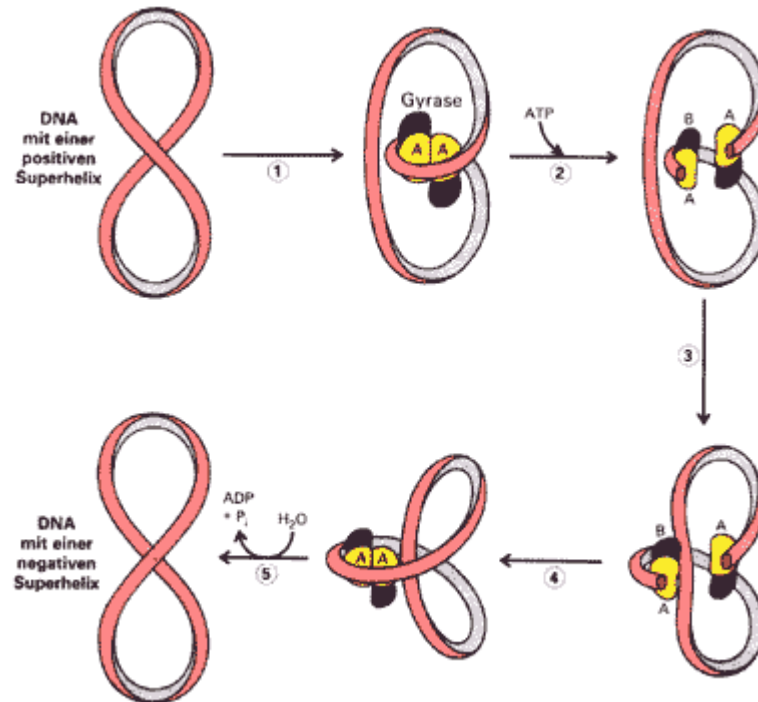
Die ursprüngliche Bindungs-Energie des Phosphodiesters wird in der Phospho-Tyrosinbindung gespeichert - Reversibilität

Spontane Wiederbildung der Phosphodiesterbindung regeneriert sowohl die DNA-Helix als auch die Topoisomerase in unveränderter Form

Topoisomerase II

Enzyme des Typs II spalten beide Stränge. Sie relaxieren sowohl negativ- als auch positiv-superspiralisierte DNA. Die Topoisomerase II von *E. coli* (DNA-Gyrase) führt dazu negative Superhelices in die DNA ein. In Eukaryoten ist dies nicht notwendig, da die DNA durch die Verpackung ins Chromatin automatisch negativ-superspiralisiert wird (siehe Kapitel 3.11).

Die DNA-Topoisomerase II wandelt die freie Energie des ATP in die Torsionsenergie von Superhelices um. Die Verwindungszahl der DNA wird bei jeder Reaktion um 2 geändert.



Hemmstoffe der Topoisomerasen

Die DNA-Gyrase (bakterielle Topo-II) ist Angriffspunkt verschiedener Antibiotika, die das prokaryotische Enzym viel stärker hemmen als das eukaryotische.

Novobiocin blockiert die Bindung des ATP an die Gyrase.

Nalidixinsäure und *Ciprofloxacin*, die häufig zur Behandlung von Harnweg- und anderen Infektionen eingesetzt werden, beeinträchtigen dagegen die Spaltung und Wiederverknüpfung von DNA-Ketten.

Eukaryotische Topoisomerasen sind Angriffspunkte der modernen Krebstherapie; *Camptothecin* (Topo-I Inhibitor) und *Etoposid* (Topo-II Inhibitor) hemmen die Proliferation der schnell-replizierenden Krebszellen.

3.10 Telomerasen

Telomere, die Enden der Chromosomen, werden von einer Reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) repliziert, die eine RNA-Matrize enthält. Die Telomerase synthetisiert Tandemwiederholungen von G-reichen Hexanucleotiden (AGGGTT in menschlicher DNA), um die Synthese des Folgestrangs zu vollenden.

Weil somatische Zellen keine oder nur wenig Telomeraseaktivität haben, wird die Telomerlänge mit jeder Zellteilung kürzer. Daraus ist die Hypothese entstanden, dass die Telomeraseaktivität die Geschwindigkeit des Alterungsprozesses festlegt. Krebszellen zeigen eine erhöhte Telomeraseaktivität und haben die Tendenz "immortal" zu werden. Die Telomerase könnte deswegen ein Ziel der Tumorthherapie werden.

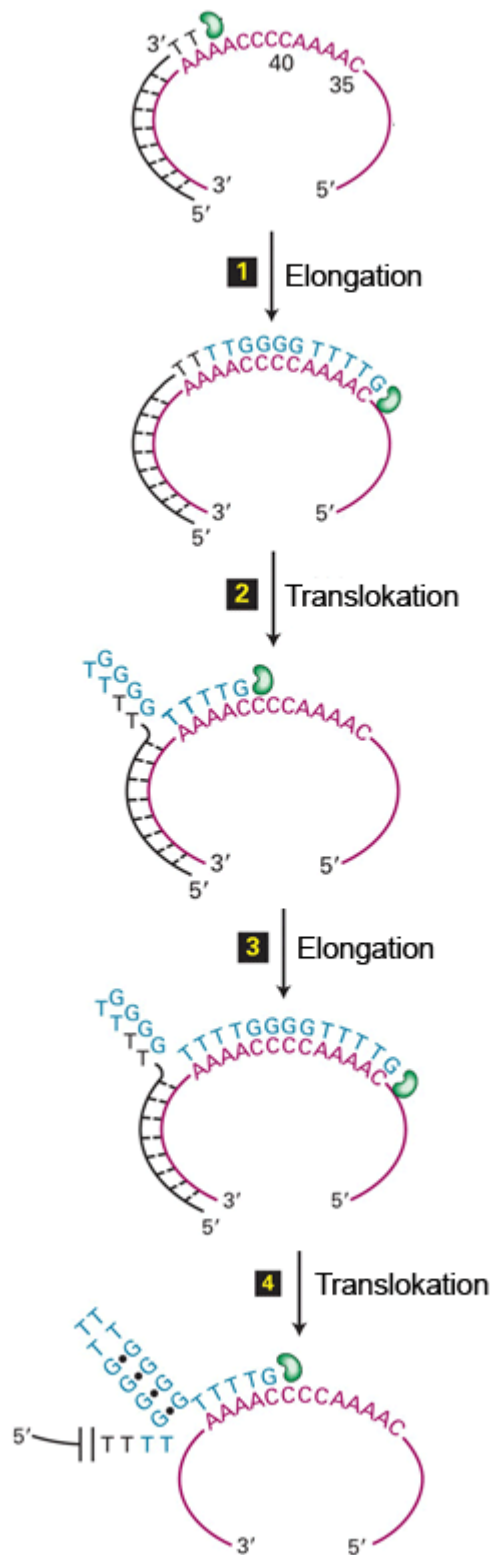


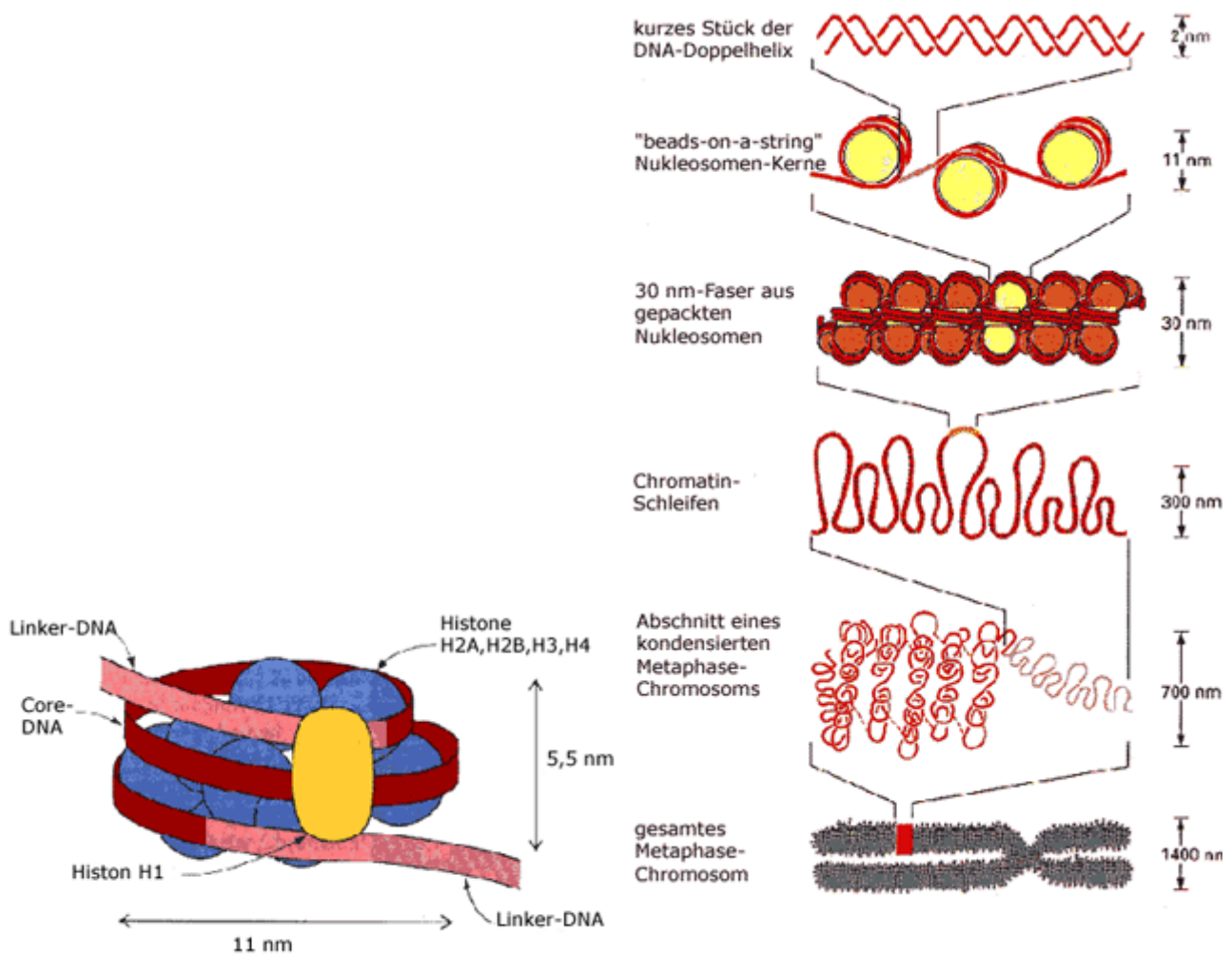
Bild: Synthese des G-reichen Stranges der Telomer-DNA. Die RNA-Matrize der Telomerase ist rot, die an den G-reichen Strang des Primers angehängten Nucleotide sind blau dargestellt.

3.11 Organisation des Eukaryotischen-Genoms

Die DNA bildet mit den basischen Histonen geordnete Strukturen, die Nucleosomen. Ein Nucleosom Core besteht aus etwa 146 Basenpaaren, die um je zwei H2A, H2B, H3 und H4 Histonmoleküle gewunden sind, so dass $1\frac{3}{4}$ Windungen einer linksgängigen Superhelix entstehen. Einzelne Nucleosomen sind über kurze DNA-Abschnitte perschnurartig miteinander verbunden. Die einzelnen Chromatinfäden liegen in den 46 Chromosomen in stark kondensierter Form vor: Totale Länge der DNA = 2 m, totale Länge aller 46 Chromosomen (in Metaphase) = 200 μm . Chromatinkondensierung ist auch abhängig vom DNA-Methylierungszustand und der Histonmodifikation (Acetylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung, Phosphorylierung). Nucleosomen, die H1 enthalten, besitzen ungefähr 166 Basenpaare DNA. H1 wird unmittelbar vor der Mitose phosphoryliert und nach der Mitose wieder dephosphoryliert, was vermuten lässt, dass diese kovalente Modifikation dessen Fähigkeit steuert, die DNA zu verdichten.

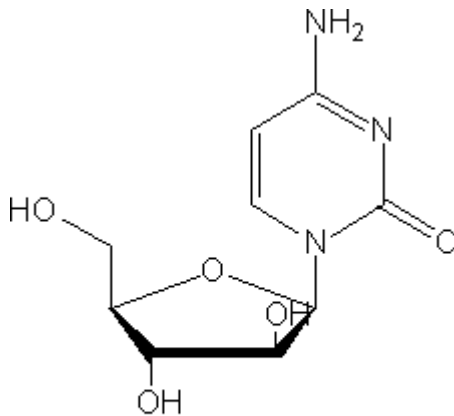
Acetylierung an Lysinresten von Histonen (z. B. H4) kann deren Affinität für DNA beeinflussen. Das Zusammenspiel von Histon-Acetylasen, -Deacetylasen und Histon-Kinasen ist insgesamt für die Dichte der Chromatinverpackung verantwortlich. Die am stärksten komprimierte DNA findet man in Spermienköpfen, wo die Histone durch Protamine ersetzt sind. Die Protamine sind argininreiche Proteine, welche durch Bindung an die DNA hochgradig α -helikal werden.

Menschliche DNA enthält pro diploide Zelle ca. 6.6×10^9 Basenpaare. Dies würde für ca. 3×10^6 Gene reichen. Tatsächlich rechnet man aber nur mit ca. 35'000 Genen, was theoretisch eine viel kürzere DNA zur Folge hätte. Das Vorhandensein von stark repetitiver DNA und Introns (nicht-kodierende DNA-Abschnitte zwischen den Exons) gleicht jedoch diese Diskrepanz aus und ist für die wahre Länge der menschlichen DNA verantwortlich.



3.12 Hemmstoffe der Replikation

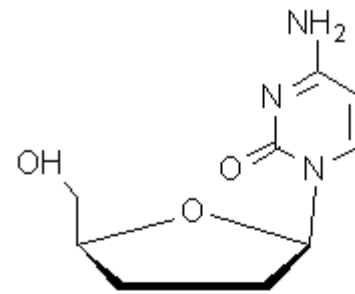
Hemmstoffe der Replikation können als Cytostatika zur Krebsbekämpfung eingesetzt werden (Cytosin-Arabinosid).



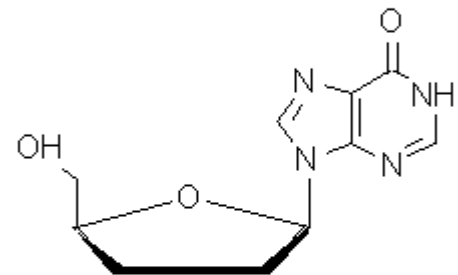
araC

Die Wirksamkeit von Acyclovir bei Herpes *simplex* Infektionen ist dadurch gegeben, dass diese Substanz erst durch die virale Thymidin-Kinase phosphoryliert wird. Acyclovirtriphosphat ist nur Substrat für die virale, nicht aber für die menschliche DNA-Polymerase. Deswegen wird es ausschliesslich in die virale DNA eingebaut, wo es zur Kettenverlängerungstermination der DNA-Synthese führt, da ACV keine freie 3'-OH-Gruppe besitzt.

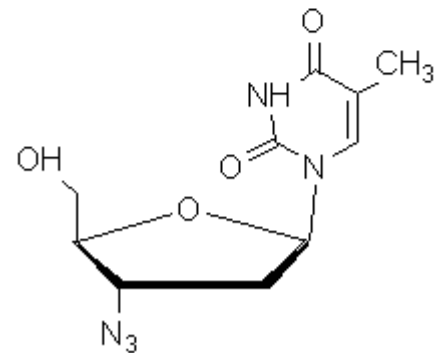
ddC, ddI und AZT sind Hemmer der Reversen Transkriptase des HIV-Virus. Diese Substanzen werden von Enzymen der Wirtszelle in Triphosphate umgewandelt, werden aber von Polymerase α , δ und ϵ nicht als Substrate erkannt. Ihre Nebenwirkungen sind mit dem Einbau in die DNA durch Polymerase β , die in der Basenexzisionsreparatur tätig ist, verbunden.



ddC

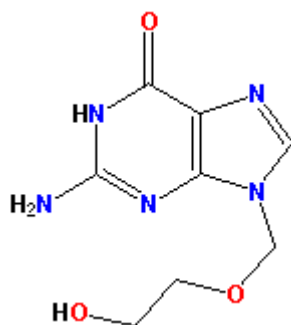


ddI



AZT

ACYCLOVIR



3.13 Der Zellzyklus

Voraussetzung für jede Zellteilung (Mitose) ist die Replikation der DNA, um identische Kopien für jede Tochterzelle bereitzustellen. Die Replikation erfolgt in der synthetischen oder S-Phase während der Interphase (zwischen zwei Mitosen). Ein ganzer Zellzyklus (G_1 - S - G_2 - M) dauert bei sich kontinuierlich teilenden Zellen (z.B. Darmmucosa, Hautepithel, Erythrozyten-Vorstufe) ca. 16 - 20 Std. Andere Zellarten teilen sich nur auf ein Signal hin (z.B. Lymphozyten), selten (Leber- und Nierenzellen) oder sozusagen nie (Nerven- und Muskelzellen). In diesen Fällen ist die G_1 -Phase von ca. 5 Std. auf Tage oder Wochen verlängert. Eine derart lange G_1 -Phase wird auch als G_0 bezeichnet. S-, G_2 - und M-Phase dauern ca. 7, 3 und 2 Std.

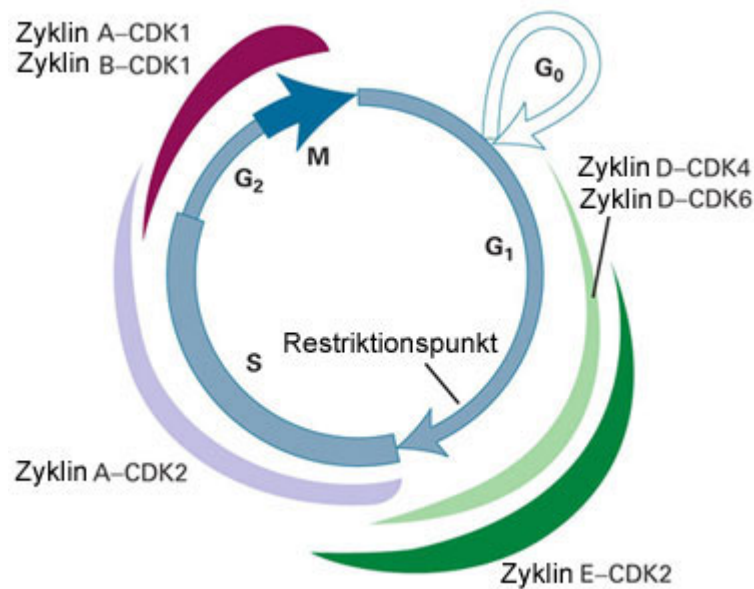


Bild: Zellzyklus der Eukaryoten. M (Mitose); S (DNA-Synthese); G_1 (gap1; Lücke) und G_2 (gap2)

Der Eintritt in die Mitose wird von einer Protein-Kinase (CDK2-Kinase; *cdc2* in Hefe) kontrolliert. Sie wird durch Cyclin B aktiviert, ein im Zellzyklus synthetisiertes und abgebautes Protein. Die katalytische Aktivität der *cdc2*-Kinase hängt auch von ihrem Phosphorylierungszustand ab, der durch Signale von Wachstumsfaktoren kontrolliert wird.

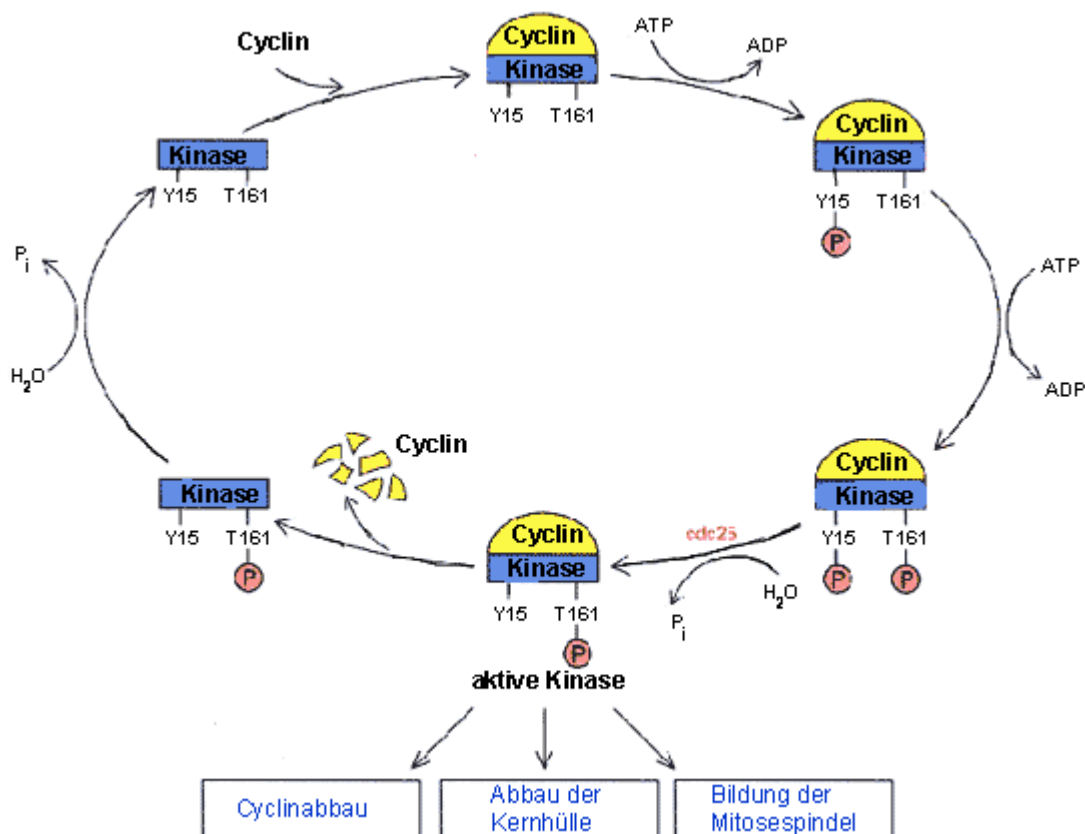


Bild: Cyclin B (gelb), das während der Interphase gebildet wird, formt mit der *cdc2*-Kinase (blau) einen inaktiven reifungsfördernden Faktor (MPF). Aufgrund der Phosphorylierung an Tyr 15 (hemmende Stelle) und danach Thr 161 (stimulierende Stelle) bleibt MPF inaktiv. Die Kinaseaktivität wird angeschaltet, sobald Cdc25, eine Phosphatase, die Phosphorylgruppe vom Tyr 15 entfernt. Der aktivierte MPF phosphoryliert dann seinerseits viele Zielproteine und initiiert damit die Mitose. Der ebenfalls durch die Kinase ausgelöste Abbau von Cyclin beendet die enzymatische Aktivität des Komplexes wieder.

Lernziele

- Konzept der semikonservativen DNA-Synthese grundsätzlich verstehen
- Notwendigkeit des Primers kennen
- Kriterien der DNA-Synthese kennen (Matrize, Primer, dNTPs, Mg⁺⁺, Richtung der Synthese)
- Rolle von Pol I und Pol III in der DNA-Replikation von *E. coli* kennen
- Rolle der 5' → 3'- und 3' → 5'-Exonucleasen verstehen (Beispiel: Pol I von *E. coli*)
- Rolle von Pol α und Pol δ(ε) in der eukaryotischen DNA-Synthese kennen
- Unterschied zwischen Leitstrang- und Folgestrang-Synthese kennen
- Konzept der Prozessivität verstehen (*E. coli*: β-Untereinheit der Pol III, Eukaryoten: PCNA)
- Funktion der DNA-Ligase kennen
- Konzept der Superspiralisierung verstehen
- Topoisomerasen: Klassen kennen und Mechanismen verstehen
- Telomerase: Funktion, enzymatische Aktivitäten und Matrize kennen
- Chromatin-Bestandteile kennen
- Unterschied zwischen Euchromatin und Heterochromatin kennen (Rolle der posttranskriptionellen Modifikation von DNA und Histonen)
- Hemmstoffe der DNA-Synthese
- Zellzyklus: alle Phasen kennen, Rolle der verschiedenen Zykline und deren Phosphorylierung während des Zyklus verstehen