

Struktur und Replikation der DNA

Die Speicherung der genetischen Information in Form von DNA ist das vielleicht wichtigste Merkmal aller heutigen Lebensformen. Die DNA-Replikation als Grundlage für die Weitergabe der genetischen Information bei der Zellteilung ist im Prinzip verblüffend einfach: Die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix trennen sich reißverschlussartig und dienen als Matrize für die Synthese neuer Komplementärstränge. Nichtsdestoweniger sind schematische Abbildungen der Replikationsgabel oft erschreckend kompliziert. Viele Details werden verständlich, wenn man sich konsequent vor Augen führt, dass DNA-Synthese ausschließlich in 5'→3'-Richtung („fünf-Strich-drei-Strich-Richtung“) erfolgt. Auf diese Weise ist sogar das Posaunen-Modell nachvollziehbar.

Die Struktur der Nucleinsäuren (RNA und DNA)	2
<u>Nucleinsäuren: DNA und RNA</u>	2
<u>Struktur der RNA</u>	2
<u>Struktur der DNA</u>	3
<u>Nomenklatur der RNA- und DNA-Bestandteile</u>	5
Exkurs: Gründe für die hohe Stabilität der DNA	7
Grundprinzipien der DNA-Replikation	8
<u>Der prinzipielle Mechanismus der DNA-Replikation</u>	8
<u>Reaktionsmechanismus der DNA-Synthese</u>	9
<u>Genomorganisation bei Pro- und Eukaryonten</u>	10
<u>DNA-Replikation bei Pro- und Eukaryonten</u>	10
<u>DNA-Polymerasen</u>	12
Die DNA-Replikation im Detail	13
<u>Entstehung des Leit- und des Folgestrangs</u>	13
<u>Primerbeseitigung, Auffüllen der Lücken und Verknüpfung der DNA-Fragmente</u> .	14
<u>Posaunen-Modell der DNA-Replikation</u>	16
<u>Verhinderung der Verkürzung der Chromosomen der Eukaryonten</u>	18
Die Superspiralisierung der DNA	21
<u>Modellversuch mit einem Gummiring</u>	21
<u>Superspiralisierung ringförmiger und linearer DNA-Moleküle</u>	22
<u>Positive und negative Superspiralisierung</u>	23
<u>Topoisomerasen</u>	24

Die Struktur der Nucleinsäuren (RNA und DNA)

Nucleinsäuren: DNA und RNA

Desoxyribonucleinsäure (DNS oder üblicher **DNA** für englisch *deoxyribonucleic acid*) dient bei allen heute lebenden Organismen als **dauerhafter Speicher** der genetischen Information. **Ribonucleinsäure** (RNS oder üblicher **RNA** für englisch *ribonucleic acid*) tritt als **kurzlebiger Zwischenspeicher** beim Ablesen der genetischen Information in Form der sog. Boten-RNA (mRNA für englisch *messenger RNA*) auf. Zusätzlich existieren weitere Typen von RNA mit anderen Funktionen. DNA und RNA werden zusammenfassend als **Nucleinsäuren** bezeichnet.

Struktur der RNA

Man geht davon aus, dass in der Evolution RNA früher entstanden ist als DNA und in der Anfangszeit als alleiniger genetischer Speicher diente. Erst später ist DNA aufgetreten, die den Vorteil einer höheren Stabilität bietet, die aber durch eine kompliziertere Biosynthese der Einzelbausteine erkauft wird. Da RNA evolutionär und strukturell ein Vorläufermolekül von DNA ist, soll erst die Struktur der RNA betrachtet werden.

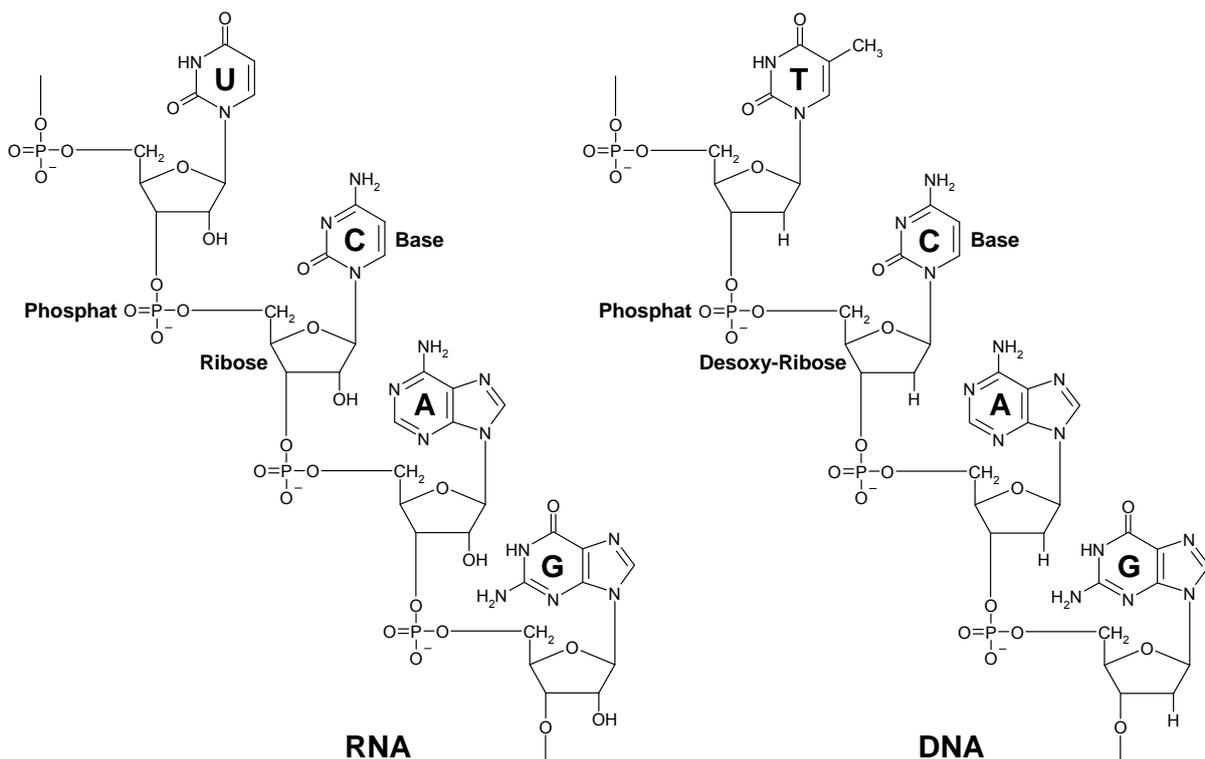
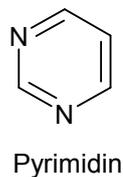
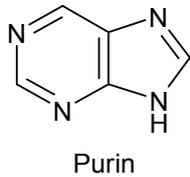


Abb. 1. Struktur der RNA und DNA. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus einem Einzelstrang.

RNA ist ein langes kettenartiges Molekül, das aus sich abwechselnden **Ribose-** und **Phosphat-**Einheiten besteht (**Abb. 1**). Jede der Ribose-Einheiten trägt eine der **Nucleobasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C)** oder **Uracil (U)**. Ribose ist ein Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen (eine Pentose), der als Bestandteil biochemisch relevanter Verbindungen

typischerweise als fünfgliedrige Ringstruktur vorliegt. Bei den Nucleobasen (auch bezeichnet als Nucleinbasen oder im entsprechenden Zusammenhang einfach nur „die **Basen**“) handelt es sich um ringförmige stickstoffhaltige Moleküle, die sich formal vom **Purin** (A und G) oder vom **Pyrimidin** (C und U) ableiten.



RNA ist also aus Grundeinheiten aufgebaut, die aus Ribose, Phosphat und einer Base bestehen. Eine derartige Grundeinheit wird als **Nucleosidmonophosphat** oder **Nucleotid** bezeichnet (für Details zur Nomenklatur siehe unten). Zur Beschreibung dieser Moleküle werden die einzelnen Positionen in den Ringsystemen der Basen und die einzelnen Kohlenstoffatome der Ribose nach einem willkürlich festgelegten System nummeriert (**Abb. 2**). Den Nummern für die Kohlenstoffatome der Ribose wird ein Strich (') zugefügt, um eine Unterscheidung von den den Basen zugehörigen Nummern zu ermöglichen. Für die meisten Fragestellungen ist eine Betrachtung der einzelnen Positionen der Basen unerheblich. Daher treten in der Literatur meist nur die mit dem Strich gekennzeichneten Positionsbezeichnungen der Ribose auf.

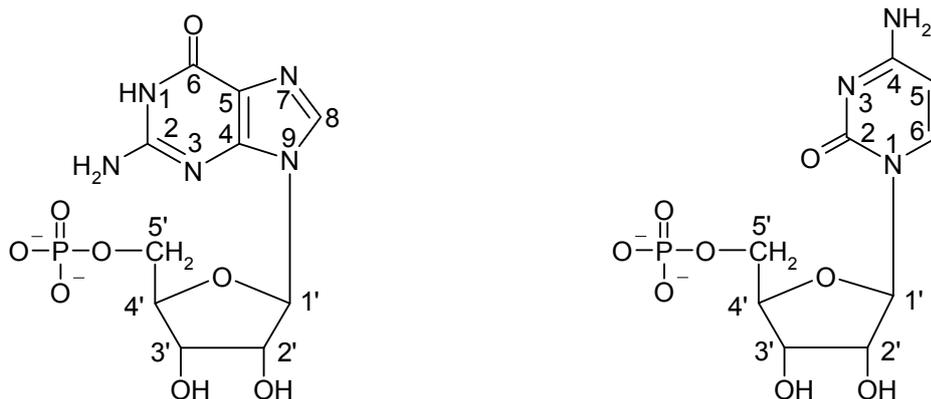


Abb. 2. Nummerierung der Positionen der Nucleosidmonophosphate am Beispiel des Guanosinmonophosphats (links) und des Cytidinmonophosphats (rechts).

Struktur der DNA

DNA unterscheidet sich von RNA durch zwei wesentliche Strukturmerkmale. Erstens besitzt die Zuckereinheit an der 2'-Position (sprich: „Zwei-Strich-Position“) einen Wasserstoff-Rest (-H) anstelle der Hydroxygruppe (-OH); formal fehlt also ein Sauerstoffatom, daher die Bezeichnung **Desoxyribonukleinsäure** (**Abb. 1**). Zweitens enthält DNA die Base **Thymin** anstelle von Uracil. DNA liegt typischerweise als rechtsgängige **Doppelhelix** vor, die aus zwei antiparallelen DNA-Einzelsträngen besteht (**Abb. 3**). Die Struktur der Doppelhelix ergibt sich aus der Paarung der komplementären Basen A und T sowie G und C durch Ausbildung von zwei bzw. drei **Wasserstoffbrückenbindungen**. Einzelsträngige DNA tritt nur kurzzeitig während der Verdopplung der DNA (siehe unten) oder beim Ablesen der genetischen Information (Transkription) auf. RNA liegt typischerweise einzelsträngig vor; in einigen Fällen falten sich aber einzelne RNA-Moleküle so, dass sich Teilabschnitte durch Basenpaarung aneinander lagern und so doppelsträngige Teilabschnitte bilden.

Die Desoxyribose-Phosphat-Ketten der beiden Einzelstränge (das **Zucker-Phosphat-Rückgrat** der DNA) liegen als bandartige Strukturen auf der Oberfläche der DNA-Doppelhelix. Dazwischen ergeben sich eine mehr und eine weniger ausgeprägte Vertiefung, die als **große Furche** bzw. **kleine Furche** bezeichnet werden. Im Bereich der Furchen sind Teilstrukturen der Basen nicht durch die Desoxyribose-Phosphat-Ketten verdeckt und können deshalb mit Molekülen im umgebenden Medium in Wechselwirkung treten. Über diesen Mechanismus sind spezielle Proteine in der Lage, DNA-Abschnitte mit bestimmten Basenabfolgen hochspezifisch zu erkennen, ohne dass die Einzelstränge getrennt werden. Ein Beispiel für derartige Proteine sind Restriktionsenzyme, die DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch schneiden. Ein weiteres Beispiel sind Transkriptionsfaktoren, die sich an definierte DNA-Abschnitte anlagern und dadurch die Häufigkeit beeinflussen, mit der bestimmte Gene abgelesen werden.

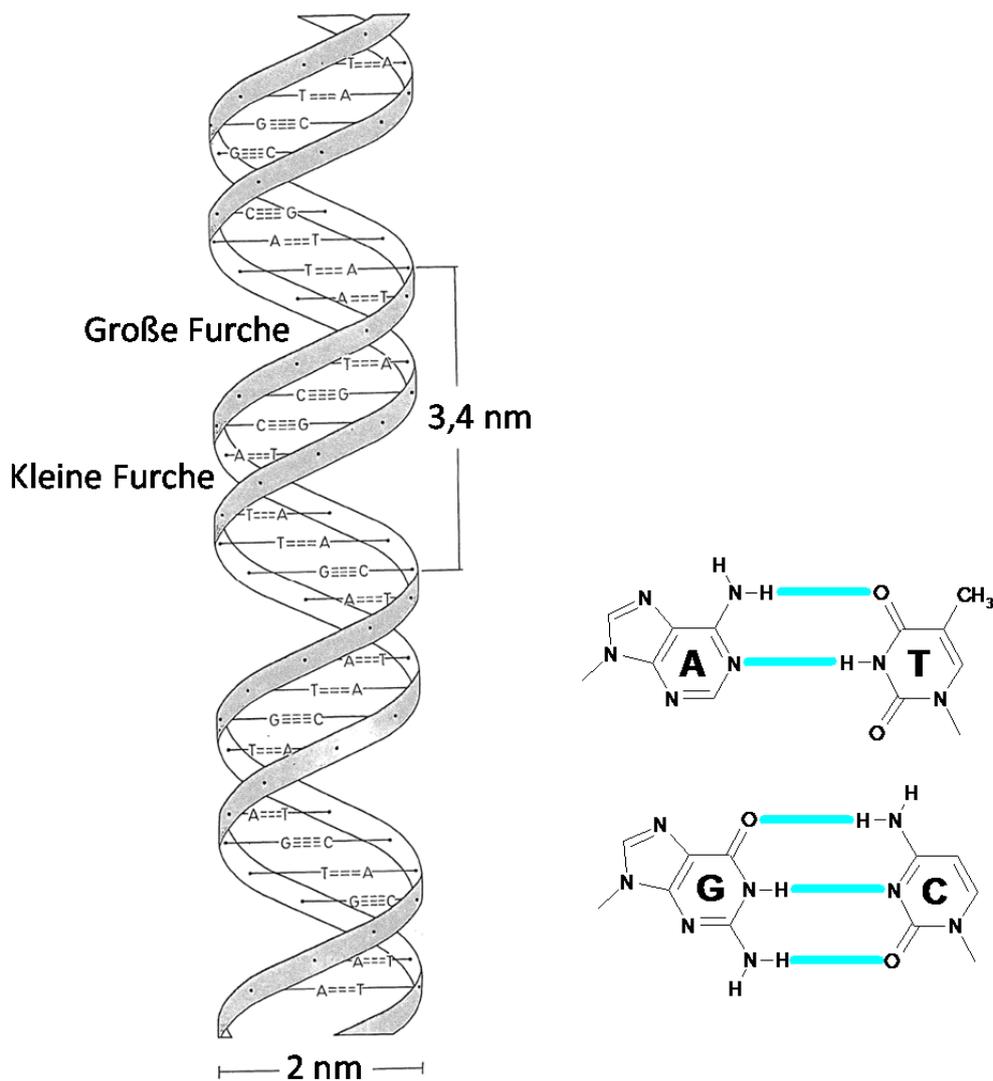


Abb. 3. Struktur der DNA-Doppelhelix. Die Bänder stellen das Zucker-Phosphat-Rückgrat dar. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien angedeutet (rechts Detaildarstellung der Wasserstoffbrückenbindungen). Ungefähre Größenangaben in Nanometern (nm). Nach Kössel, 1970.

Nomenklatur der RNA- und DNA-Bestandteile

Ein Molekül bestehend aus einer Ribose-Einheit und einer Nucleobase wird als **Nucleosid** bezeichnet (**Tabelle 1**). Die Nucleoside der einzelnen Basen werden mit Trivialnamen bezeichnet (z.B. Adenosin für das Nucleosid des Adenins).

Ein Nucleosid, das mit einer Phosphatgruppe oder mehreren Phosphatgruppen verbunden ist, bezeichnet man als **Nucleotid** [z.B. Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP)].

Die **Nucleosidmonophosphate** werden häufig mit auf „-ylat“ endenden Trivialnamen bezeichnet (z.B. Adenylat für Adenosinmonophosphat).

Tritt an die Stelle der Ribose eine Desoxyribose, spricht man von **Desoxynucleosiden** (z.B. Desoxyadenosin) bzw. **Desoxynucleotiden** [z.B. Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP)].

Thymin bildet natürlicherweise nur Desoxynucleoside und Desoxynucleotide. Daher werden häufig die Bezeichnungen Thymidin, Thymidylat sowie die Abkürzungen TMP, TDP und TTP synonym gebraucht für Desoxythymidin, Desoxythymidylat bzw. dTMP, dTDP und dTTP.

Die einzelnen Phosphatgruppen der Nucleosid- und Desoxynucleosidtriphosphate werden als **α -**, **β -** und **γ -Phosphat** bezeichnet. Dabei ist das **α -Phosphat** die direkt mit der Ribose verbundene Phosphatgruppe.

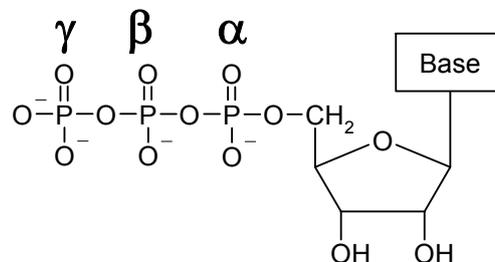
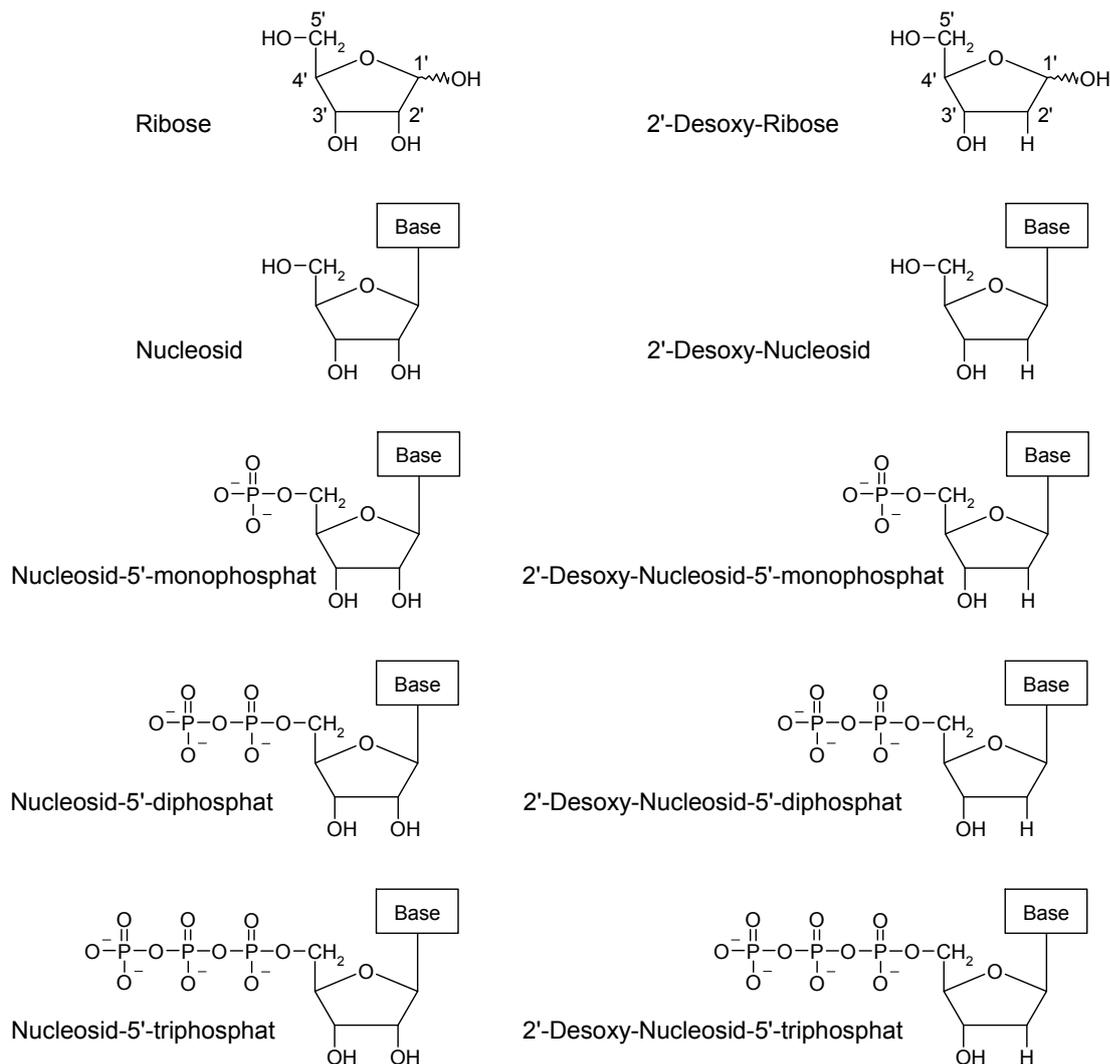


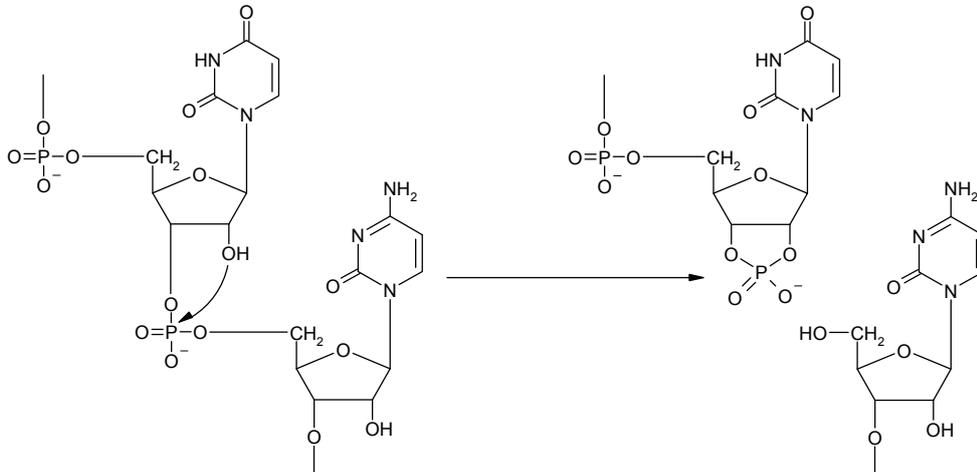
Tabelle 1. Nomenklatur der Nucleoside und Nucleotide

Purinbasen	Purinnucleoside	Purinnucleotide		
Adenin	Adenosin	Adenosinmonophosphat	(Adenylat)	AMP
		Adenosindiphosphat		ADP
		Adenosintriphosphat		ATP
Guanin	Guanosin	Guanosinmonophosphat	(Guanylat)	GMP
		Guanosindiphosphat		GDP
		Guanosintriphosphat		GTP
Pyrimidinbasen	Pyrimidinnucleoside	Pyrimidinnucleotide		
Uracil	Uridin	Uridinmonophosphat	(Uridylat)	UMP
		Uridindiphosphat		UDP
		Uridintriphosphat		UTP
Thymin	Thymidin	Thymidinmonophosphat	(Thymidylat)	TMP
		Thymidindiphosphat		TDP
		Thymidintriphosphat		TTP
Cytosin	Cytidin	Cytidinmonophosphat	(Cytidylat)	CMP
		Cytidindiphosphat		CDP
		Cytidintriphosphat		CTP

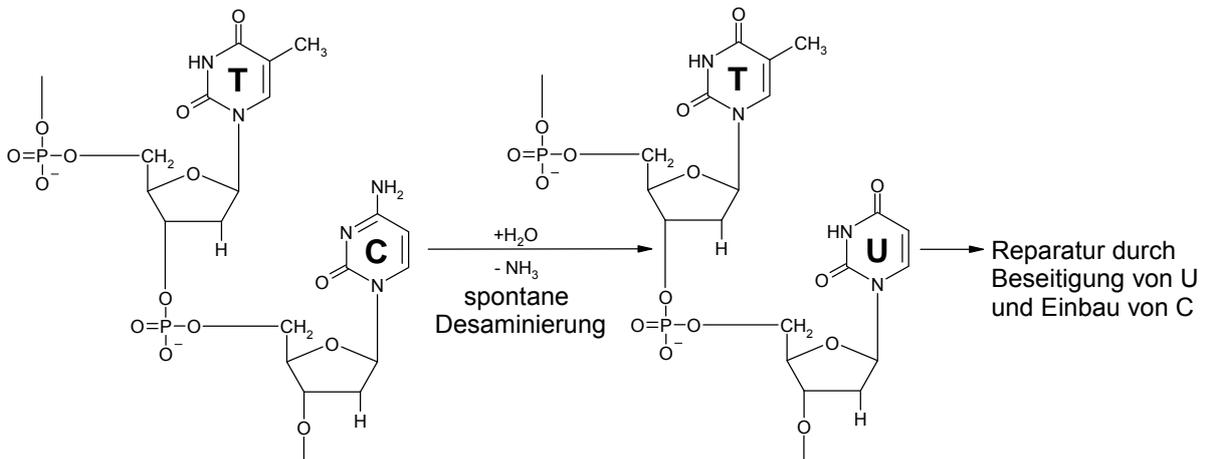


Exkurs: Gründe für die hohe Stabilität der DNA

Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA ist insbesondere unter alkalischen Bedingungen instabil. Die 2'-Hydroxygruppen der einzelnen Ribose-Einheiten können mit den benachbarten Phosphatgruppen reagieren, so dass es zu Strangbrüchen kommt. DNA ist durch das Fehlen der 2'-Hydroxygruppen chemisch stabiler.



Ein indirekter Grund für die hohe Stabilität der DNA ist das Auftreten von Thymin anstelle von Uracil. Cytosin wandelt sich durch Anlagerung von Wasser und Abspaltung von Ammoniak (NH_3) leicht in Uracil um (**spontane Desaminierung**). Ein solches Ereignis würde nach Vervielfältigung der DNA zum Austausch eines C-G-Basenpaars gegen ein T-A-Basenpaar führen. In der Zelle vorhandene DNA-Reparaturmechanismen erkennen jedoch Uracil in DNA-Molekülen als fehlerhaft und ersetzen es wieder durch Cytosin.



Grundprinzipien der DNA-Replikation

Der prinzipielle Mechanismus der DNA-Replikation

Vor der Zellteilung wird bei Bakterien das ringförmige DNA-Molekül (das Bakterienchromosom) verdoppelt und jeweils eines der so entstandenen identischen DNA-Moleküle an die Tochterzellen weitergegeben. Entsprechend wird bei Eukaryonten die DNA der einzelnen linearen Chromosomen verdoppelt und so an die Tochterzellen aufgeteilt, dass jede einen vollständigen Chromosomensatz erhält.

Der prinzipielle Mechanismus der als **Replikation** bezeichneten Verdopplung der DNA-Moleküle ist in **Abb. 4** dargestellt. Die beiden Einzelstränge des zu verdoppelnden DNA-Moleküls werden unter Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. An die so freigelegten Basen lagern sich Desoxynucleotide mit den jeweils komplementären Basen an. Durch Verknüpfen der Desoxynucleotide entsteht ein neues Zucker-Phosphat-Rückgrat.

Die beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge dienen also als Vorlagen (**Matrizen**) für die Synthese der jeweils komplementären neuen DNA-Einzelstränge. Man spricht daher vom **semikonservativen Mechanismus der DNA-Replikation**. Die ursprünglichen Stränge werden als **Elternstränge** und die neu synthetisierten als **Tochterstränge** bezeichnet. Die während der DNA-Replikation auftretende Struktur wird als **Replikationsgabel** bezeichnet und kann elektronenmikroskopisch beobachtet werden.

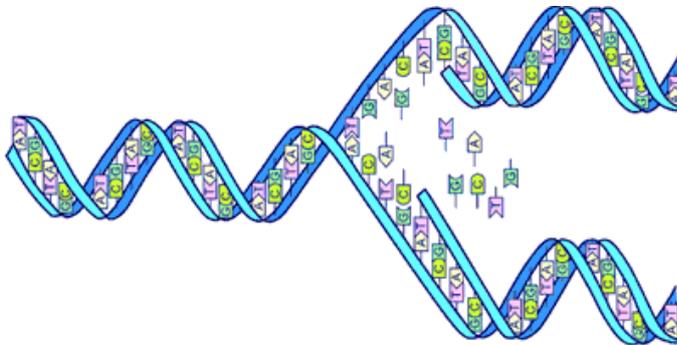


Abb. 4. Prinzipieller Mechanismus der DNA-Replikation.
(<http://www.onlineenzyklopaedie.de/r/re/replikation.html>)

Reaktionsmechanismus der DNA-Synthese

Die Desoxy-Nucleosid-Monophosphat-Einheiten, die bei der DNA-Synthese eingebaut werden, stammen aus den jeweiligen **Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten (dNTPs)**. Die dNTPs lagern sich durch Basenpaarung an den Elternstrang an (**Abb. 5**). Darauf verbindet sich die freie 3'-Hydroxygruppe (sprich: „drei-Strich-Hydroxygruppe“) des zu verlängernden DNA-Strangs mit der α -Phosphatgruppe des dNTPs. Dabei wird das β - und γ -Phosphat als Diphosphat (ältere Bezeichnung: Pyrophosphat) abgespalten. Mechanistisch handelt es sich um einen nucleophilen Angriff des negativ polarisierten Sauerstoffatoms der 3'-Hydroxygruppe auf das positiv polarisierte Phosphoratom der α -Phosphatgruppe. DNA-Polymerasen (siehe unten) können einen DNA-Strang nur an seinem 3'-Ende verlängern. Daher erfolgt DNA-Synthese natürlicherweise immer in **5'→3'-Richtung** (sprich: „fünf-Strich-drei-Strich-Richtung“).

Das freigesetzte Diphosphat wird typischerweise weiter gespalten in zwei Monophosphate (in Abb. 5 nicht dargestellt). Dadurch werden pro Einbau eines Nucleotids zwei energiereiche Phosphorsäure-Anhydrid-Bindungen gespalten, so dass die Gesamtreaktion energetisch günstig ist.

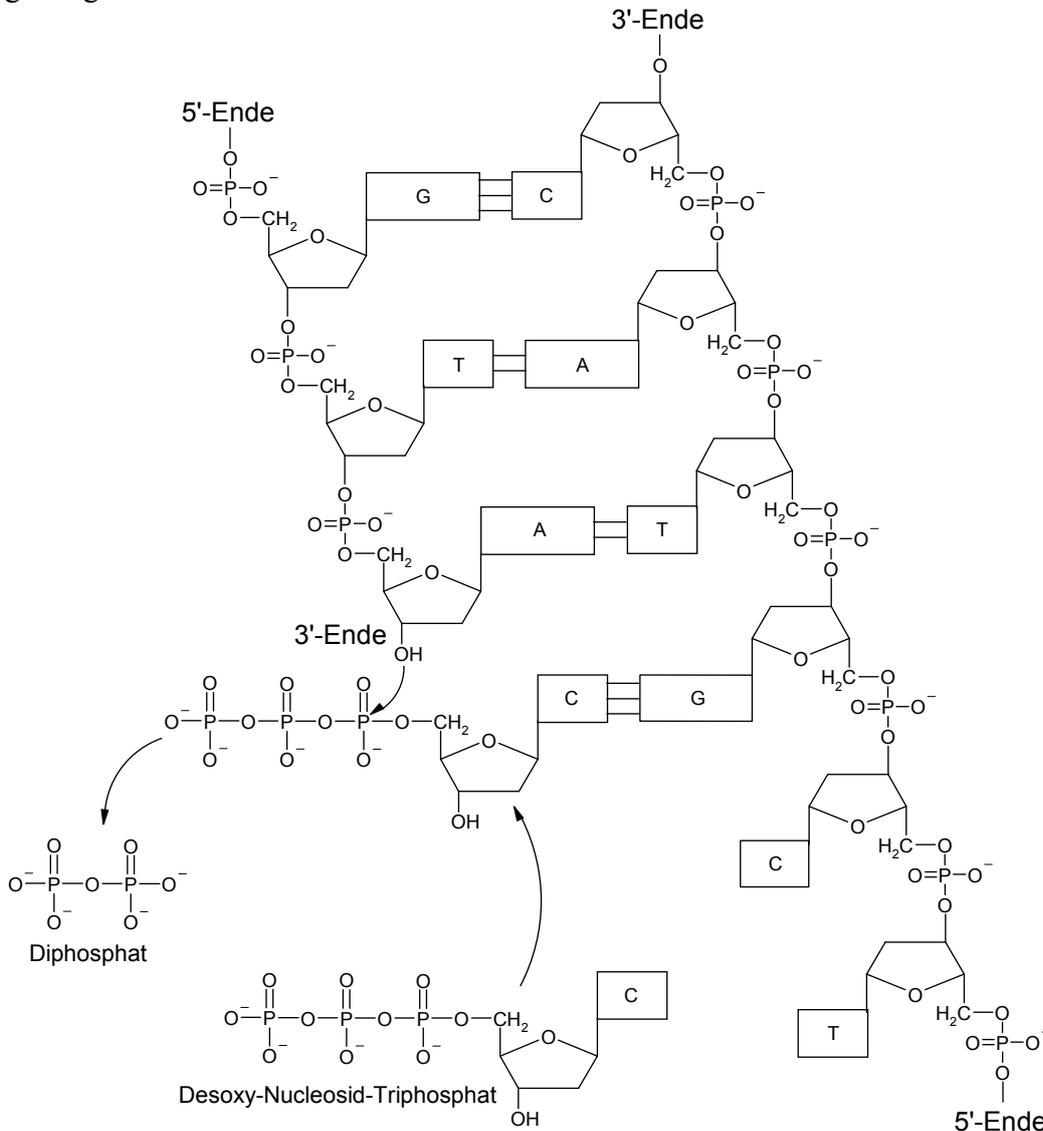


Abb. 5. Mechanismus der DNA-Synthese

Genomorganisation bei Pro- und Eukaryonten

Bakterienzellen (Prokaryonten) besitzen ein einziges **ringförmiges DNA-Molekül** (oft bezeichnet als das **Bakterienchromosom**), auf dem die gesamte genetische Information gespeichert ist.

Manche Bakterienzellen besitzen zusätzlich zu dem Bakterienchromosom sog. **Plasmide**. Dabei handelt es sich um kleine, ebenfalls ringförmige DNA-Moleküle, die typischerweise Gene für Antibiotikaresistenzen tragen und häufig von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden können. In der Gentechnik werden Plasmide als Vehikel zum Einführen von Fremdgenen in Bakterienzellen benutzt.

Eukaryontische Zellen, einschließlich die des Menschen, besitzen im Zellkern **mehrere lineare DNA-Moleküle**, auf denen jeweils ein Teil der genetischen Gesamtinformation gespeichert ist. Diese linearen DNA-Moleküle assoziieren mit zahlreichen verschiedenen DNA-Verpackungsproteinen, so dass große Komplexe entstehen, die während der Zellteilung besonders verdichtet sind und als **Chromosomen** lichtmikroskopisch sichtbar werden. In der Molekularbiologie wird unter dem Begriff Chromosom allerdings häufig nicht die mikroskopisch sichtbare Struktur sondern nur das entsprechende DNA-Molekül verstanden. Die Gesamtheit der DNA einer Zelle und die darin gespeicherte Erbinformation werden als **Genom** bezeichnet.

Zusätzlich zu den Chromosomen im Zellkern kommt bei Eukaryonten auch noch DNA in den **Mitochondrien** und – bei Pflanzen – in den **Chloroplasten** vor. Nach der **Endosymbiontentheorie** sind diese Organellen aus ehemals freilebenden Bakterien entstanden. Entsprechend liegt die DNA der Mitochondrien und Chloroplasten typischerweise als ringförmiges Molekül vor und weist auch weitere Merkmale prokaryontischer DNA auf. Die DNA der Organellen trägt Gene für einige Proteine, die für Mitochondrien bzw. Chloroplasten besonders charakteristisch sind. Der überwiegende Teil der Proteine dieser Organellen wird allerdings durch Gene auf den Chromosomen im Zellkern codiert und in die Organellen importiert.

DNA-Replikation bei Pro- und Eukaryonten

Die **Replikation des ringförmigen Bakterien-Genoms** beginnt an einer einzigen Stelle, die als **Replikationsursprung** (*origin of replication*, kurz: *ori*) bezeichnet wird (**Abb. 6**). Der Replikationsursprung wird durch eine bestimmte Nucleotidsequenz (245 Basenpaare bei *E. coli*) genau festgelegt. Ausgehend vom Replikationsursprung erfolgt der Replikationsvorgang gleichzeitig in beide Richtungen (**bidirektionale Replikation**), so dass zwei Replikationsgabeln entstehen, die das Bakterienchromosom umlaufen, bis sie aufeinander treffen.

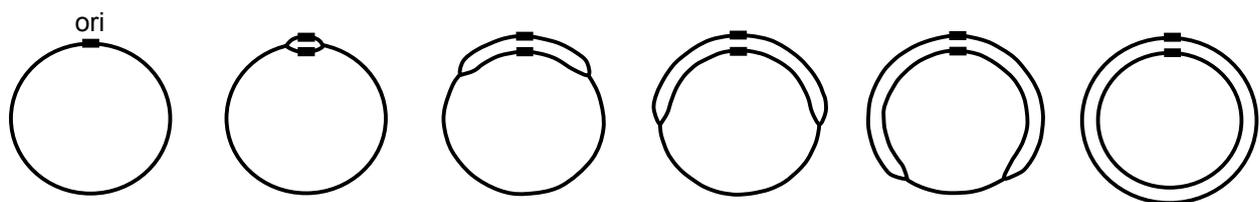


Abb. 6. Replikation des Bakterienchromosoms. Die einfachen Linien stellen doppelsträngige DNA dar. ori: Replikationsursprung (*origin of replication*)

Die **Replikation der Chromosomen der Eukaryonten** beginnt an mehreren Stellen gleichzeitig (**Abb. 7**). Die einzelnen Stellen sind nicht durch bestimmte Sequenzen festgelegt.

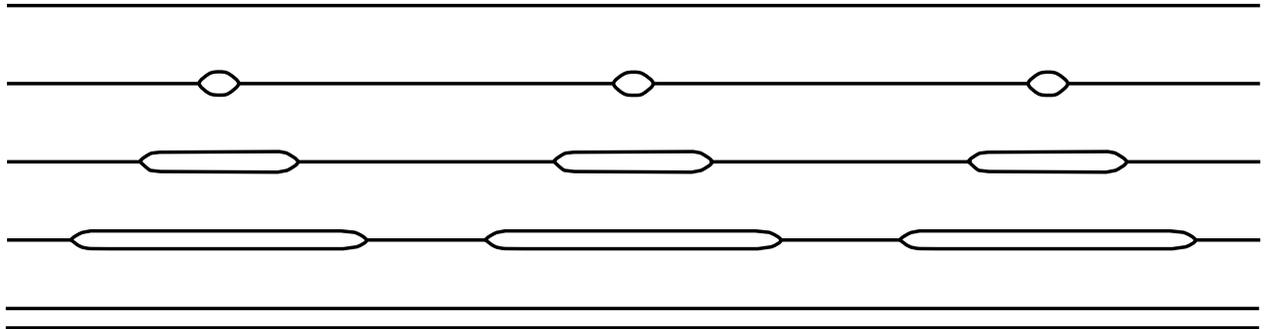


Abb. 7. Replikation eines Eukaryonten-Chromosoms. Die einfachen Linien stellen doppelsträngige DNA dar. Es existieren keine durch bestimmte Sequenzen eindeutig festgelegten Replikationsursprünge.

DNA-Polymerasen

Die Synthese von DNA erfolgt durch Enzyme, die als **DNA-Polymerasen** bezeichnet werden. Bei dem **Bakterium *E. coli*** kommen fünf Typen von DNA-Polymerasen (DNA-Polymerase I, II, III, IV und V) vor. An der eigentlichen DNA-Replikation sind nur DNA-Polymerasen I und III beteiligt. Der größte Teil der DNA-Synthese erfolgt durch **DNA-Polymerase III**. **DNA-Polymerase I** spielt eine Rolle bei der Beseitigung der RNA-Primer und ist notwendig für das Auffüllen der durch die Primer-Beseitigung entstandenen Lücken (siehe unten). Außerdem ist DNA-Polymerase I an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Die übrigen DNA-Polymerasen können ebenfalls an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sein oder – im Gegenteil – die Fehlerrate der DNA-Replikation unter Stressbedingungen erhöhen, so dass die Wahrscheinlichkeit der zufälligen Entstehung besser angepasster Zellen vergrößert wird.

Eukaryontische Zellen können mehr als 15 verschiedene DNA-Polymerasen enthalten. Unmittelbar an der DNA-Replikation beteiligt sind **DNA-Polymerase α , δ und ϵ im Zellkern sowie DNA-Polymerase γ in den Mitochondrien**.

Typische DNA-Polymerasen besitzen folgende 3 Eigenschaften:

1. DNA-Synthese ist nur möglich, wenn ein einzelsträngiges DNA-Molekül als Vorlage (**Matrize**) vorhanden ist. Die eigentlich korrekte (aber ungebräuchliche) Bezeichnung für die hier betrachteten Enzyme ist daher **DNA-abhängige DNA-Polymerasen**. Nur spezielle DNA-Polymerasen (Telomerase und Reverse Transcriptase, siehe unten) können ein einzelsträngiges RNA-Molekül als Matrize benutzen.
2. DNA-Polymerasen können die DNA-Synthese nicht völlig neu beginnen, sondern sind nur in der Lage, vorhandene RNA- oder DNA-Moleküle durch Anfügen von Desoxynucleotiden am 3'-Ende zu verlängern. Die als Startpunkte dienenden RNA- oder DNA-Moleküle werden als **Primer** bezeichnet. RNA-Polymerasen benötigen keinen Primer.
3. Die für die Hauptsyntheseleistung verantwortlichen DNA-Polymerasen besitzen eine **Korrekturlesefunktion (*proofreading activity*)**. Dies ist von Bedeutung, da durch alle DNA-Polymerasen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit falsche (d.h. nicht der Standard-Basenpaarung entsprechende) Desoxynucleotide eingebaut werden. DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktion erkennen falsche Desoxynucleotide in den meisten Fällen und spalten sie unmittelbar nach dem Einbau wieder ab. Korrekturlesefunktion besitzen die DNA-Polymerase III von *E. coli* sowie die eukaryontischen DNA-Polymerasen δ , ϵ und γ .

Die DNA-Replikation im Detail

Im Folgenden sind die Vorgänge an der Replikationsgabel von *E. coli* beschrieben. Die Verhältnisse bei Eukaryonten sind komplizierter, im Prinzip aber ähnlich (**Tabelle 2, Seite 20**).

Entstehung des Leit- und des Folgestrangs

Im Detail ist die DNA-Replikation komplizierter als in **Abb. 4** dargestellt. Aus der Tatsache, dass DNA-Synthese immer nur in 5'→3'-Richtung erfolgen kann, ergibt sich, dass einer der neuen Stränge (der sog. **Leitstrang** oder **Führungsstrang**) kontinuierlich, der andere (der sog. **Folgestrang** oder **verzögerte Strang**) in einzelnen Abschnitten (den sog. **Okazaki-Fragmenten**) synthetisiert wird (**Abb. 8 A–H**). Für ein tieferes Verständnis soll die Entwicklung beider Replikationsgabel vom Beginn des Replikationsvorgangs an betrachtet werden (**Abb. 8 A–H**). Die Teilabbildung **8H** entspricht der in den meisten Lehrbüchern üblichen Darstellung einer Replikationsgabel.

A Im Bereich des Replikationsursprungs werden die beiden Einzelstränge der DNA durch das Enzym **Helicase** unter ATP-Verbrauch voneinander getrennt. Durch gleichzeitige Aktivität zweier Helicase-Moleküle schreitet die Trennung der Einzelstränge in beide Richtungen fort. Die entstehende Struktur wird als **Replikationsblase** oder **Replikationsauge** bezeichnet.

B Eine Wiedervereinigung der Einzelstränge wird durch Anlagerung mehrerer Moleküle des **Einzelstrang-bindenden Proteins** (englisch *single strand binding protein*, SSB) verhindert.

C Das Enzym **Primase** synthetisiert komplementär zu den Einzelsträngen kurze RNA-Moleküle (typischerweise 11 Ribonucleotide). Diese Primer sind erforderlich, da die DNA-Polymerase die DNA-Synthese nicht völlig neu beginnen kann, sondern nur in der Lage ist, vorhandene RNA- (oder DNA-) Moleküle durch Anfügen von Desoxyribonucleotiden zu verlängern.

D Die **DNA-Polymerase** synthetisiert ausgehend von den Primern die **neuen DNA-Stränge**.

E Da die DNA-Synthese **nur in 5'→3'-Richtung** erfolgen kann, entstehen mit dem Fortschreiten der Replikationsgabeln größere **einzelsträngige Bereiche**, die zunächst durch mehrere Moleküle des Einzelstrang-bindenden Proteins besetzt werden. Für die Synthese der neuen DNA-Stränge in diesen Bereichen müssen durch die Primase **neue Primer** synthetisiert werden.

F Die **neuen Primer** werden durch die DNA-Polymerase **verlängert**. Die Einzelstrang-bindenden Proteine werden dabei verdrängt.

G Die von den neuen Primern ausgehende **DNA-Synthese wird fortgesetzt, bis die DNA-Polymerase die alten Primer erreicht**. Zwischenzeitlich sind durch das Fortschreiten der Replikationsgabeln wieder größere einzelsträngige Bereiche entstanden, an denen durch die Primase **wieder neue Primer** synthetisiert werden.

H Betrachtung nur einer Replikationsgabel in einem fortgeschrittenen Stadium des Replikationsvorgangs: Einer der neuen DNA-Stränge (der sog. **Leitstrang** oder **Führungsstrang**) wird kontinuierlich mit dem Fortschreiten der Replikationsgabel

synthetisiert. Der andere neue DNA-Strang (der sog. **Folgestrang** oder **verzögerte Strang**) wird in einzelnen Abschnitten synthetisiert. Diese 1000 bis 2000 Basenpaare langen Abschnitte werden als **Okazaki-Fragmente** bezeichnet. Die Synthese der einzelnen Okazaki-Fragmente erfolgt gegenläufig zur Wanderungsrichtung der Replikationsgabel.

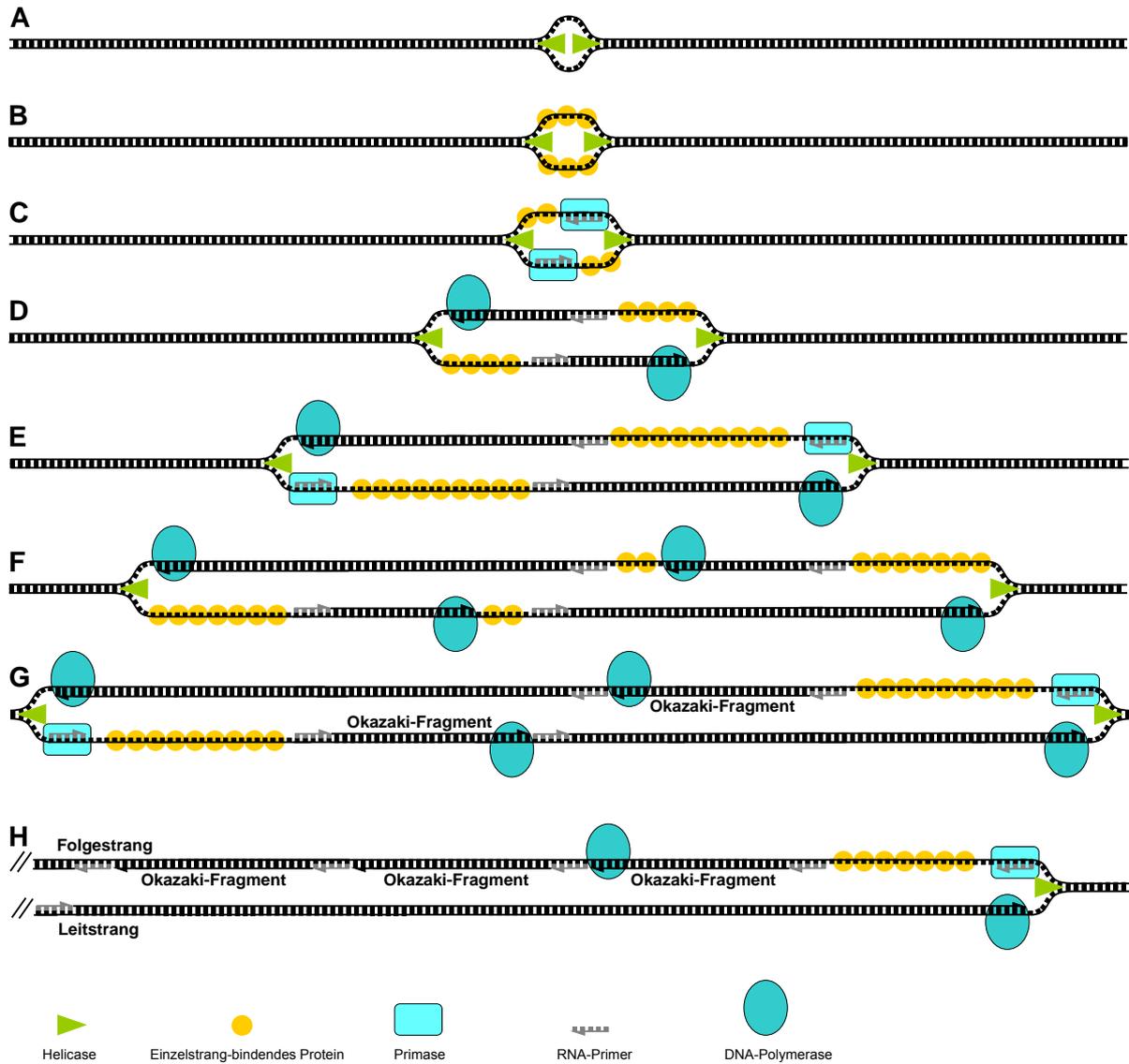


Abb. 8. Beginn der Replikation, Bildung der beiden Replikationsgabeln und Entstehung des Leit- und des Folgestrangs. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Primerbeseitigung, Auffüllen der Lücken und Verknüpfung der DNA-Fragmente

Um die Okazaki-Fragmente zu einem durchgängigen DNA-Strang zu verbinden sind weitere Vorgänge erforderlich (**Abb. 9**). Zunächst werden die **Primer beseitigt**. Dies geschieht größtenteils durch das **Enzym RNase H**, das spezifisch RNA in RNA-DNA-Hybridmolekülen abbaut. Allerdings kann RNase H nur die Bindungen zwischen Ribonucleotiden spalten, nicht aber zwischen Ribonucleotiden und Desoxyribonucleotiden. Das letzte, unmittelbar an die DNA gebundene Ribonucleotid wird daher nicht durch RNase H entfernt, sondern durch DNA-Polymerase I. Dieses Enzym kann nicht nur DNA synthetisieren, sondern auch RNA (und DNA) ausgehend vom 5'-Ende abbauen; man spricht von der **5'→3' Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase I**.

Nach Beseitigung der Primer werden die entstandenen **Lücken mit DNA aufgefüllt**. Dazu verlängert die **DNA-Polymerase I** die Okazaki-Fragmente über den zuvor durch die Primer besetzten Bereich.

Das 3'-Ende des verlängerten Okazaki-Fragments kann durch die DNA-Polymerase I nicht mit dem 5'-Ende des folgenden Okazaki-Fragments verknüpft werden. Dazu ist ein weiteres Enzym, die **DNA-Ligase**, notwendig. Der Vorgang der Verknüpfung wird als **Ligation** bezeichnet. Die DNA-Ligase von *E. coli* spaltet für den nötigen Energiegewinn NAD^+ (NAD^+ dient hier nicht als biologisches Oxidationsmittel, sondern der Energiegewinnung durch Spaltung der im NAD^+ -Molekül enthaltenen Phosphorsäure-Anhydrid-Bindung). Die DNA-Ligase des Menschen gewinnt die Energie durch ATP-Spaltung.

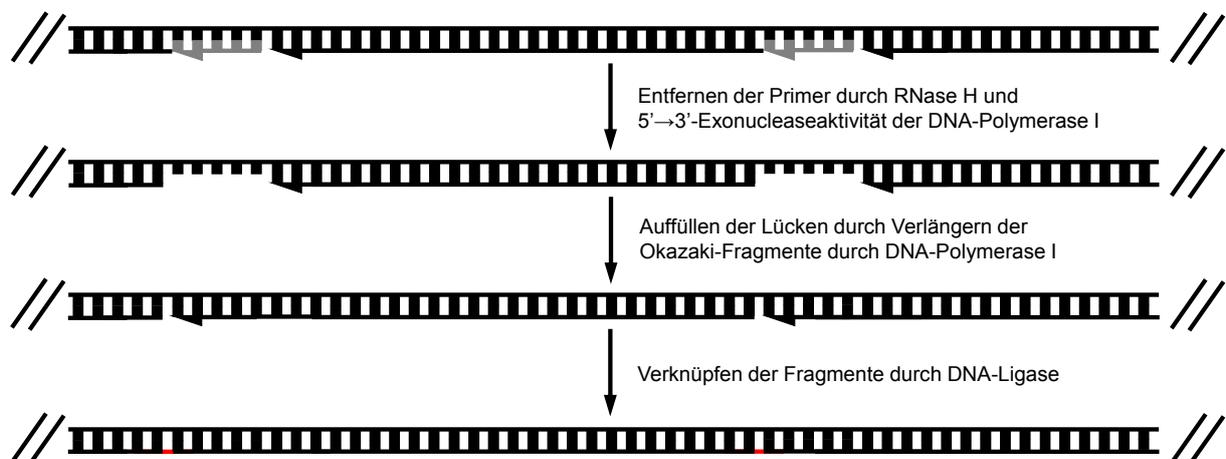


Abb. 9. Prozessierung des Folgestrangs durch Primerbeseitigung, Auffüllen der Lücken und Ligation.

Posaunen-Modell der DNA-Replikation

Nach der schematischen Darstellung in **Abb. 8** könnte angenommen werden, dass die Synthese des Leitstrangs und des Folgestrangs durch zwei unabhängige DNA-Polymerase III-Moleküle, die sich in entgegengesetzte Richtungen bewegen, erfolgt. In Wirklichkeit sind die beiden DNA-Polymerase-III-Moleküle miteinander verbunden und können sich somit nicht unabhängig voneinander bewegen. Außerdem bilden die beiden DNA-Polymerase-III-Moleküle einen Komplex mit mehreren zusätzlichen Proteinen. Diesen Gesamtkomplex bezeichnet man als **DNA-Polymerase-III-Holoenzym**. Die gesamte an der Replikation beteiligte molekulare Maschinerie wird als **Replisom** bezeichnet. Von den zusätzlichen Proteinen sind für die weiteren Betrachtungen nur die gleitende DNA-Klammer und der Klammer-Beladungs-Komplex von Bedeutung.

Die **gleitende DNA-Klammer** besteht aus zwei halbkreisförmigen Untereinheiten, die gemeinsam einen Ring bilden, durch den der neu synthetisierte DNA-Doppelstrang aus dem Komplex austritt. Jeweils eine gleitende DNA-Klammer ist mit jedem der beiden DNA-Polymerase-III-Moleküle assoziiert. Das Zusammenfügen des Rings aus den beiden Untereinheiten erfolgt durch den **Klammer-Beladungs-Komplex**.

Die gleichzeitige Synthese des Leitstrangs und des Folgestrangs durch die beiden miteinander verbundenen DNA-Polymerase III-Moleküle wird dadurch möglich, dass der Folgestrang eine Schleife bildet. Da diese Schleife während der Replikation periodisch größer und kleiner wird und damit an den Zug einer Posaune erinnert, spricht man vom **Posaunen-Modell** (*trombone model*) der DNA-Replikation (**Abb. 10**).

A Betrachtet wird ein Zustand, in dem ein Okazaki-Fragment ungefähr zur Hälfte fertig synthetisiert ist. Der neu synthetisierte Doppelstrang tritt durch die gleitende DNA-Klammer aus. Gleichzeitig schreitet die Trennung der Eltern-Einzelstränge durch die Helicase voran. Durch beide Vorgänge vergrößert sich die Schleife. Außerdem wird der bereits zuvor replizierte Bereich des Folgestrangs an die DNA-Polymerase III herangezogen.

B Dies ist so weit möglich, bis die DNA-Polymerase III an dem Primer des zuvor synthetisierten Okazaki-Fragments angelangt ist. In dem inzwischen vergrößerten einzelsträngigen Bereich der Schleife wird ein neuer Primer durch die Primase synthetisiert.

C Die gleitende DNA-Klammer löst sich zusammen mit dem DNA-Strang von der DNA-Polymerase III ab und zerfällt in ihre beiden Untereinheiten. Durch den Klammer-Beladungs-Komplex wird eine neue gleitende DNA-Klammer im Bereich des neuen Primers zusammengefügt.

D Durch das Fortschreiten der Replikationsgabel wird der einzelsträngige Bereich so weit vergrößert, dass die neu gebildete gleitende DNA-Klammer mit dem umschlossenen DNA-RNA-Hybrid in die Nähe der DNA-Polymerase III gelangen kann.

E Die gleitende DNA-Klammer mit dem DNA-RNA-Hybrid bindet an die DNA-Polymerase III. Die Synthese des nächsten Okazaki-Fragments durch Verlängerung des Primers kann so beginnen.

Bemerkenswert ist, dass bei dem durch das Posaunen-Modell beschriebenen Mechanismus die Untereinheiten der gleitenden DNA-Klammern und die Primase nicht dauerhaft mit der DNA-Polymerase III verbunden sind, sondern als lösliche Proteine vorübergehend in den Komplex ein- und austreten.

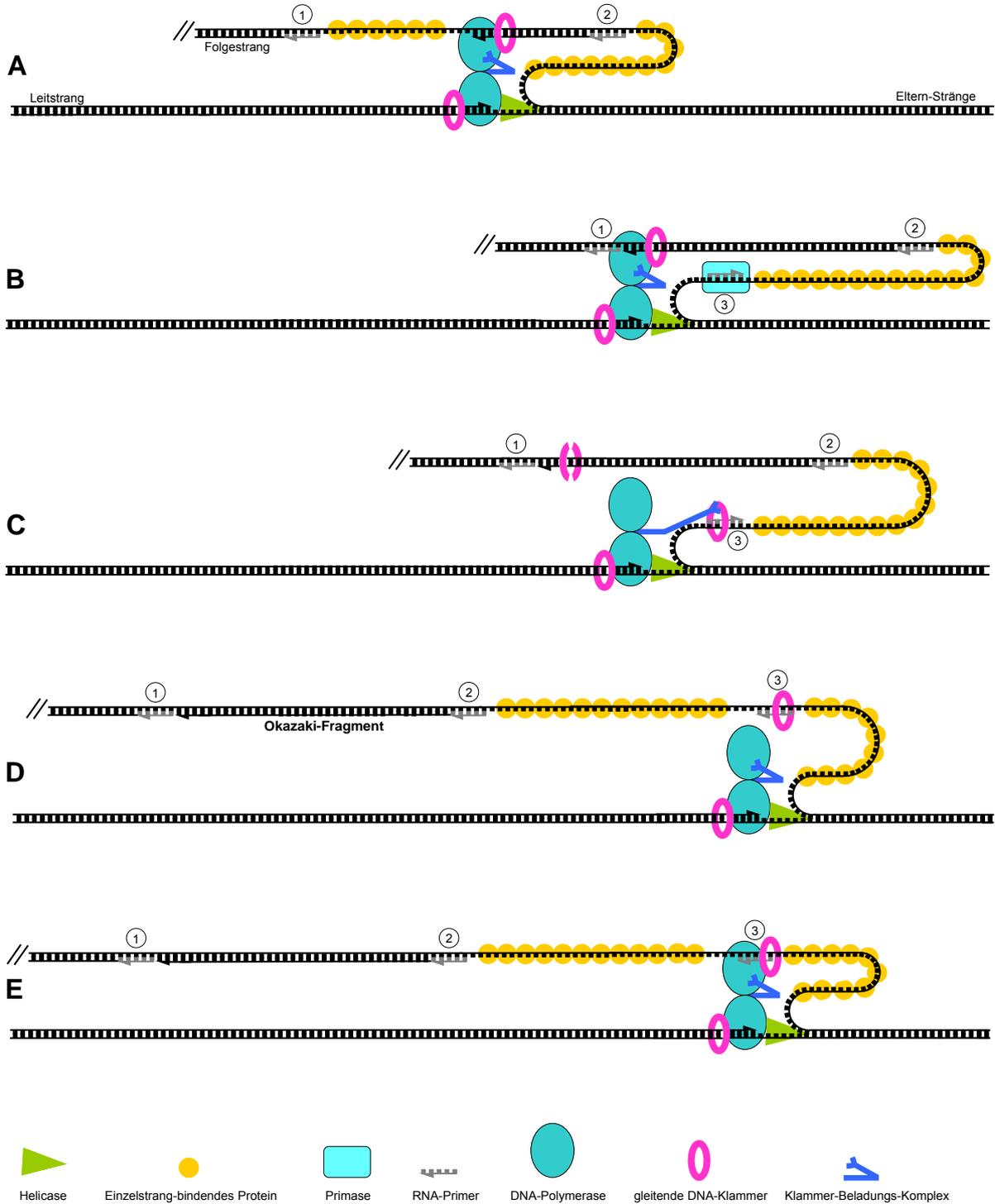


Abb. 10. Posaunen-Modell der DNA-Replikation. Um die Bewegung des Folgestrangs zu verdeutlichen, sind die Positionen der Primer durch die eingekreiste Ziffern 1, 2 und 3 markiert. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Verhinderung der Verkürzung der Chromosomen der Eukaryonten

Das Chromosom eines Bakteriums kann aufgrund seiner Ringstruktur mit Hilfe der beschriebenen Mechanismen vollständig repliziert werden. Bei Eukaryonten (einschließlich des Menschen) ist ein zusätzlicher Mechanismus erforderlich, damit die linearen Chromosomen nicht durch den Replikationsvorgang verkürzt werden. Dieser Mechanismus wird durch das Enzym **Telomerase** vermittelt (**Abb. 11 A–H**).

A Dargestellt ist das Ende eines Chromosoms nach weitgehender Beendigung der Replikation durch den Standardmechanismus; die RNA-Primer sind noch nicht beseitigt. Die Synthese des Führungsstrangs kann ohne Probleme bis zum Ende des Chromosoms abgeschlossen werden. Daher werden im Folgenden nur noch die Vorgänge am Folgestrang betrachtet.

B Die RNA-Primer wurden beseitigt, die entstandenen Lücken mit DNA aufgefüllt und die Okazaki-Fragmente durch die Ligase verbunden. Die Lücke, die durch die Beseitigung des äußersten Primers entstanden ist, kann nicht ohne weiteres mit DNA aufgefüllt werden, da die DNA-Synthese nur in 5'→3'-Richtung erfolgen kann.

C Die Chromosomenenden bestehen aus einer Vielzahl von Wiederholungen einer kurzen Nucleotidabfolge (TTAGGG beim Menschen). Diese Wiederholungssequenzen erstrecken sich über mehrere tausend Basenpaare (rot dargestellt). Die Telomerase ist ein ungewöhnliches Enzym, das aus einem Proteinanteil und einem kurzen RNA-Molekül besteht (ein sog. Ribonucleoprotein-Enzym). Die Basenabfolge dieses RNA-Moleküls ist komplementär zu der Wiederholungssequenz am Chromosomenende. Dadurch erfolgt eine Paarung komplementärer Basen zwischen dem einzelsträngigen DNA-Ende des Chromosoms und der RNA-Komponente der Telomerase.

D Mit der RNA-Komponente als Matrize verlängert die Telomerase den überhängenden DNA-Einzelstrang. Da die Telomerase die Basenabfolge eines RNA-Moleküls in einen komplementären DNA-Strang umschreibt, spricht man von einer **reversen Transcriptase-Aktivität**. Andere bekannte RNA-abhängige DNA-Polymerasen sind die reversen Transcriptasen der Retroviren (z.B. des AIDS-Virus HIV).

E Durch die Aktivität der Telomerase wurde der überhängende DNA-Einzelstrang über die ursprüngliche Länge des Chromosoms hinaus verlängert. Eine weitere Verlängerung des überhängenden DNA-Einzelstrangs kann durch mehrmaliges erneutes Ansetzen der Telomerase erfolgen (in Abb. 11 nicht dargestellt).

F Durch die Standard-Mechanismen der DNA-Replikation wird ein Komplementärstrang zu dem verlängerten Einzelstrang synthetisiert. Dabei synthetisiert die Primase zunächst einen RNA-Primer.

G Der RNA-Primer wird durch die DNA-Polymerase verlängert.

H Der RNA-Primer wurde beseitigt. Der doppelsträngige DNA-Bereich ist jetzt ungefähr genauso lang wie das ursprüngliche Chromosom.

Die Telomerase wird nur in Zellen mit hohem Teilungsvermögen gebildet, beim gesunden Organismus vor allem in den **Keimbahnzellen** der Hoden bzw. der Eierstöcke sowie in den Stammzellen des Knochenmarks. Das Fehlen der Telomerase ist ein Grund, warum die

meisten Körperzellen nur 40-60 Teilungen durchlaufen können. Die dabei erfolgende Verkürzung der Chromosomenenden führt zunächst zu keiner Beeinträchtigung der Zellfunktion, da die Wiederholungssequenzen an den Chromosomenenden keine genetische Information beinhalten. In **Tumorzellen** ist eine Telomerase-Aktivität immer nachweisbar.

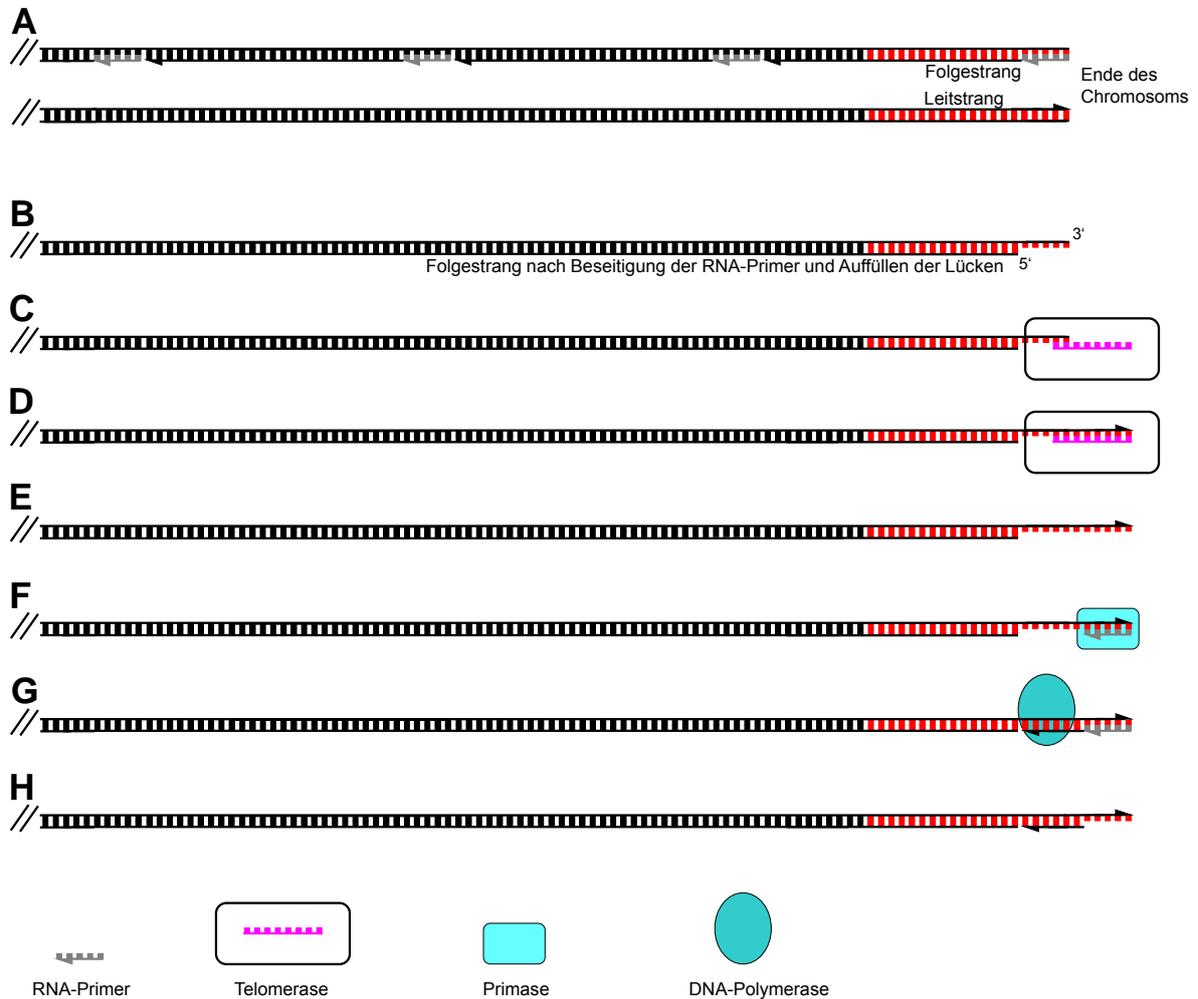


Abb. 11. Verhinderung der Verkürzung der Chromosomenenden durch Telomerase. Die keine Gene enthaltenden Wiederholungssequenzen am Chromosomenende sind in Rot angedeutet. In Teilabbildung A sind der Leit- und der Folgestrang dargestellt; in den Teilabbildungen B–H wird nur der Folgestrang betrachtet. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Tabelle 2. Merkmale der DNA-Replikation bei *E. coli* und dem Menschen.

	<i>E. coli</i>	Mensch
Genomgröße	ca. $4,6 \cdot 10^6$ Basenpaare (bp)	ca. $3,2 \cdot 10^9$ Basenpaare (bp)
Gesamtlänge der DNA	ca. 1,6 mm	ca. 1,1 m (haploider Chromosomen-Satz)
Genomorganisation	ein ringförmiges Chromosom	23 lineare Chromosomen (haploider Chromosomen-Satz)
Replikationsdauer	ca. 50 min	ca. 8 h
Startpunkt der Replikation	ein <i>origin of replication</i> bestehend aus 245 bp mit definierter Sequenz	ca. 30.000 nur ungefähr festgelegte AT-reiche Sequenzbereiche im Abstand von ca. 150 kbp
Synthese der RNA-Primer	Primase synthetisiert den RNA-Primer (typischerweise 11 Ribonucleotide)	Eine Untereinheit der DNA-Polymerase α (Initiatorpolymerase) synthetisiert den RNA-Primer (5–15 Ribonucleotide). Die DNA-Polymerase α hängt dann noch 50–100 Desoxyribonucleotide an den RNA-Primer.
Hauptenzym der DNA-Synthese	DNA-Polymerase III	DNA-Polymerase δ (unter Beteiligung von DNA-Polymerase ϵ^1)
Beseitigung der RNA-Primer	RNase H beseitigt größten Teil des Primers; DNA-Polymerase I beseitigt durch 5'→3'-Exonucleaseaktivität das letzte unmittelbar an die DNA gebundene Ribonucleotid	RNase H beseitigt größten Teil des Primers; FEN-1 (<i>flap endonuclease-1</i>) beseitigt durch 5'→3'-Exonucleaseaktivität das letzte unmittelbar an die DNA gebundene Ribonucleotid
Auffüllen der Lücken nach Beseitigung der Primer	DNA-Polymerase I	DNA-Polymerase δ
Verknüpfung der Okazaki-Fragmente	DNA-Ligase, Energiegewinn durch Spaltung von NAD^+	DNA-Ligase, Energiegewinn durch Spaltung von ATP
Verhinderung der Verkürzung der Chromosomenenden	nicht erforderlich, wegen Ringstruktur des Chromosoms	Telomerase verlängert die Chromosomenenden mit einem kurzen RNA-Molekül als Matrize (Reverse Transcriptase-Aktivität).

¹Nach der aktuellen Lehrmeinung synthetisiert DNA-Polymerase ϵ den Führungsstrang und DNA-Polymerase δ den Folgestrang. Eine neue Studie kommt jedoch zu dem Schluss, dass beide Stränge durch DNA-Polymerase δ synthetisiert werden; DNA-Polymerase ϵ hat nach dieser Studie eine Korrekturlesefunktion speziell für den Leitstrang (Johnson et al. 2015; Stillman 2015).

Die Superspiralisierung der DNA

Modellversuch mit einem Gummiring

Das Phänomen der Superspiralisierung lässt sich anhand eines Modellversuchs verstehen (**Abb. 12**). Man durchschneide einen Gummiring und fixiere eines der Enden des so erhaltenen Bands. Das freie Ende des Bands wird nun um seine Längsachse gedreht. Die Enden des verdrehten Bands werden dann wieder zusammengeklebt. Als Ergebnis entsteht ein kompaktes längliches Gebilde, bei dem sich die beiden Hälften des Gummirings gegenseitig umwinden.

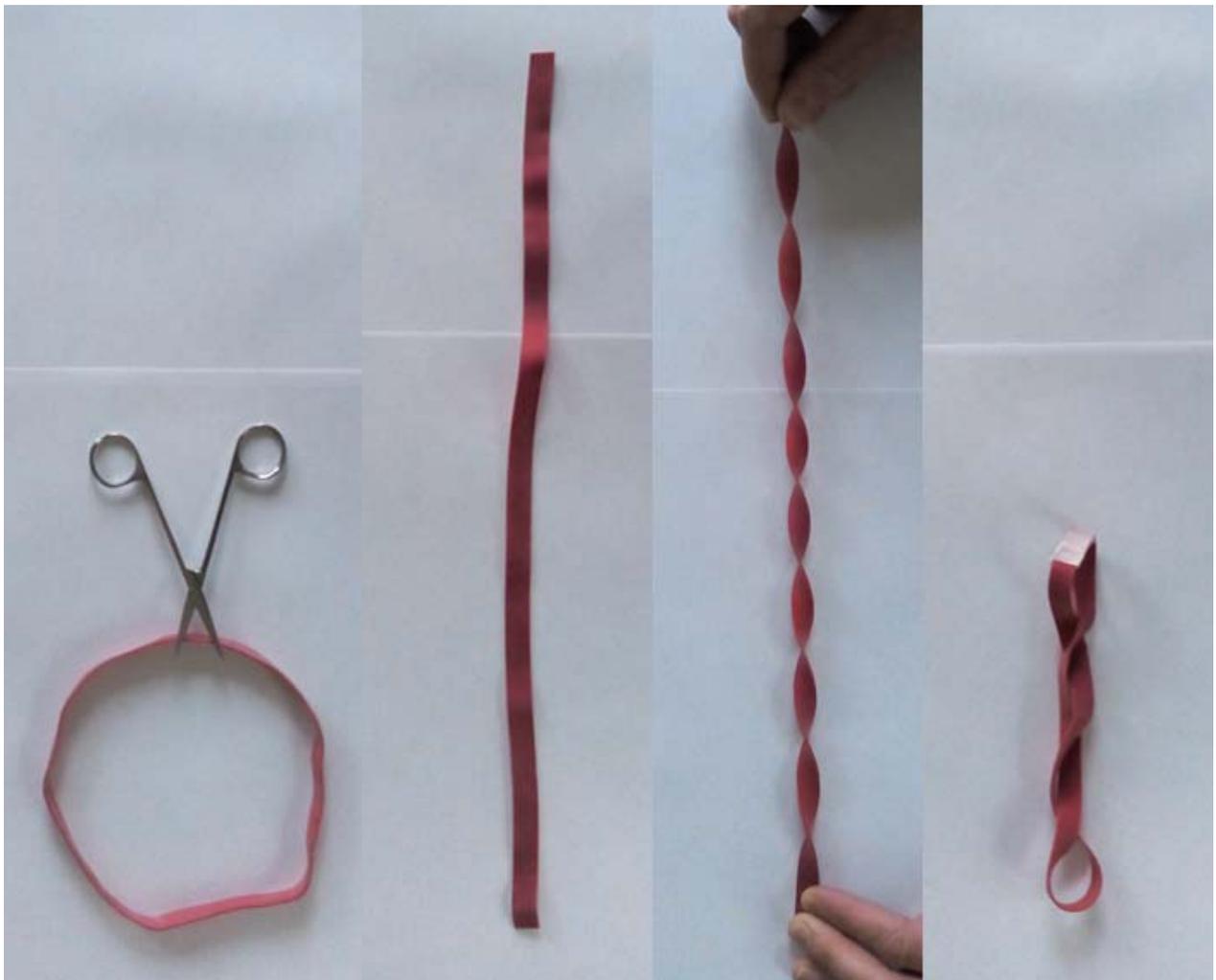


Abb. 12. Modellversuch zur Superspiralisierung mit einem Gummiring.

Superspiralisierung ringförmiger und linearer DNA-Moleküle

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass **Plasmide** (kleine ringförmige DNA-Moleküle, siehe oben) häufig als Strukturen vorliegen, die dem verwundenen Gummiring ähneln (**Abb. 13**). Formal kann man sich das Zustandekommen dieser Strukturen wie bei dem Versuch mit dem Gummiring dadurch vorstellen, dass der DNA-Doppelstrang des Plasmids durchtrennt, verdreht und wieder geschlossen wird. Im Gegensatz zu dem Gummiband stellt der DNA-Doppelstrang eine Doppelhelix dar. Die Struktur, bei der sich Abschnitte des DNA-Doppelstrangs gegenseitig umwinden und damit eine übergeordnete Helix bilden, wird als **Superhelix** bezeichnet. Man sagt, die DNA liegt in **superspiralisierter** (oder **superhelikaler**) Form vor.

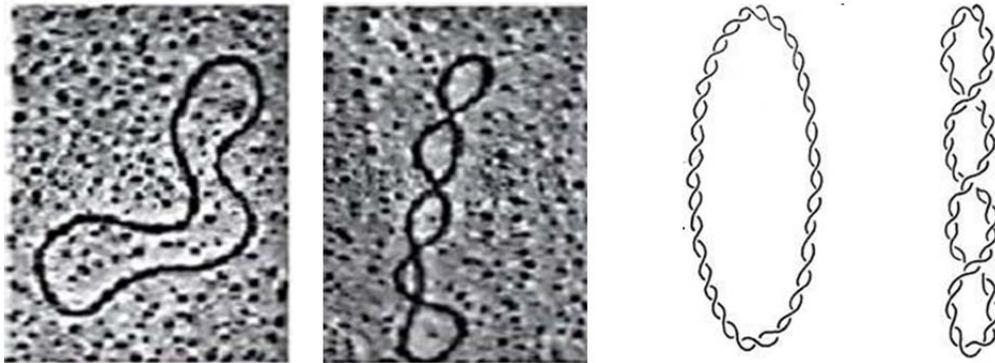


Abb. 13. Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Plasmids im entspannten und superspiralisierten Zustand (rechts schematische Zeichnung). Nach <http://physics.fatih.edu.tr/biophysics/dna.htm>; <http://www.notahelix.com/proofs/>.

Nicht nur Plasmide und die ringförmigen Chromosomen der Bakterien können in superspiralisierter Form vorliegen, sondern auch die linearen DNA-Moleküle der Chromosomen der Eukaryonten. Dies ist möglich, weil die DNA-Moleküle nicht frei vorliegen, sondern über DNA-Verpackungsproteine mit größeren im Detail nicht genau bekannten Strukturen des Zellkerns (der sog. Kernmatrix oder nukleären Matrix) verbunden sind (**Abb. 14**). Dadurch sind einzelne DNA-Abschnitte räumlich fixiert, so dass keine spontane Entwindung stattfindet.

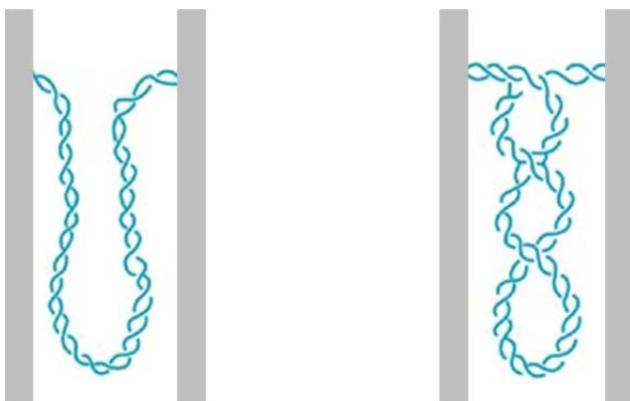


Abb. 14. Linearer, an beiden Enden fixierter DNA-Abschnitt im entspannten und superspiralisierten Zustand. Die Fixierung durch Bindung an die Kernmatrix ist mit grauen Balken angedeutet. Nach Pommier, 2006.

Positive und negative Superspiralisierung

Abhängig von der Verwindungsrichtung, in die die **Superspiralisierung** in den DNA-Doppelstrang eingeführt wird, ergeben sich unterschiedliche Auswirkungen. Folgt die Verwindung dem rechtsgängigen Windungssinn der Doppelhelix, wird eine Torsionsspannung aufgebaut, die einer Auftrennung der DNA-Einzelstränge entgegenwirkt; man spricht in diesem Fall von einer **positiven Superspiralisierung**. Dagegen begünstigt eine Verwindung gegen den rechtsgängigen Windungssinn der Doppelhelix die Auftrennung der DNA-Einzelstränge; in diesem Fall spricht man von einer **negativen Superspiralisierung**.

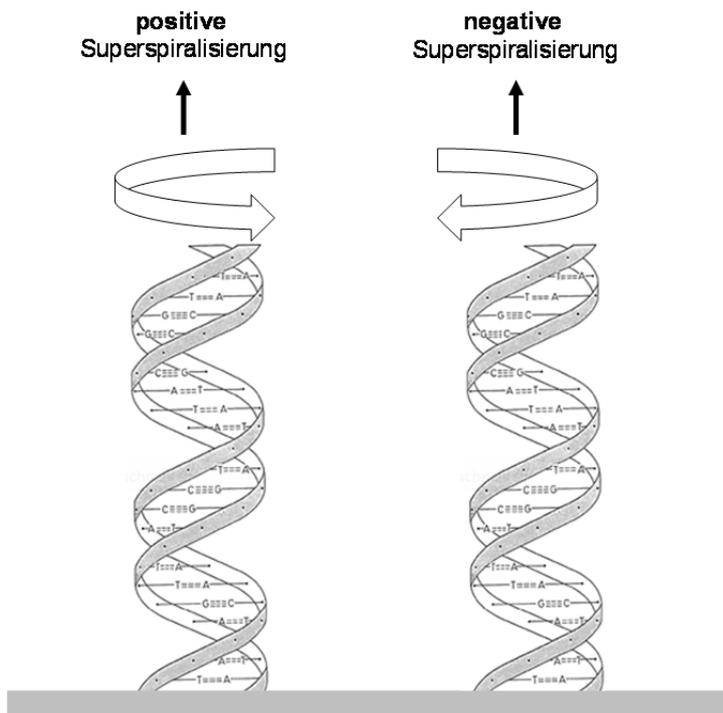


Abb. 15. Erzeugung positiver und negativer Superspiralisierung.

Topoisomerasen

Funktionale DNA besitzt (zumindest bei Bakterien) typischerweise einen bestimmten Grad an negativer Superspiralisierung. Dadurch werden Vorgänge, bei denen die Einzelstränge der DNA-Doppelhelix voneinander getrennt werden müssen, erleichtert. Dies ist u.a. bei der DNA-Replikation und dem Ablesen der Gene (Transkription) der Fall. Diese Vorgänge führen allerdings auch zu einer Veränderung des Grads der Superspiralisierung (z.B. durch Erzeugung positiver Superspiralisierung vor der wandernden Replikationsgabel). Daher reguliert die Zelle den Grad der Superspiralisierung durch spezielle Enzyme, die sog. **Topoisomerasen**. Es werden zwei Haupttypen – Topoisomerase I und Topoisomerase II – unterschieden.

Topoisomerase I ist dadurch gekennzeichnet, dass sie **ATP-unabhängig** arbeitet, einen vorübergehenden **Einzelstrangbruch** verursacht und den **Grad der Superspiralisierung nur verringern** kann. In einer DNA-Doppelhelix mit hohem Grad an Superspiralisierung bewirkt Topoisomerase I einen Einzelstrangbruch und verbindet sich gleichzeitig mit einem der beiden so erzeugten Strangenden (**Abb. 16**). Der Teil der Doppelhelix mit dem durch den Einzelstrangbruch erzeugten freien Ende kann nun rotieren und damit die Torsionsspannung abbauen. Anschließend wird der gebrochene Strang durch die Topoisomerase I wieder zusammengefügt.

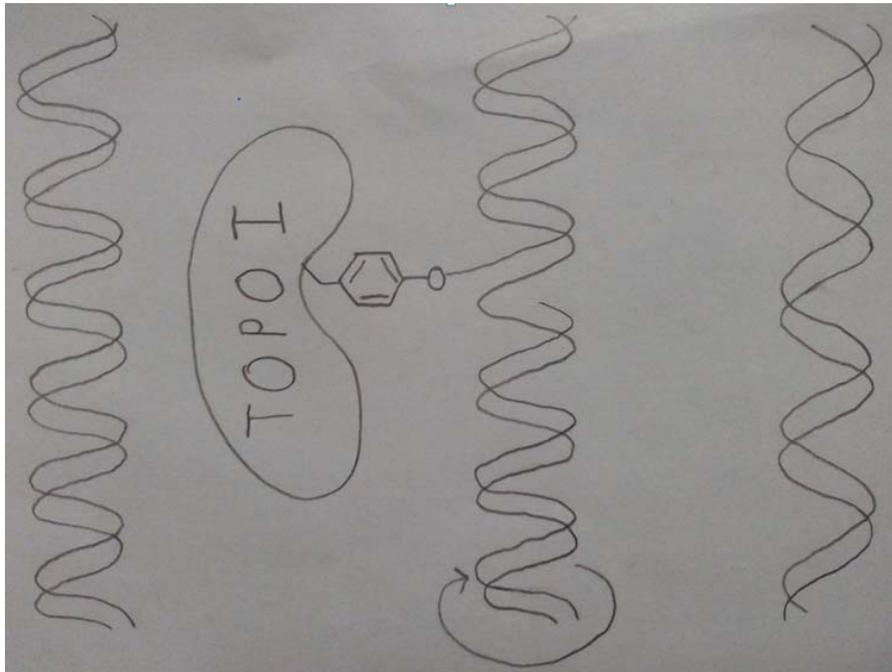


Abb. 16. Mechanismus der Verringerung der Superspiralisierung durch Topoisomerase I. Ein hoher Grad an Superspiralisierung ist durch eine hohe Windungsdichte der Doppelhelix angedeutet. Eines der durch den Einzelstrangbruch entstehenden Strangenden ist vorübergehend über die Aminosäure Tyrosin (angedeutet durch einen aromatischen Ring) mit dem Enzym verbunden.

Topoisomerase II ist dadurch gekennzeichnet, dass sie **ATP benötigt**, einen vorübergehenden **Doppelstrangbruch** verursacht und den **Grad der Superspiralisierung erhöhen und verringern** kann. (Die Topoisomerase II des Menschen kann den Grad der Superspiralisierung allerdings nur verringern.) Der Mechanismus der Topoisomerase II beruht darauf, dass zwei DNA-Doppelstränge gebunden und in enge Nachbarschaft gebracht werden (**Abb. 17**). In einem der beiden Doppelstränge wird ein Doppelstrangbruch verursacht, wobei die Strangenden mit dem Enzym verbunden bleiben. Darauf wird der zweite Doppelstrang durch die Lücke in dem geöffneten ersten Doppelstrang geführt. Der gebrochene Doppelstrang wird danach wieder zusammengefügt.

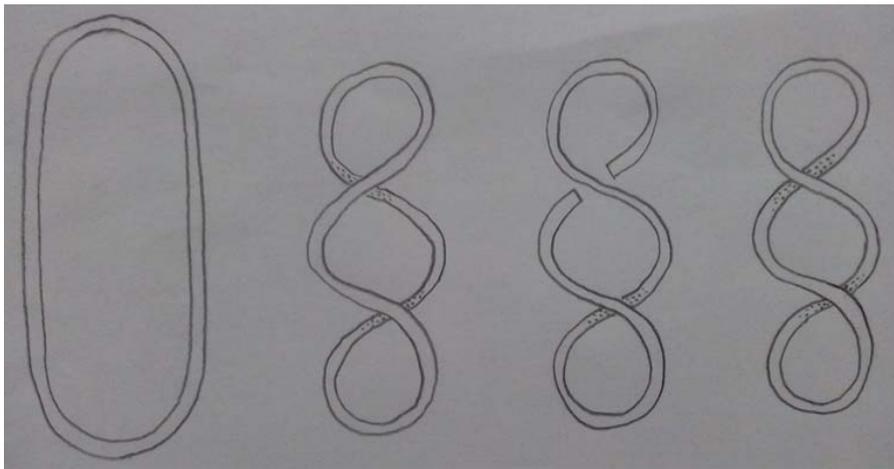


Abb. 17. Einführung von Superspiralisierung in ein ringförmiges DNA-Molekül durch Topoisomerase II. Der DNA-Doppelstrang ist durch parallele Linien angedeutet.

Die Topoisomerase II der Bakterien wird häufig als **Gyrase** bezeichnet. Spezifische Hemmstoffe der bakteriellen Topoisomerase II werden als hocheffiziente Antibiotika eingesetzt. Der bekannteste Vertreter dieser **Gyrase-Hemmer** ist **Ciprofloxacin**.

Quellen:

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München, 6. Auflage, 2007.

Heinrich PC, Müller H, Graeve L (Hrsg) Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. Springer Verlag, Heidelberg, 9. Auflage, 2014.

Johnson RE, Klassen R, Prakash L, Prakash S. A Major Role of DNA Polymerase δ in Replication of Both the Leading and Lagging DNA Strands. Mol Cell. 2015 Jul 16;59(2):163-75.

Kössel H. Molekulare Biologie. Ernst Klett Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 1970.

Lewin B. Genes IX. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 2008.

Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer. 2006 Oct;6(10):789-802.

Sköld O. Antibiotics and antibiotic resistance. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, 2011.

Stillman B. Reconsidering DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. Mol Cell. 2015 Jul 16;59(2):139-41.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Primase> (abgerufen am 31.12.2015)

<http://en.wikipedia.org/wiki/DnaG> (abgerufen am 31.12.2015)

http://en.wikipedia.org/wiki/Hayflick_limit (abgerufen am 15.06.2014)

https://en.wikipedia.org/wiki/Type_II_topoisomerase (abgerufen am 02.01.2016)

<http://www.onlineenzyklopaedie.de/r/re/replikation.html> (abgerufen am 15.06.2014)

<http://physics.fatih.edu.tr/biophysics/dna.htm> (abgerufen am 09.08.2014)

<http://www.notahelix.com/proofs/> (abgerufen am 01.11.2014)

<http://www.faculty.biol.ttu.edu/densmore/MB06pdfs/Molecular%20lect%2010.06.pdf> (abgerufen am 22.04.2014)