

Molekulare Physiologie 5

Desoxyribonukleinsäure – DNA – der Bauplan der Zelle




Barbara Biedermann

Die DNA-Replikationsmaschinerie – und ihr Rechtschreibsystem

Achtung – Warnung!

Dies ist das komplizierteste Kapitel im molekularmedizinischen Teleskop. Kaum ein Leser hat es bisher auf Anhieb verstanden. (Unter uns gesagt: Dies liegt nicht am Leser, sondern darin, dass die Natur ein schwieriges Problem auf ihre Weise gelöst hat!) Die Verfasserin empfiehlt die Lektüre in kleinen Dosen.

DNA liegt in der Zelle immer als doppelsträngiges Molekül vor. Im Hinblick auf die Zellteilung muss DNA genau kopiert werden können. Diesen Vorgang der DNA-Kopierung nennt man *Re-*

plikation. Die Trennung der Doppelstränge, die durch eine grosse Zahl von Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, würde theoretisch hohe Temperaturen erfordern. Initiatorproteine können jedoch an den *Replikationsursprüngen* – dies sind AT-reiche DNA-Abschnitte – die beiden DNA-Stränge auch bei Raumtemperatur auf einer kurzen Strecke öffnen (Abbildung 1 ). Das menschliche Genom besitzt etwa 10 000 solche Replikationsursprünge, die bei Bedarf eine schnelle DNA-Replikation gewährleisten. Dort, wo sich die beiden DNA-Stränge Y-förmig trennen, spricht man von einer *Replikationsgabel*. An der Replikationsgabel trennt die Helicase die beiden DNA-Stränge entzwei. Von einem *Replikationsursprung* aus verdoppelt sich die DNA in beide Richtungen. Die Replikationsgeschwindigkeit beträgt etwa 100 Nukleotide pro Sekunde. Die Replikationsmaschine ist ein riesiger Molekülkomplex, der aus mehreren Enzymen (DNA-Polymerase, Nuklease, Ligase, Helicase, Primase) besteht (Abbildung 2 ). Das für die DNA-Replikation eigentlich zuständige Enzym ist die *DNA-Polymerase*. Sie benutzt jeweils den vorhandenen DNA-Strang als Gussform (*template*). Die *DNA-Polymerase* kann den neuen DNA-Strang aus biochemischen Gründen ausschliesslich am 3'-Ende durch Bindung eines energiereichen Desoxynucleosid-Triphosphates – unter Abspaltung eines Pyrophosphats – verlängern. In anderen Worten: DNA-Polymerasen können sich ausschliesslich in 3'-Richtung vorarbeiten, d.h., sie können nur vorhandene 3'-Enden verlängern (Abbildung 3 ). Das bedeutet einerseits, dass der eine DNA-Strang zwar fortlaufend, der andere Strang jedoch in rückwärts gerichteten, kleinen Fragmenten (benannt nach dem japanischen Entdecker dieser Fragmente: Okasaki) synthetisiert werden muss. Diese kleinen Fragmente sind in menschlichen Zellen etwa 200 Nukleotide lang. Andererseits muss die DNA-Polymerase ihre Arbeit immer an einem RNA-Primer beginnen, welcher von der sogenannten *Primase* unabhängig vom Vorliegen doppelsträngiger Nucleinsäuren synthetisiert wird. Übrigens: Ein Primer ist ein kurzes, zu einer bestimmten Sequenz komplementäres Nucleinsäurestückchen, das sich an DNA oder RNA anlagert und das vom entsprechenden Enzym verlängert werden kann. Es startet oder «primt» die Nucleinsäuresynthese. Fludarabin, ein bekanntes Chemotherapeutikum, hemmt die DNA-Replikation durch Verhinderung der Synthese von RNA-Primern. Ein RNA-Primer ist etwa 10 Nukleotide lang und wird von *DNA-Polymerase*

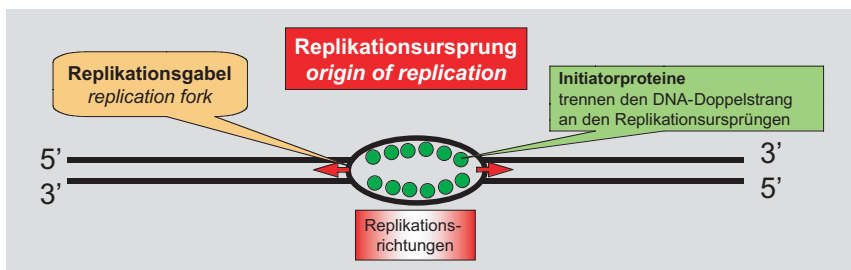


Abbildung 1.

DNA-Replikation in der eukaryonten Zelle ist ein multifokaler Prozess. Im menschlichen Genom existieren etwa 10 000 Replikationsursprünge. Diese DNA-Regionen zeichnen sich durch relativ niedrigere Bindungsenergie des Doppelstrangs aus. Sie enthalten relativ viele AT/TA-Paare, die (im Gegensatz zu den CG/GC-Paaren) nur durch 2 Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Initiatorproteine helfen mit, an den Replikationsursprüngen die DNA-Doppelstränge zu trennen.

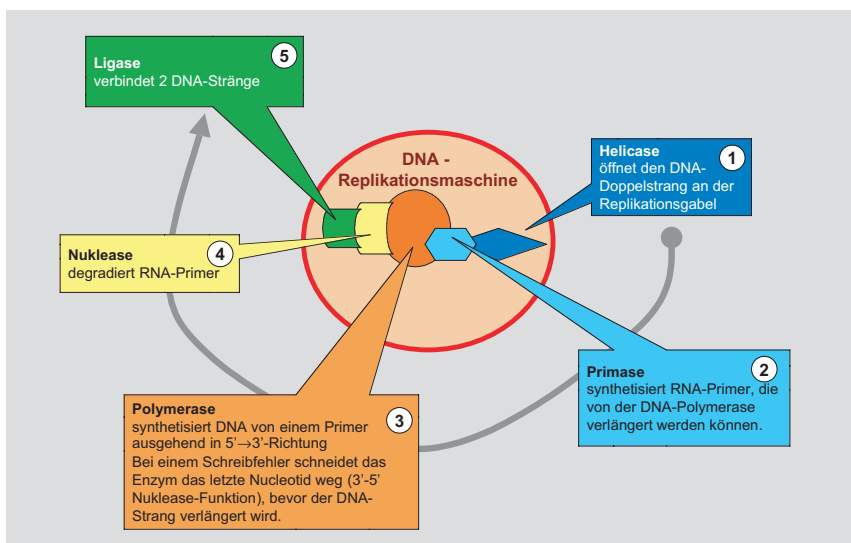
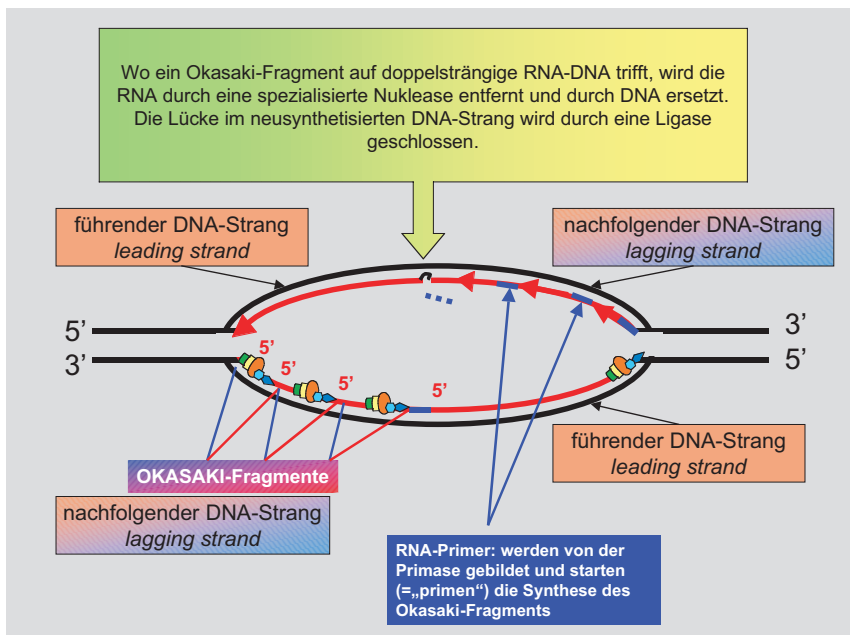


Abbildung 2.

Die DNA-Replikationsmaschinerie ist ein riesiger Multi-Enzymkomplex. Sie ist darauf spezialisiert, Doppelstrang-DNA fehlerfrei zu kopieren. Sie arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 100 Nukleotiden pro Sekunde und besitzt ein eingebautes Rechtschreibsystem (*proof reading*).

**Abbildung 3.**

DNA-Replikation erfolgt in 2 Richtungen und asymmetrisch. Die DNA-Polymerase muss an beiden DNA-Strängen in 5'-3'-Richtung arbeiten. Entlang des führenden DNA-Stranges (*leading strand*) erfolgt die DNA-Synthese natürlicherweise in 5'-3'-Richtung. Entlang des nachfolgenden Stranges (*lagging strand*) erfolgt die DNA-Synthese ausserordentlich umständlich mit Hilfe von (nach dem Erstbeschreiber benannten) Okasaki-Fragmenten.

solange verlängert, bis diese ans Ende des «template» kommt oder auf einen vor ihr liegenden RNA-Primer stösst. Eine *Nuklease* entfernt die suboptimal bindende, und v.a. die Doppelstranghelix-Konformation störende, RNA vom DNA-Strang. Die *DNA-Polymerase* synthetisiert ein kurzes, komplementäres DNA-Stück, welches

den RNA-Primer ersetzt, und eine *DNA-Ligase* verbindet die entstehende Lücke. *DNA-Polymerasen* besitzen eine sehr nützliche Rechtschreibfunktion: Ein neues Nucleotid wird erst dann mit dem neu synthetisierten DNA-Strang verbunden, wenn die letzte Nucleotidpaarung stimmt. Sonst erfolgt die Abspaltung des letzten Nucleotids (*DNA-Polymerasen* haben also auch 3'-5'-*Nuklease-Aktivität*) und der Syntheseschritt beginnt erneut mit der nicht kovalenten Bindung einer komplementären Base. Dank dieser Rechtschreibfunktion der DNA-Polymerase senkt sich die Fehlerrate der DNA-Replikation von 1:10⁷ (ohne Rechtschreibfunktion) auf 1:10⁹ Fehler. p53, ein wichtiges Qualitätskontrollprotein des Zellzyklus hat übrigens selber 3'-5'-Nuklease-Aktivität und verbessert so die Rechtschreibfunktion der DNA-Polymerase. Im Rahmen von p53-Mutationen, wie sie bei verschiedensten Tumoren (u.a. dem kleinzelligen Bronchuskarzinom) vorgefunden werden, geht diese Funktion verloren. Keimlinienmutationen, die die DNA-Replikationsmaschinerie in ihrer Funktion beeinträchtigen, sind in der Regel mit dem Leben nicht vereinbar, d.h. embryonal letal. Die klinischen Beispiele zeigen jedoch, dass erworbene Mutationen oft zur Tumorentstehung führen können und dass viele Chemotherapeutika mehr oder weniger gezielt an den Bestandteilen der DNA-Replikationsmaschine eingreifen.

Korrespondenz:

PD Dr. med. Barbara C. Biedermann
Medizinische Universitätsklinik
Kantonsspital
CH-4101 Bruderholz
barbara.biedermann@unibas.ch