

DNA-Synthese

in vivo und *in vitro*

Einführung

Replikation der DNA

- Entwindung der DNA
- Priming der DNA-Synthese
- Struktur und Funktion der DNA-Polymerase
- Synthese des Folgestranges
- Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

Vergleich der Replikation bei „genetischen Einheiten“, Prokaryoten und Eukaryoten

DNA-Synthese *in vitro*

Chemische Synthese von DNA

Chemische Synthese von vollständigen Genen

Durch *in vitro*-DNA-Synthese lässt sich die Basensequenz ermitteln

Die Polymerasekettenreaktion nutzt die *in vitro*-Synthese, um geringe DNA-Mengen zu vermehren

Die automatisierte Zyklussequenzierung verknüpft PCR und Sequenzierung

Modifikationen der PCR-Technologie

Zufällig vervielfältigte polymorphe DNA

Reverse-Transkriptase-PCR

PCR in der Gentechnik

Weiterführende Literatur

Einführung

Bei der Replikation wird die gesamte genomische DNA vollständig entwunden und genau kopiert, sodass sie bei der Zellteilung auf die zwei Tochterzellen verteilt werden kann. Dieser komplexe und ausgeklügelte Prozess läuft in *E. coli* sehr schnell ab, die DNA-Polymerase kopiert etwa 1000 Nucleotide pro Sekunde, und auch in Eukaryoten sind es pro Sekunde noch 50 Nucleotide. Da viele Anwendungen in der Biotechnologie auf den Prinzipien der Replikation beruhen, werden in diesem Kapitel zunächst die Grundlagen der DNA-Replikation, wie sie in der Zelle stattfindet, behandelt. Anschließend gehen wir auf einige der in Gentechnik und Biotechnologie am häufigsten verwendeten Methoden ein, bei denen die DNA-Polymerase eingesetzt wird. Dazu gehören die chemische Synthese von DNA, die Polymerasekettenreaktion und die Sequenzierung von DNA.

Replikation der DNA

Um die Integrität eines Organismus zu erhalten, muss das gesamte Genom sehr genau repliziert werden. Selbst für das Fortbestehen von „genetischen Einheiten“ wie Plasmiden, Viren oder Transposons ist die Replikation von großer Bedeutung. Ein Schlüssel zum Verständnis der Verdopplung während der Zellteilung ist die komplementäre, doppelsträngige DNA-Struktur. Die doppelsträngige Helix wird entwunden, die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen lösen sich, und es entstehen zwei einzelne DNA-Stränge. Der Y-förmige Bereich der DNA wird als **Replikationsgabel** bezeichnet (Abb. 4.1). Die Replikation beginnt an einer spezifischen Stelle auf einem Chromosom, dem **Replikationsursprung** (*ori*). Dieser Ursprung wird bei *E. coli* als *oriC* bezeichnet und umfasst auf der DNA etwa 245 bp. Er besteht hauptsächlich aus A-T-Basenpaaren, da für deren Trennung weniger Energie erforderlich ist, als für G-C-Basenpaare.

Ist die Replikationsgabel eingerichtet, schließt sich ein großer Komplex aus Enzymen und Faktoren zusammen und synthetisiert die komplementären DNA-Stränge (s. Abb. 4.1). Die **DNA-Polymerase** beginnt auf einer Seite der Gabel mit der Synthese des komplementären Stranges, indem sie komple-

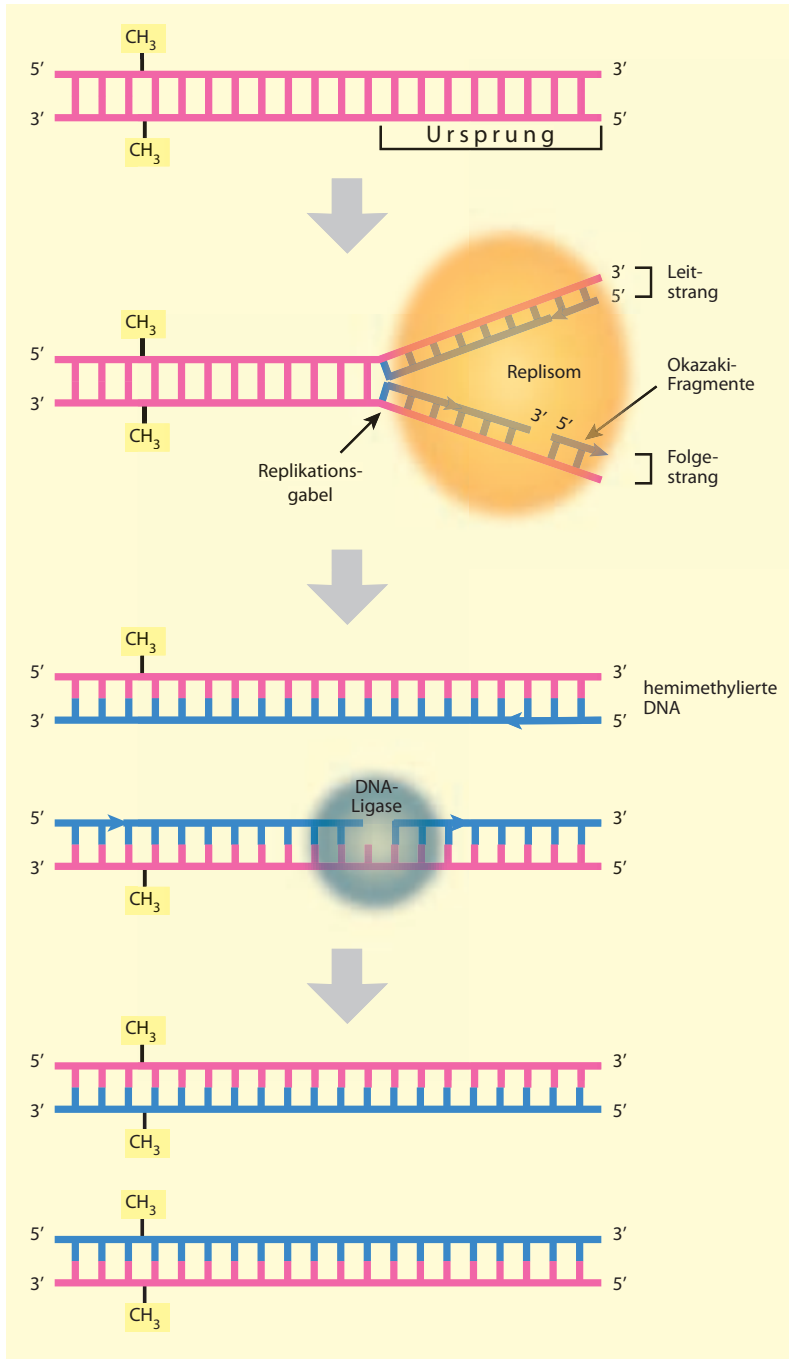
mentäre Nucleotide in 5'→3'-Richtung miteinander verknüpft. Dieser Strang, er wird als **Leitstrang** bezeichnet, wird kontinuierlich synthetisiert, da stets eine freie 3'-OH-Gruppe zur Verfügung steht, an die ein neues Nucleotid geknüpft werden kann. Weil die DNA-Polymerase nur in 5'→3'-Richtung synthetisieren kann, wird der andere Strang, der **Folgestrang**, in Form kleiner Fragmente (**Okazaki-Fragmente**) hergestellt. Die einzelnen Fragmente des Folgestranges werden durch das Enzym **DNA-Ligase** miteinander verbunden. Die Ligase verknüpft das 3'-OH mit dem 5'-PO₄ des benachbarten Nucleotids zu einer Phosphodiesterbindung. Der letzte Schritt ist die Anheftung von Methyl-(CH₃-)gruppen an den neuen Strang (s. unten). Ausgehend von der ursprünglichen doppelsträngigen Helix sind nun zwei identische doppelsträngige Helices entstanden, die jeweils einen Strang des Ausgangsmoleküls und einen neu synthetisierten Strang enthalten. Deshalb wird dieser Prozess auch als **semikonservative Replikation** bezeichnet.

Bei der Replikation synthetisiert die DNA-Polymerase den Leitstrang kontinuierlich, den Folgestrang jedoch in kleinen Okazaki-Fragmenten. Jede Kopie enthält einen Strang der ursprünglichen Helix und einen neu synthetisierten.

Entwindung der DNA

Da DNA in der Zelle superspiralisiert vorliegt, sind einige Enzyme notwendig, um die DNA zu öffnen und zu entspannen, bevor die Replikation beginnen kann (Abb. 4.2). **DNA-Helikase** und **DNA-Gyrase** heften sich nahe der Replikationsgabel an die DNA und entwinden die Stränge. Die DNA-Gyrase entfernt die Superspiralisierung und die Helikase entwindet die Doppelhelix, indem sie die Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basenpaaren löst. Die beiden Stränge werden durch **einzelstrangbindende Proteine** (SSB) getrennt gehalten. Beide Stränge lagern sich daher nicht wieder aneinander, sondern der Replikationsursprung wird für Enzyme zugänglich und die Replikation beginnt.

Die DNA-Polymerase wandert die DNA entlang und vor der Replikationsgabel entsteht eine positive Superspiralisierung. Da das bakterielle Chromosom negativ superspiralisiert ist, entspannt sich die DNA dadurch anfangs. Nachdem jedoch etwa 5 % des Ge-



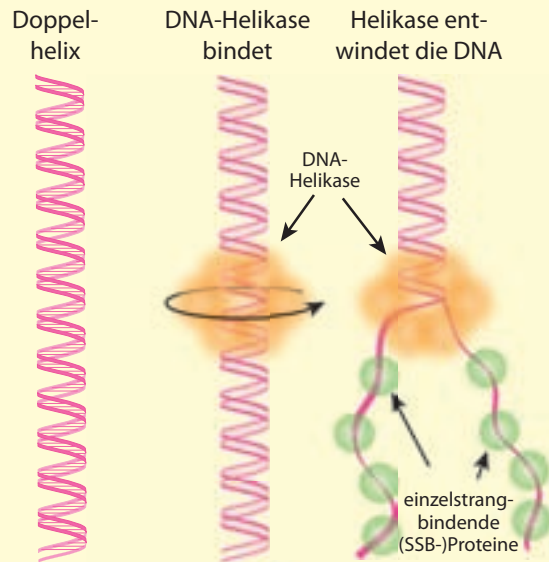
4.1 Replikation

Die Replikationsenzyme öffnen die Doppelhelix um den Replikationsursprung herum, sodass die DNA in diesem Bereich einzelsträngig wird. Die DNA-Polymerase fügt an jeden Strang in 5'→3'-Richtung komplementäre Nucleotide an; ein Strang wird daher kontinuierlich synthetisiert (Leitstrang), bei dem anderen Strang (Folgestrang) entstehen dagegen kurze Abschnitte, die man als Okazaki-Fragmente bezeichnet. Die DNA-Ligase schließt die Brüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat. Schließlich fügen Methylasen Methylgruppen an den neu synthetisierten Strang an.

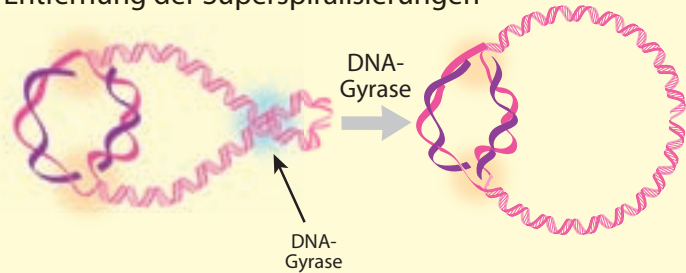
noms repliziert wurde, nimmt die positive Superspiralisierung überhand und muss entfernt werden. Diese Aufgabe übernimmt die DNA-Gyrase, indem sie negative Superspiralisierungen einfügt. Werden ringförmige Chromosomen repliziert, dann können die beiden DNA-Kopien **Catenane** bilden und wie

die Glieder einer Kette miteinander verbunden sein. Das Enzym Topoisomerase IV beseitigt diese Strukturen, indem sie bei einem der Chromosomen Brüche in den Doppelstrang einfügt. Die zweite Kopie kann dann durch die erste gleiten und die Moleküle sind voneinander getrennt.

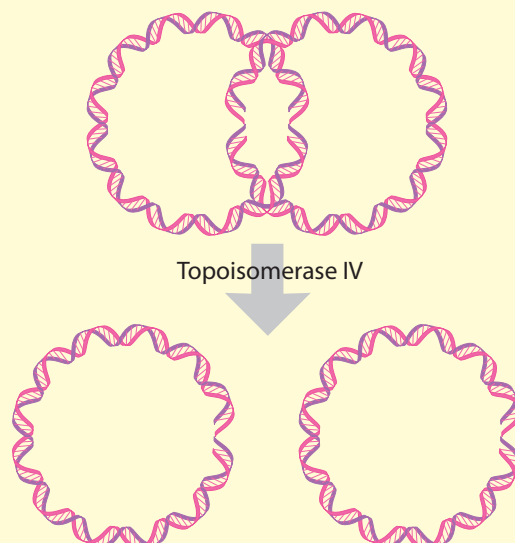
a Öffnen der DNA am Replikationsursprung



b Entfernung der Superspiralisierungen



c Entwirrung der Chromosomen



4.2 Entwindung der DNA

a Öffnen des Replikationsursprungs. Helikasen binden an die DNA und brechen die Wasserstoffbrücken auf, die die beiden Stränge zusammenhalten. Anschließend binden SSBs an die freiliegenden Stränge und verhindern so, dass sie sich wieder aneinanderlagern. **b** Entfernen der Superspiralisierung. Damit die Replikationsenzyme an dem ganzen Chromosom entlanggleiten können, muss die DNA-Gyrase die Superspiralisierung beseitigen. **c** Entwirren der Chromosomen. Nachdem die Replikation von ringförmigen Chromosomen abgeschlossen ist, sind die beiden Tochterringe gelegentlich wie die Glieder einer Kette miteinander verbunden. Die Topoisomerase IV entwirrt die beiden Chromosomen, damit sie auf die Tochterzellen aufgeteilt werden können.

DNA-Helikase, DNA-Gyrase und Topoisomerase IV entwinden und entwirren die superspiralisierte DNA während der Replikation.

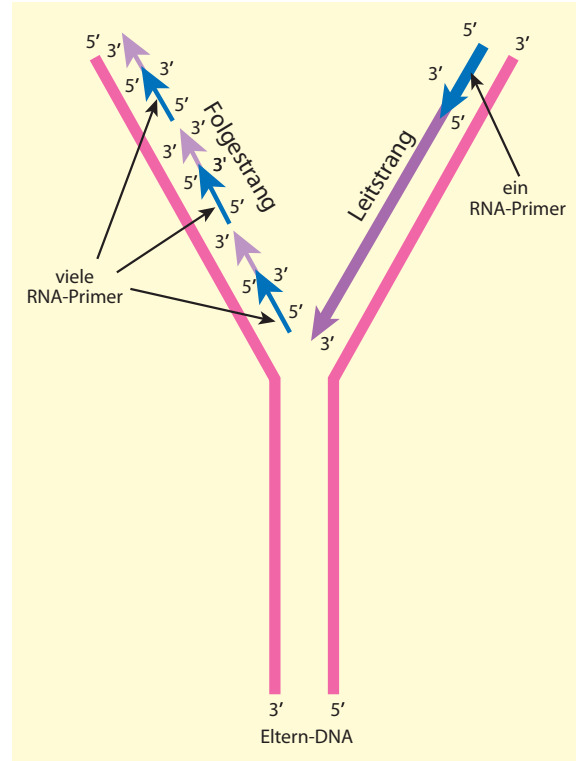
Priming der DNA-Synthese

An dem geöffneten Replikationsursprung wird das **Replisom** zusammengesetzt. Es enthält die Enzyme für die Synthese des Leit- und Folgestranges sowie die Helikase und die SSB-Proteine. Im Gegensatz zur RNA-Polymerase benötigt die DNA-Polymerase eine 3'-OH-Gruppe, an die die neuen Nucleotide angefügt werden können; die DNA-Polymerase verlängert einen Nucleinsäurestrang, beginnt aber nicht neu mit der Synthese. Aus diesem Grund wird zunächst ein 10 bis 12 bp langer RNA-Primer synthetisiert, von dem ausgehend die DNA-Polymerase den DNA-Strang herstellt. Am Replikationsursprung ersetzt ein Protein namens **PriA** die SSB-Proteine, sodass eine spezielle RNA-Polymerase, die **Primase** (DnaG), hinzutreten und Ribonucleotide zu einem kurzen RNA-Primer verknüpfen kann. Die Primase synthetisiert am Ursprung einen einzelnen Primer für den Leitstrang, für den Folgestrang stellt das Enzym dagegen viele Primer her. Nun binden zwei Moleküle DNA-Polymerase III an die Primer des Leit- und Folgestranges und synthetisieren ausgehend von den 3'-OH-Gruppen neue DNA (Abb. 4.3).

Primase, eine spezielle RNA-Polymerase, entfernt mithilfe von PriA die SSB-Proteine und synthetisiert am Replikationsursprung einen kurzen RNA-Primer. Die DNA-Polymerase beginnt anschließend, ausgehend von der 3'-OH-Gruppe des Primers, mit der Synthese des neuen DNA-Stranges. Für die Synthese des Folgestranges wiederholt sich dieser Ablauf vielfach.

Struktur und Funktion der DNA-Polymerase

Die **DNA-Polymerase III (PolIII)** ist die wichtigste DNA-Polymerase, sie ist bei der Replikation des bakteriellen Chromosoms aktiv. Das Enzym besteht aus mehreren Untereinheiten (Abb. 4.4). Die **Gleitkammer** ist ein ringförmiges Protein, das aus ei-



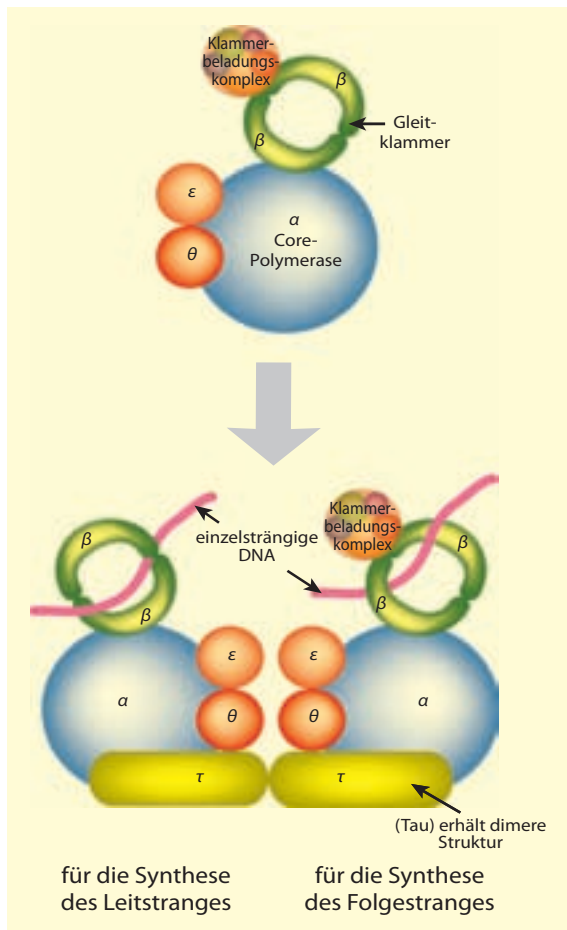
4.3 Die Strangsynthese erfordert einen RNA-Primer

Die DNA-Polymerase kann nicht ohne eine freie 3'-OH-Gruppe mit der Synthese eines neuen DNA-Stranges beginnen. Die DNA-Replikation erfordert daher die Synthese eines RNA-Primers, damit die Strangsynthese beginnen kann. Für den Leitstrang ist ein RNA-Primer notwendig, für den Folgestrang sind es viele.

nem Dimer aus DnaN-Proteinen besteht. An der Replikationsgabel legt sich mithilfe eines Clusters aus Hilfsproteinen, des **Klammerbeladungskomplexes**, je eine Klammer um einen DNA-Strang. Die beiden Gleitklammern binden an die beiden Core-Enzyme, von denen sich auf jedem DNA-Strang eines befindet. Ein **Core-Enzym** besteht aus drei Untereinheiten: DnaE (α -Untereinheit), das die Nucleotide miteinander verknüpft, DnaQ (ϵ -Untereinheit), das die Korrekturlesefunktion übernimmt, und HolE (θ -Untereinheit) mit unbekannter Funktion. Beginnt die α -Untereinheit mit dem Verknüpfen der Nucleotide, dann erkennt die ϵ -Untereinheit die bei einer möglichen Fehlpaarung entstehenden Spannungen und entfernt die fehlgepaarte Base. Anschließend wird ein passendes Nucleotid eingefügt. Die DNA-Polymerase III aus Bakterien kann bis zu 1000 bp

pro Sekunde polymerisieren und besitzt daher eine außerordentlich hohe Enzymaktivität.

Die vielen Untereinheiten der DNA-Polymerase III arbeiten bei der Synthese eines neuen DNA-Stranges zusammen. Das Core-Enzym besteht aus zwei essenziellen Untereinheiten: der α -Untereinheit, die die Nucleotide miteinander verknüpft, und der ϵ -Untereinheit, die sicherstellt, dass die Verknüpfung korrekt ist.

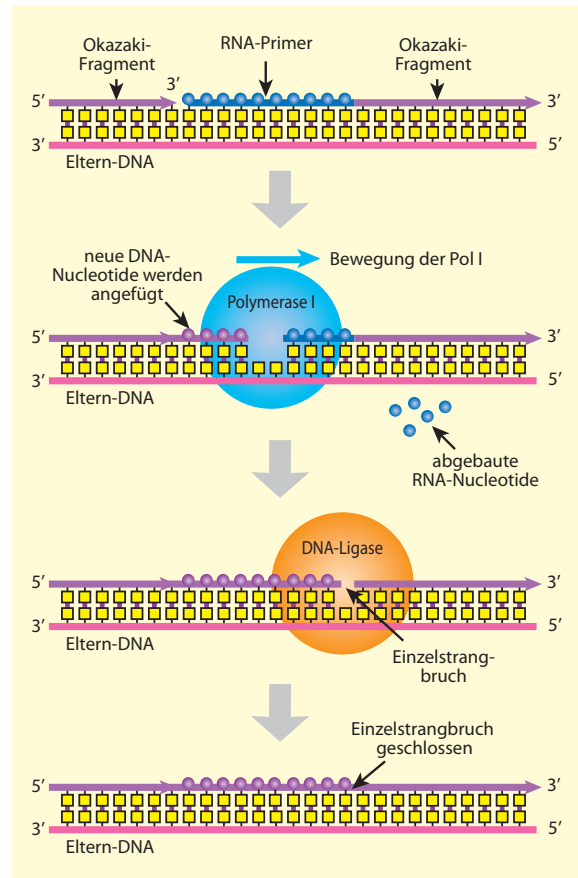


4.4 DNA-Polymerase III – der Zusammenbau der Untereinheiten

Im oberen Teil der Abbildung ist eine einzelne Core-Untereinheit dargestellt, der untere Teil zeigt, wie sich diese Einheit mit einer weiteren Untereinheit zu einem Dimer zusammensetzt. Die dimere Untereinheit enthält nur einen Klammerbeladungskomplex, der mit der Syntheseeinheit für den Folgestrang verbunden ist. Die beiden Core-Proteine werden durch die τ -Untereinheit miteinander verbunden.

Synthese des Folgestranges

Unmittelbar nach der Synthese des neuen Folgestranges ist dieser von vielen RNA-Abschnitten, den ehemaligen RNA-Primern, unterbrochen und es finden sich viele **Einzelstrangbrüche** entlang des Rückgrats, die geschlossen werden müssen (Abb. 4.5). Eine Möglichkeit ist, dass die RNaseH die RNA-Primer aus dem Folgestrang entfernt und die DNA-Polymerase I diese Bereiche mit einzelsträngiger DNA auffüllt. Alternativ kann die DNA-Polymerase I die RNA-Primer auch an den Einzelstrangbrüchen erkennen und dann den Bereich etwa 10 Nucleotide stromabwärts



4.5 Verknüpfung der Okazaki-Fragmente

Direkt nach der Synthese besteht der Folgestrang aus einer Reihe von sich abwechselnden Okazaki-Fragmenten und RNA-Primern. Nun bindet die DNA-Polymerase I an die Primerregion, beginnt an der DNA entlang zu wandern, baut dabei die RNA ab und ersetzt sie durch DNA. Nun schließt die DNA-Ligase die Einzelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat.

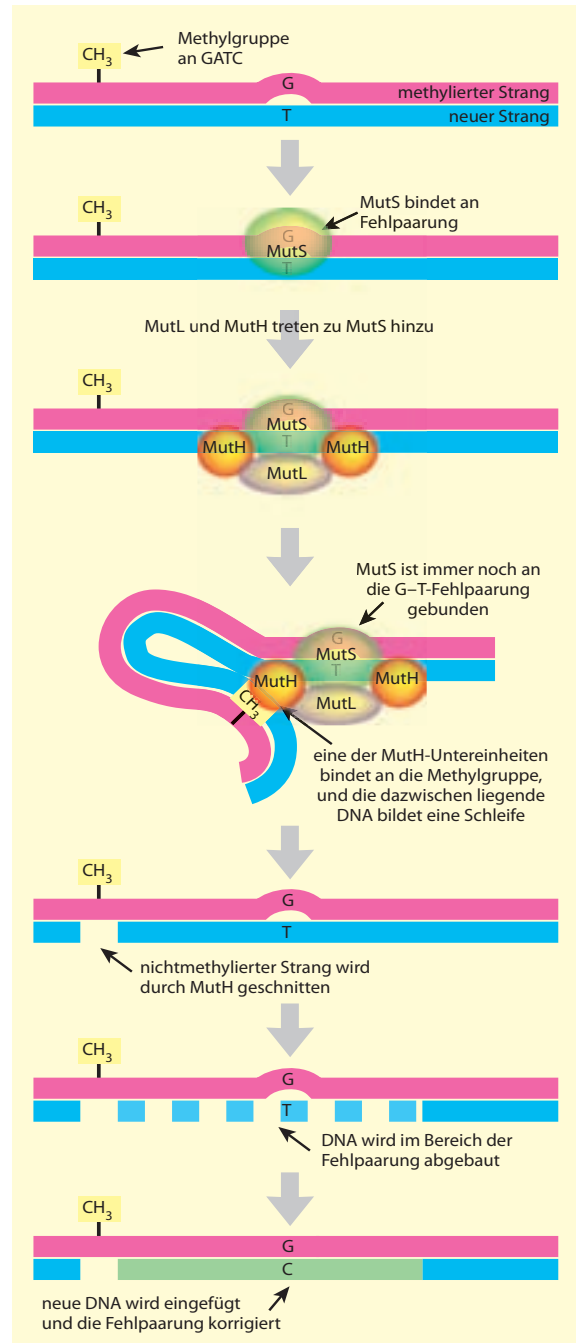
des Bruches durch DNA ersetzen. Anschließend werden die DNA-Fragmente des Folgestranges durch eine von der DNA-Ligase katalysierte Ligrationsreaktion miteinander verbunden. Sowohl die DNA-Polymerase I als auch die DNA-Ligase sind wichtige Enzyme in der Molekularbiologie und werden in der Biotechnologie häufig verwendet.

Da der Folgestrang in kleinen Stücken synthetisiert wird, müssen entweder DNA-Polymerase I oder RNaseH die vielen RNA-Primer-Bereiche ausschneiden und durch DNA ersetzen. Die DNA-Ligase schließt dann die Einzelstrangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat des neuen DNA-Stranges.

Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

Nachdem die Replikation abgeschlossen ist, korrigiert das **Fehlpaarungsreparatursystem** Fehler der DNA-Polymerase. Wurde eine falsche Base eingebaut und hat die DNA-Polymerase den Schaden nicht selbst beseitigt, bildet sich an dieser Stelle der Helix eine kleine Auswölbung. Doch welche der beiden gegenüberliegenden Basen ist korrekt und welche wurde falsch eingebaut? Naheliegender ist, dass die Base im neuen Strang falsch ist, während es sich bei der Base im Elternstrang um die richtige handelt. Das Fehlpaarungsreparatursystem von *E. coli* (MutSHL) erkennt den Originalstrang anhand der Methylierung. Unmittelbar nach der Replikation ist die DNA **hemimethyliert**, d.h., der alte Strang besitzt Methylgruppen, die an verschiedene Basen geheftet sind, doch der neue Strang wurde noch nicht methyliert (s. Abb. 4.1). Einige dieser Methylgruppen schützen gegen Restriktionsenzyme, die von Bakterien synthetisiert werden (s. Kap. 3), andere kennzeichnen den Elternstrang der DNA. Für die Anheftung des zweiten Typs von Methylgruppen sind in *E. coli* zwei Enzyme verantwortlich: **DNA-Adenin-Methylase (Dam)** verknüpft Methylgruppen mit dem Adenin in der Sequenz GATC, und **DNA-Cytosin-Methylase (Dcm)** hängt eine Methylgruppe an das Cytosin in CCAGG oder CCTGG. Diese Enzyme methylieren den neuen Strang nach der Replikation, doch sie sind langsam. Dadurch bleibt dem Reparatursystem ausreichend Zeit, die Fehler zu finden und zu reparieren.

Drei Gene von *E. coli* sind für die Fehlpaarungsreparatur zuständig: *mutS*, *mutL* und *mutH* (Abb. 4.6).



4.6 Fehlpaarungsreparatur nach der Replikation

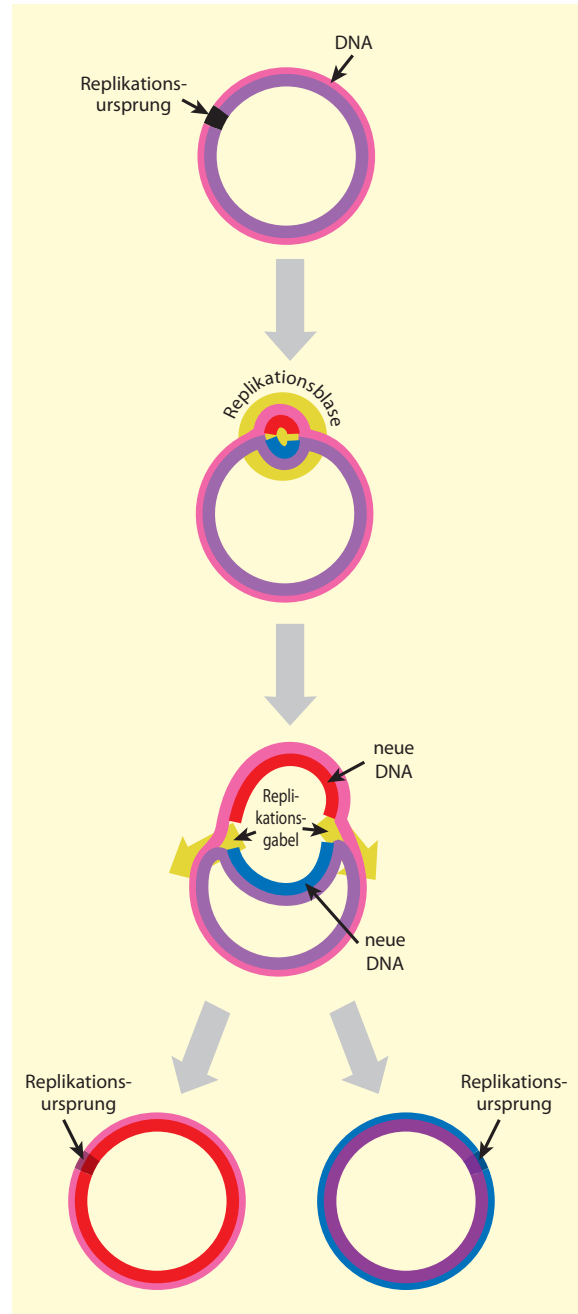
MutS erkennt kurz nach der DNA-Replikation einen Fehler in der Basenpaarung. MutS lenkt das MutL- und zwei MutH-Proteine zu der Stelle mit der Fehlpaarung. MutH erkennt das am nächsten gelegene GATC des neuen Stranges an der Methylgruppe, die an den Elternstrang geheftet ist. MutH schneidet den nichtmethylierten Strang und die DNA zwischen dem Schnitt und der Fehlpaarung wird abgebaut. Der Bereich wird ersetzt und der Fehler ist korrigiert.

Das MutS-Protein erkennt die Auswölbung oder Spannung in der Struktur. MutH findet die nächste GATC-Sequenz und fügt einen Einzelstrangbruch in den nichtmethylierten, d.h. neu synthetisierten Strang ein. MutL bringt MutS (mit der Fehlpaarungsstelle) und MutH (mit GATC), die weit voneinander entfernt liegen können, in eine räumliche Nähe. Schließlich wird die DNA des neuen Stranges von der DNA-Polymerase III abgebaut und durch die korrekte Sequenz ersetzt.

In *E. coli* erkennen die für die Fehlpaarungsreparatur verantwortlichen Proteine (MutSHL) eine bei der Replikation entstandene fehlerhafte Basenpaarung. Sie schneiden die neuen Nucleotide um diese Fehlpaarungsstelle herum aus und dirigieren die DNA-Polymerase III zu der nun einzelsträngigen Region, damit ein neuer, korrekter Strang synthetisiert werden kann.

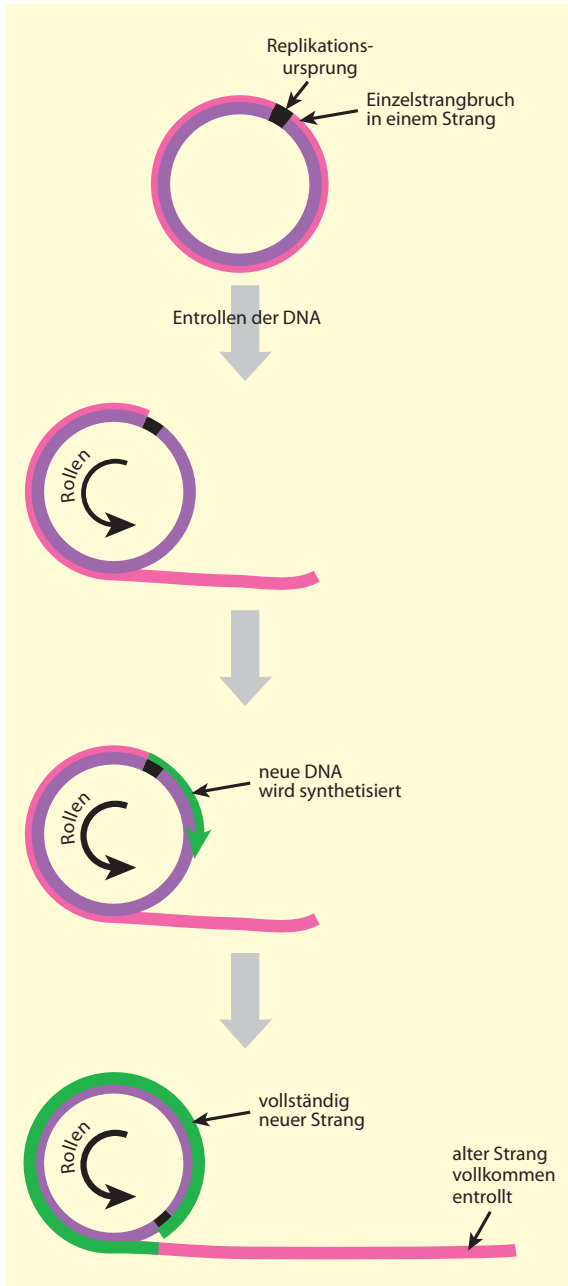
Vergleich der Replikation bei „genetischen Einheiten“, Prokaryoten und Eukaryoten

Obwohl der grundlegende Mechanismus der Replikation bei den meisten Organismen gleich ist, sind der Zeitpunkt, die Richtung und die Stellen für Initiation und Termination doch sehr variabel. Die wesentlichen Unterschiede bei der Replikation ergeben sich hauptsächlich aufgrund der ringförmigen bzw. linearen Struktur des Genoms. Normalerweise ist die DNA-Replikation in Pro- und Eukaryoten bidirektional, unabhängig davon, ob das Genom linear oder ringförmig ist. Die beiden Replikationsgabeln wandern in entgegengesetzte Richtungen und entwinden dabei die DNA. In Bakterien wie *E. coli* gibt es nur einen Replikationsursprung, *oriC*. Die Replikation findet entlang des ringförmigen Chromosoms in beide Richtungen statt, bis sich die Gabeln auf der gegenüberliegenden Seite des Chromosoms, dem Terminus (*terC*) treffen. Ist die Hälfte des Chromosoms repliziert, ähnelt die Struktur dem griechischen Buchstaben θ , weshalb diese Art der Replikation auch als **θ -(theta)-Replikation** bezeichnet wird (Abb. 4.7). Aus dem einen ringförmigen Chromosom sind schließlich zwei Moleküle entstanden. Die θ -Replikation kommt auch bei vielen Plasmiden vor, wie dem F-Plasmid von *E. coli*, wenn die Zel-



4.7 θ -Replikation

In ringförmigen Genomen oder Plasmiden erkennen die Replikationsenzyme den Replikationsursprung, entwinden die DNA und die Synthese von zwei neuen DNA-Strängen beginnt, wobei in jede Richtung ein Strang synthetisiert wird. Es entsteht eine Replikationsblase, die dem Chromosom oder Plasmid eine Ähnlichkeit mit dem griechischen Buchstaben θ (theta) verleiht. Die beiden Replikationsgabeln wandern den Ring entlang, bis sie an der gegenüberliegenden Seite aufeinander treffen.



4.8 Rolling circle-Replikation

Bei der *rolling circle*-Replikation wird in einen Strang des Plasmids oder der viralen DNA ein Bruch eingefügt und der gespaltene Strang (rosa) trennt sich vom ringförmig geschlossenen Strang (violett). Die Lücke, die bei dieser Trennung zurückbleibt, wird nun mit neuer DNA (grün) gefüllt, deren Synthese am Replikationsursprung beginnt. Die neu synthetisierte DNA ersetzt fortlaufend den linearen Strang, bis der zu einem Ring geschlossene Strang komplett repliziert ist. Der lineare Einzelstrang wird bei diesem Prozess vollständig „abgerollt“.

len asexuell wachsen und sich teilen (im Gegensatz zur Übertragung des Genoms auf eine andere Zelle durch Konjugation).

Einige Plasmide und viele Viren replizieren ihre Genome durch einen Prozess, den man als **rolling circle-Replikation** bezeichnet (Abb. 4.8). Am Replikationsursprung wird einer der beiden DNA-Stränge gespalten und abgerollt. Die DNA wird ausgehend vom Replikationsursprung synthetisiert. Der ringförmige Strang dient der DNA-Polymerase als Matrize, wenn das Enzym an diesem Strang entlang wandert. Währenddessen ragt der andere Elternstrang frei in das Cytoplasma, wird entfernt, zu einem neuen Ring geschlossen und schließlich ein zweiter Strang synthetisiert. Dadurch entstehen zwei Ringe aus Plasmid- oder viraler DNA, jeder besteht aus einem ursprünglichen und einem neu synthetisierten DNA-Strang.

Die *rolling circle*-Replikation kommt bei einigen viralen Genomen vor. Die Replikation ist jedoch nicht nach einer Runde beendet, sondern der Ring wird fortlaufend umkreist, und es werden mehr und mehr Kopien synthetisiert, die alle aneinander hängen und als Einzelstrang im Cytoplasma liegen. Der lange Strang neuer DNA kann, abhängig von dem Virustyp, zu einem Doppelstrang vervollständigt werden oder einzelsträngig bleiben. Schließlich wird der freie Strang zu Einheiten in Genomgröße zerschnitten und in Viruspartikel verpackt. Einige Viren schließen diese Kopien vor der Verpackung zu einem Ring, andere lassen sie linear.

Besonders problematisch ist die Replikation von längeren linearen DNA-Molekülen wie den Chromosomen des Menschen. Insbesondere die Enden sind schwierig zu replizieren, weil sich an den Chromosomenenden RNA-Primer befinden. Wird der Primer durch eine Exonuclease (MF1) entfernt, dann gibt es kein stromaufwärts liegendes freies 3'-OH-Ende, an das neue Nucleotide angefügt werden können, um die Lücke zu schließen. (In Eukaryoten gibt es keine Entsprechung zur DNA-Polymerase I mit ihrer Doppelfunktion. Eine unabhängige Exonuclease, MF1, entfernt die RNA-Primer und die DNA-Polymerase δ füllt die Lücken.) Über viele Replikationsrunden hinweg verkürzen sich die Enden der linearen Chromosomen immer weiter. An den Enden jedes linearen Chromosoms befinden sich spezielle Strukturen, die man als **Telomere** bezeichnet und die verhindern, dass sich die Verkürzung der Chromosomen auf wichtige Gene auswirkt. Telomere bestehen aus vielen Tandemwiederholungen einer kurzen Sequenz (beim Menschen

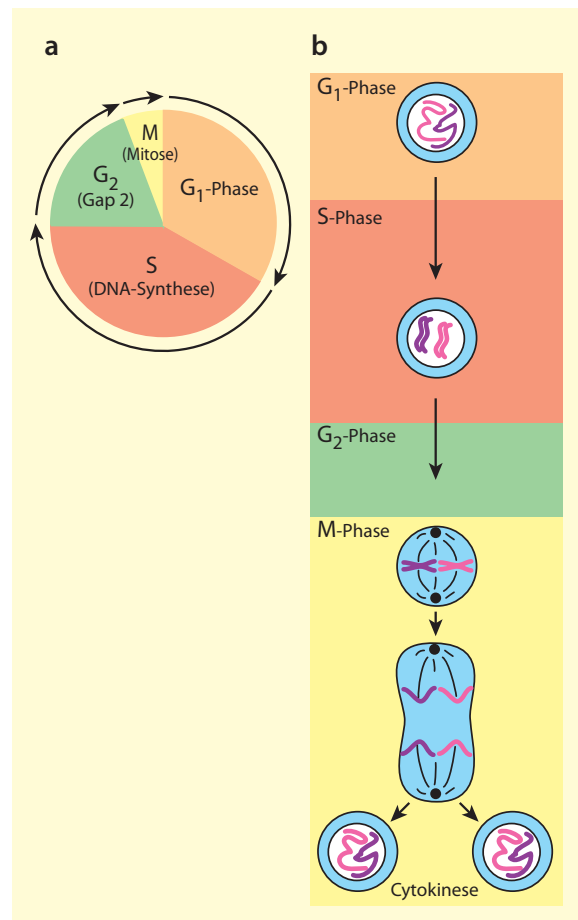
TTAGGG). Das Enzym **Telomerase** vermag die Telomere zu regenerieren, indem es eine RNA-Matrize für die Synthese neuer Sequenzwiederholungen nutzt. Dieses geschieht nur in einigen Zellen; in anderen verkürzen sich die Telomere jedes Mal, wenn die Zelle ihre DNA repliziert. Eine Theorie geht davon aus, dass die Telomerverkürzung eine molekulare Uhr ist, die das Alter der Zelle registriert und schließlich einen Selbstmord der Zelle auslöst (s. Kap. 20).

Die Länge der linearen Chromosomen stellt ebenfalls ein Problem dar. Die Zeit, die die Synthese eines ganzen menschlichen Chromosoms in Anspruch nehmen würde, wäre zu lang, würde die Replikation nur an einem einzigen Ursprung beginnen. Um dieses Problem zu lösen, gibt es viele Replikationsursprünge, und von jedem geht die Replikation in beide Richtungen aus. Die Stränge werden synthetisiert, bis sie auf einen neuen, in die andere Richtung synthetisierten Strang treffen.

Auch die Zellstruktur von Eukaryoten wirft einige Probleme für die Replikation auf. (In Bakterien wird das Chromosom einfach repliziert, die beiden Kopien wandern an die Zellpole, und in der Mitte wird eine neue Zellwand eingezogen. Weder Kernmembranen noch Organellen, die sich teilen müssten, sind vorhanden; es gibt nur das Chromosom und möglicherweise ein paar Plasmide.) In Eukaryoten existiert dagegen ein spezifischer **Zellzyklus** mit vier Phasen, die Replikation findet nur während einer bestimmten Phase statt (Abb. 4.9). Die G_1 -Phase ist die Phase vor der DNA-Synthese. Sie ist unterschiedlich lang und beträgt für Hefe etwa 25 Minuten. Die nächste Phase ist die S- oder Synthesephase, in der das gesamte Genom repliziert wird. Diese Phase ist in der Regel am längsten und dauert in Hefe etwa 40 Minuten. Es folgt die dritte Phase, die G_2 -Phase, eine weitere Ruhephase vor der Mitose, der M-Phase. Während der Mitose teilt die Zelle ihre Zellwand und die Membranen auf zwei separate Zellen auf, und auch die neuen Chromosomen und die anderen Zellkomponenten werden auf die beiden Tochterzellen verteilt. Das Signal für die Zellteilung ist von vielen Faktoren wie Umgebung, Größe und Alter abhängig; vieles ist noch unbekannt.

Die eukaryotische Mitose ist ein dynamischer Prozess, bei dem sich zelluläre Komponenten an neue Positionen in der Zelle bewegen. Bevor sich die Chromosomen nach der Replikation trennen und zu den entgegengesetzten Zellpolen wandern können, muss sich die Kernmembran auflösen. Die Chromo-

somen sind über spezifische Sequenzen, die man als **Centromere** bezeichnet, an lange Fasern gebunden, die die **Spindel** bilden. Die Centromere gleiten die Spindelfasern entlang bis sie die Zellpole erreichen. Und auch andere Zellkomponenten wie Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum, Lysosomen usw. werden zwischen den Tochterzellen aufgeteilt. Schließlich bildet sich eine neue Kernmembran um die Chromosomen jeder Tochterzelle. Die Dynamik dieses Prozesses wird immer noch untersucht und man findet immer noch neue Proteine und Moleküle, die in den unterschiedlichen Phasen der Mitose eine Rolle spielen.



4.9 Der eukaryotische Zellzyklus

Die DNA-Replikation findet während der S-Phase des Zellzyklus statt, doch die Chromosomen werden zu einem späteren Zeitpunkt, während der M- oder Mitosephase, voneinander getrennt. Zwischen S- und M-Phase liegen G_1 und G_2 .



<http://www.springer.com/978-3-8274-2128-9>

Molekulare Biotechnologie
Grundlagen und Anwendungen
Clark, D.; Pazdernik, N.
2009, XIII, 707 S., Hardcover
ISBN: 978-3-8274-2128-9