

1. Notwendigkeit der Replikation der DNA vor der Zellteilung

Da jede Tochterzelle die gesamte Erbinformation erhält, muss sich vor der Zellteilung das Erbmaterial verdoppeln:

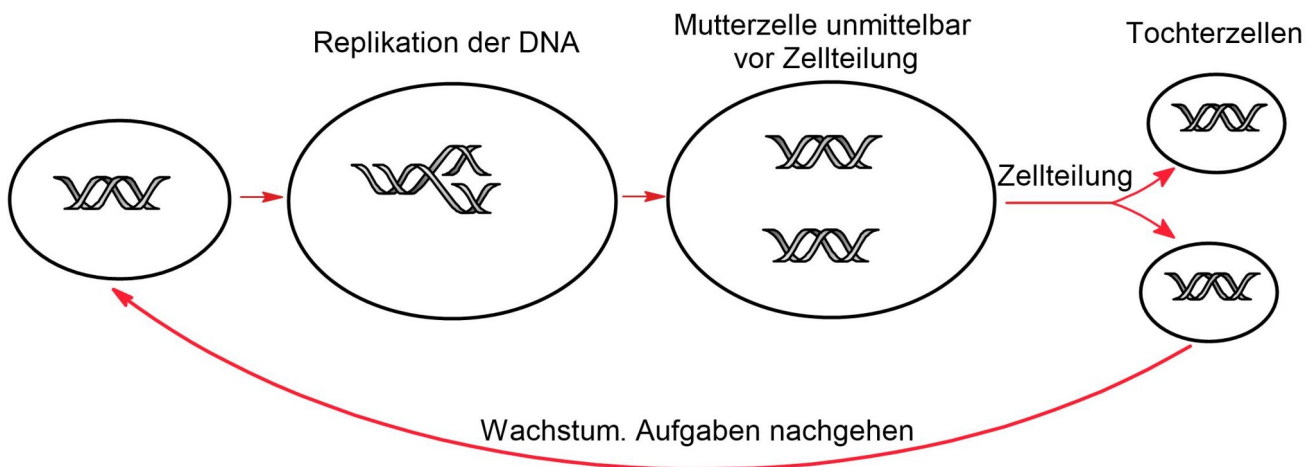


Abb. 1.1: Notwendigkeit der Replikation vor der Zellteilung. In der Realität besitzen nahezu alle Eukaryonten viele DNA-Stränge ($\hat{=}$ Chromosomenanzahl). Archaeen und Bakterien haben ringförmig geschlossene DNA. Q: eW

2. Die Entdeckung des Mechanismus der DNA-Replikation: Der MESELSON-STAHN-Versuch

Wieder war es ein Schlüsselexperiment, das unseren Horizont sprunghaft erweiterte. Schon 1958 entdeckten MATTHEW MESELSON und FRANKLIN STAHL über einen relativ einfachen, aber in seinen Schlussfolgerungen weitreichenden Versuch, den Mechanismus der Verdoppelung der Erbinformation. Für die Verdoppelung der DNA kamen theoretisch 3 verschiedene Mechanismen in Betracht:

- Bei der **konservativen Replikation** bleibt die Mutter-DNA vollständig erhalten und die Kopien ihrer beiden Einzelstränge setzen sich zu einem neuen Doppelstrang zusammen.
- Bei der **semikonservativen Replikation** bleibt die Mutter-DNA in jedem Tochter-Molekül zur Hälfte erhalten. Die andere Hälfte wird neu ergänzt.
- Die **disperse Replikation** verläuft im Prinzip ähnlich, auch hier bleibt in jeder Tochter-DNA die Hälfte der Mutter-DNA erhalten, die andere Hälfte wird durch neue Nukleotide ersetzt. Allerdings ist der Ersetzungsmechanismus ein völlig anderer – denn die Nukleotide der Mutter-DNA wechseln sich hierbei mit den neu hinzukommenden Nukleotiden ab.

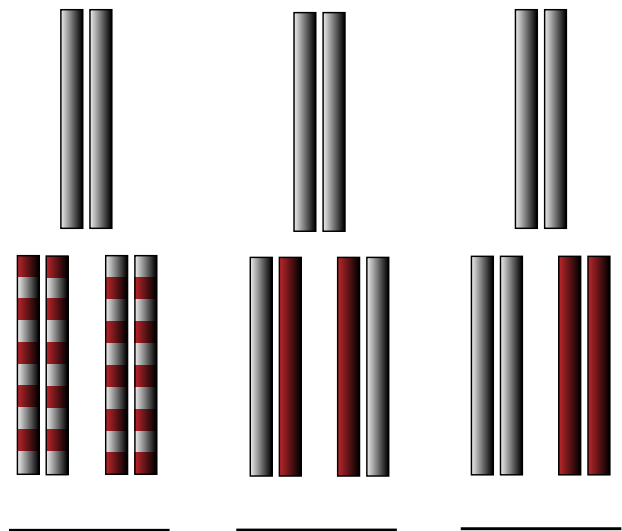


Abb. 2.1: Repl.mechanismen Q: wikicommons. A: Fleshgrinder (veränd).

2.1 Ordnen Sie in Abb. 2.1 die drei Begriffe zu.

Mit folgendem Versuch klärten MESELSON und STAHL den Mechanismus der Replikation:

- Sie züchteten zunächst Bakterien auf einem Nährmedium, welches ausschließlich ein Stickstoffisotop mit einer Massenzahl von 15 enthielt. Dieses wurde dann von den Bakterien in ihre DNA integriert.
- Anschließend wurden Bakterien dieses Stammes auf ein Nährmedium aufgebracht, welches Stickstoff mit einer Massenzahl von 14 enthielt.
- Nach 20 Minuten wurden dann Bakterien der ersten Nachfolgegeneration (F1-Generation) entnommen und ihr Erbgut einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Es zeigte sich, dass sich eine Sedimentationsebene der Bakterien-DNA bildete, die genau zwischen den Referenzebenen von DNA, die ausschließlich 14 bzw. 15 u Stickstoff enthielt, lag (vgl. Abb. 2.2).

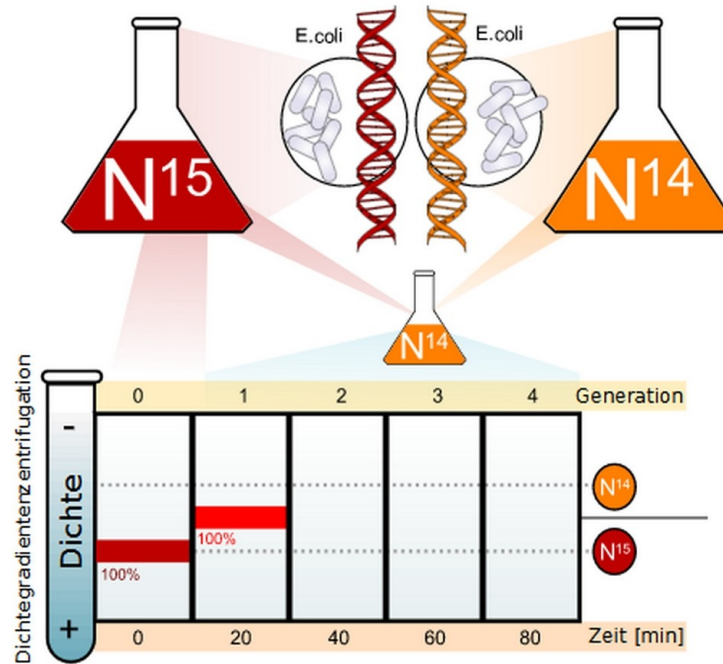


Abb. 2.2: Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation. Quelle: Commons Wikimedia. Autor: LadyOfHats/Matthias M. (veränd.)

2.2 Welche Schlussfolgerungen kann man hieraus ziehen?

-
-
-

Um entscheiden zu können, welche der beiden übrigen Hypothesen richtig sei, wurde der Vorgang mit Individuen der F2-Generation wiederholt, d.h. Bakterien der F1-Generation auf ein neues N14-Nährmedium überimpft. Dabei ergab sich, dass die aus den Bakterien isolierte DNA zur Hälfte in der Ebene der F1-Generation und zur Hälfte in der N14-Referenzebene sedimentierte.

2.3 Ergänzen Sie die Abb. 2.2 entsprechend. Mit welchen verbleibenden Replikationsmechanismen lässt sich dieses Ergebnis vereinbaren? Begründen Sie!

-
-
-
-

Um die Frage endgültig zu beantworten, erhitzen MESELSON und STAHL die DNA der F1-Generation im Medium der Dichtegradientenzentrifuge für 30 min auf 100 °C wodurch die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgespalten wurde. Anschließend wurde erneut eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

2.4 Welches Ergebnis würde man bei der a) semikonservativen und b) bei der dispersen Replikation erwarten?

-
-

In der Dichtegradientenzentrifugation zeigten sich nun zwei Banden die mit den Banden erhitzter reiner N15- bzw. N14-DNA übereinstimmen.

2.5 Welche Banden erwarte man bei der F3- und F4-Generation? Ergänzen Sie das Ergebnis in Abb. 2.2.

3. Der genaue Ablauf der DNA-Replikation

3.1 Initiation: Die einleitenden Vorgänge, die eine Synthese des Tochterstrangs erst ermöglichen

3.1 Beschriften Sie den rechten Teil der Abbildung mit den hervorgehobenen Begriffen.

Im ersten Schritt wird die DNA durch das Enzym **Topoisomerase** am jeweiligen Replikationsursprung entwunden. Dann kann der Doppelstrang durch das Enzym **Helikase** durch Lösen der Wasserstoffbrücken in zwei Einzelstränge gespalten werden. Es entsteht eine Replikationsgabel.

Prinzipiell läuft die Replikation bei den Prokaryoten und Eukaryoten gleichartig ab. Es gibt einige wichtige Unterschiede:

- **Prokaryoten und Zellorganell-DNA:** Da hier die DNA relativ kurz und wenig verdichtet ist, gibt es nur einen einzigen Startpunkt für die Replikation (Replikationsursprung).
- **Eukaryoten:** Da hier die DNA größer und stärker verdichtet ist, würde die Replikation sehr lange dauern. Deshalb wird an **vielen Stellen** gleichzeitig repliziert. Menschliche DNA besitzt sehr viele (ca. 50.000) Replikationsursprünge, ein bestimmter Anteil davon, scheint aber weniger aktiv zu sein und selten genutzt zu werden.

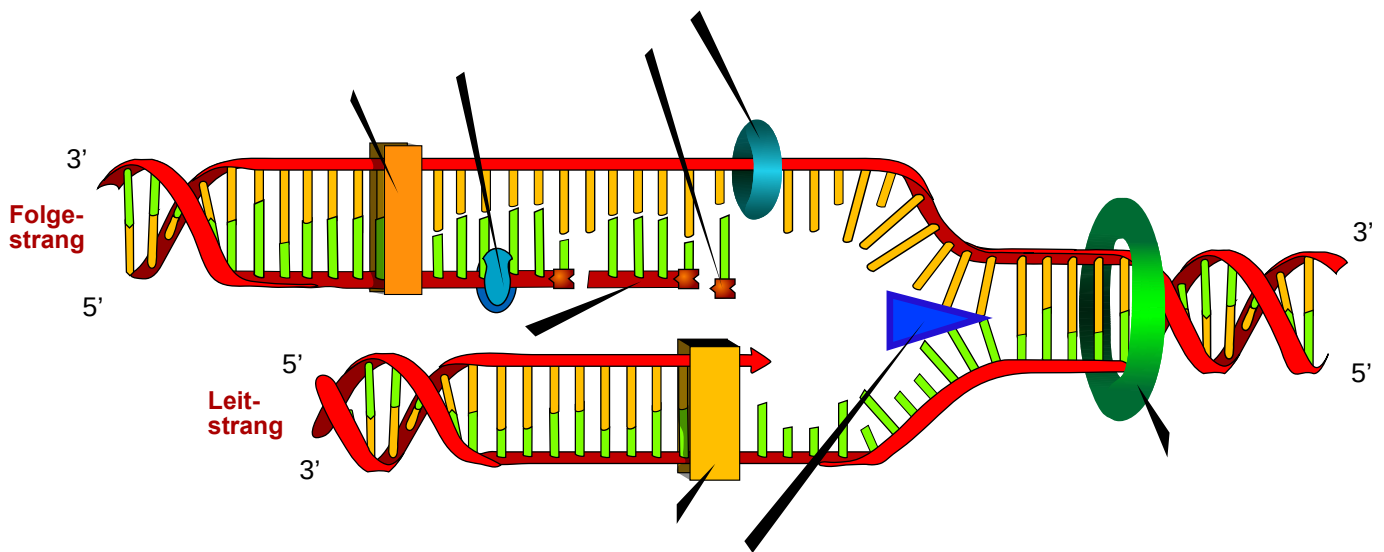


Abb. 3.1: Vorgänge an der Replikationsgabel (Q: wikicommons. A: LadyOHats, verändert)

3.2 Elongation: Die Synthese des Tochterstrangs durch Anhängen von Nucleotiden

Das Schlüsselenzym für die Tochterstrang-Synthese ist die DNA-abhängige DNA-Polymerase

3.1 Beschriften Sie die Abbildung 3.2 mit den unterstrichenen Worten. Geben Sie die Lese- und Syntheserichtung an ($3' \rightarrow 5'$ oder $5' \rightarrow 3'$)

Die **DNA-Polymerase** lagert sich an den Replikationsursprung an und läuft diesen bei Eukaryoten mit einer Geschwindigkeit von ca. 2,5 $\mu\text{m}/\text{Minute}$ entlang, das sind 50 – 100 Nukleotiden pro Sekunde, bei Prokaryoten ca. 1000 Nukleotiden pro Sekunde. An der Polymerase lagert sich dasjenige Nucleosidtriphosphat (Base-Zucker-(P)-(P)-(P), z.B. desoxy-ATP) mit der komplementären Base an den Matrizenstrang an. Anschließend wird das Molekül an das Ende des Tochterstrangs geknüpft und so um eine Base verlängert. Die Energie, die für die Verknüpfung benötigt wird, entstammt aus der Abspaltung des Diphosphats.

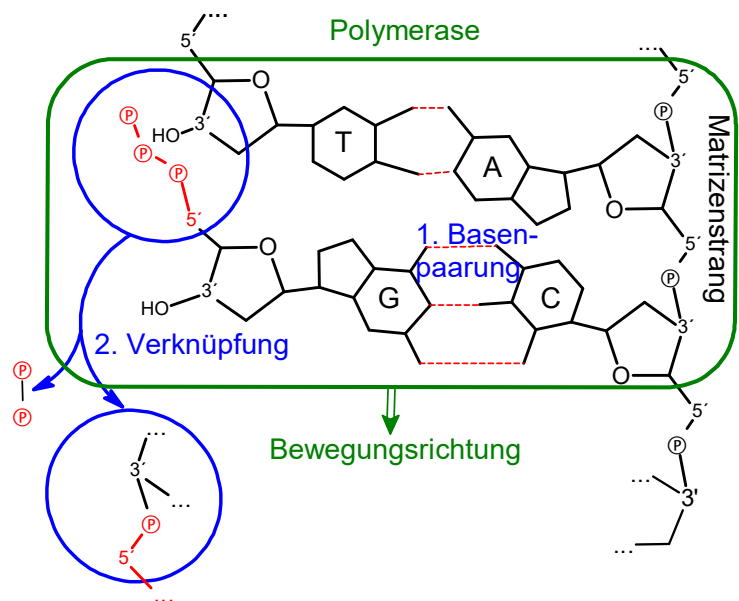


Abb. 3.2: Funktion der DNA-Polymerase (Quelle: eW)

Die Synthese des DNA-Stranges kann durch die DNA-Polymerase nur erfolgen, wenn dem Enzym ein freies 3'-Hydroxyende zur Verfügung steht, an das er das folgende Nukleotid anhängen kann (vgl. Abb. 3.2, *OH-Gruppe im oberen blauen Kreis!*). Damit die DNA-Polymerase mit ihrer Arbeit anfangen kann, ist es deshalb nötig, dass am Replikationsursprung ein Stück Doppelstrang schon vorliegt. Hierzu dient das Enzym **Primase**. Es erzeugt anhand des Matrizenstrangs an der erforderlichen Stelle ein komplementäres, ca. 10-50 Basenpaare (bp) langes Stück Nucleinsäure, den **RNA-Primer**. Dieser Primer lagert sich an die komplementäre Sequenz auf der DNA an. Das entstehende Stückchen mit der 3'-OH-Gruppe (*wie diejenige im oberen blauen Kreis in Abb. 3.2!*) wird von der DNA-Polymerase als Ansatzstelle für die Verlängerung (Elongation) des DNA-Stranges genutzt. Bei der natürlichen Replikation von Eukaryoten und Prokaryoten besteht der Primer meistens aus RNA. Die Besonderheiten dieser Art von Erbinformation werden wir in Kürze kennen lernen.

Bei der Anlagerung der komplementären Basen zur Verlängerung (Elongation) des neuen Strangs, kann es relativ leicht zu Fehlern kommen. Dabei wird eine falsches Nucleotid angelagert. Würden diese Fehler bestehen bleiben, wäre das fatal. Diese Fehler werden bei allen folgenden Zellteilungen an die Tochterzellen weiter vererbt. Mittlerweile wurden bei einigen DNA-Polymerase-Typen eine Korrekturlesefunktion nachgewiesen. Offensichtlich sind diese also auch in der Lage, nicht komplementäre Basen aus den Strang wieder herauszuschneiden (*vgl. Abb. 3.3*). Trotzdem werden nicht alle Fehler entdeckt und die Replikationsvorgänge sind mit dem Auftreten von **Mutationen** verbunden.

3.3 Beschriften Sie Abb. 2.4 (A) - (F) mit Hilfe des Textes.

Da die DNA-Polymerase nur in 3'→5'-Richtung liest, kann sie beim einen der beiden Matrizenstränge in einiger Entfernung einfach der **Helicase** folgen und dabei fortlaufend den Strang synthetisieren. Der so kontinuierlich verlängerte DNA-Strang wird **Leitstrang** genannt. Der andere Matrizenstrang ist jedoch **gegenläufig** (*antiparallel*). Die Helicase legt diesen zweiten Matrizenstrang in 5'→3'-Richtung frei. Die Polymerase, die an diesem Strang abliest, kann hier also nicht der Helicase folgen. Die Konsequenz ist, dass an diesem Matrizenstrang die DNA-Polymerase-Moleküle immer warten müssen, bis die Helicase vorangeschritten ist, um dann die DNA in die entgegengesetzte Richtung abzulesen. Dieser DNA-Strang der stückweise synthetisiert wird, heißt **Folgestrang**. Die einzelnen Fragmente bestehen am 5'-Ende jeweils aus Primer, wo die Synthese des Stücks begann. Sie werden nach dem japanischen Entdecker-Paar **OKAZAKI-Fragmente** genannt. Die Replikation verläuft also diskontinuierlich.

Nachdem die einige tausend Basenpaare lange Stücke synthetisiert wurden, bauen spezielle Enzyme, **RNAsen**, den Primer ab. Jetzt kann die Polymerase anfangend vom 3'-OH-Ende des vorangegangenen (!) OKAZAKI-Fragments die fehlenden DNA-Nucleotide der Primeregion ergänzen. Dort wo Primer war, findet sich dann reguläre DNA-Nucleotide. Anschließend gibt es spezielle Enzyme, die **DNA-Ligasen**, die die Fragmente zum lückenlosen Folgestrang verknüpfen.

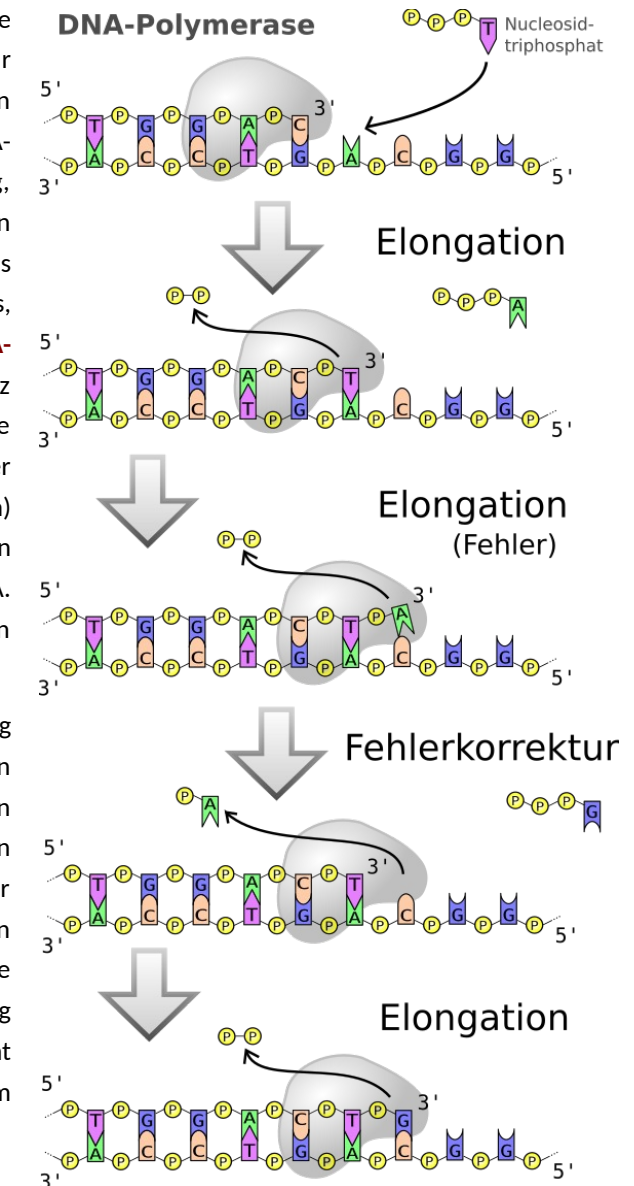


Abb. 3.3: Korrekturlesefunktion Q: wikicommons. A: madprime3

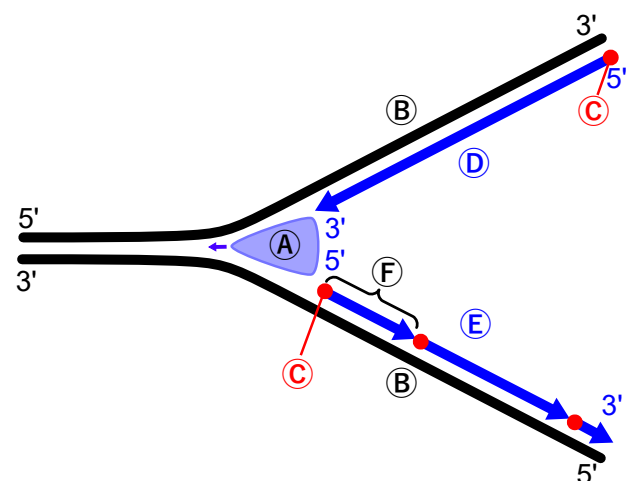


Abb. 3.4: Replikationsgabel mit OKAZAKI-Fragmenten. (Q: eW)

3.4 Ergänzen Sie die fehlenden Begriffe in Abbildung 2.1 (linker Teil)!

Die Replikationsgabel hat auch ein Gegenstück. Während ein Helicasemolekül den Doppelstrang in eine Richtung aufspaltet, läuft ein anderes Helicasemolekül den Doppelstrang in die andere Richtung entlang. Dort finden exakt die gleichen Vorgänge statt. Die Replikation verläuft also **bi-direktional**. Somit erhält jeder der beiden synthetisierten Doppelstränge Bereiche, die aus OKAZAKI-Fragmenten hervorgehen.

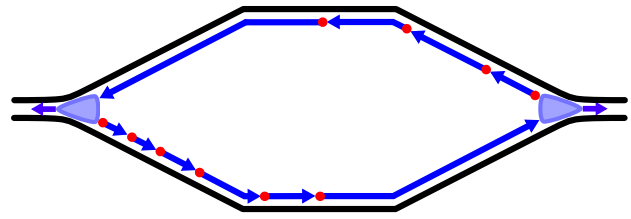


Abb. 3.5: Replikationsschleife. Beschriften Sie mit 3' und 5'! (Quelle: eigenes Werk)

3.3 Termination – Das Ende. Vom Zelltod und unsterblichen Zellen

Am Matrizenstrangende fällt der Enzymkomplex, der die *Elongation* ermöglicht hat, natürlicherweise von alleine ab. Anders sieht es bei ringförmiger DNA aus (z.B. Prokaryoten, mitochondrielle DNA). Bei Bakterien ist eine **Terminationssequenz** vorhanden, die den Enzymkomplex straucheln und abfallen lässt. Sonst würde das Ganze von Neuem beginnen. So wird auch hier die **Termination** gewährleistet.

Ganz zu Beginn des Matrizenstrangs, da wo die DNA-Polymerase zu arbeiten anfängt, also an den Chromosomenenden, wird auch ein Primer benötigt. Der wird zwar anschließend auch hier durch die RNase abgebaut. Da hier aber keine vorangehende freie 3'-OH-Gruppe vorhanden ist, kann an dieser Stelle keine DNA-Polymerase das fehlende Stück ersetzen. Mit jeder Replikation verkürzen deshalb die DNA-Folgestränge am 5'-Ende. Das ist nicht weiter schlimm, weil in diesem Bereich keine wichtigen codierenden Bereiche vorliegen. Nach circa 50-60 Zellteilungen („Hayflick-Grenze“) sind die Telomere bei gewöhnlichen Zellen so kurz, dass sich die Zelle nicht mehr teilen kann und der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Einzellige Eukaryoten, embryonale Stammzellen von Vielzellern - und leider auch Krebszellen - besitzen Enzyme, die **Telomerasen**, die es ihnen erlauben, das fehlende Stück zu ersetzen. Diese Zellen können sich beliebig oft teilen. Sofern sie keinen Katastrophentod sterben, sind beispielsweise Einzeller unsterblich. Bösartige Geschwülste sind bezüglich des Wachstums kaum limitiert und wachsen *invasiv*: Sie zerstören umliegendes gesundes Gewebe,

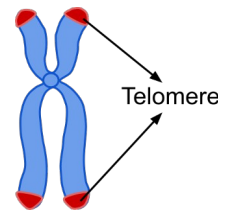


Abb. 2.6: Chromosom (Quelle: wikicommons)



[mit Lehrkraft am Ende anschauen]: Lernvideo „DNA Replikation / Verdopplung der DNA“ von

TeacherToby (13 min) zur gesamten Replikation . [kleine unwichtige Unterschiede im Detail: Die Ersetzung des RNA-Primers im Video ist etwas veraltet dargestellt. Im Text oben: aktuelle Stand]

moodle:

youtube: <https://youtu.be/-INCouZdbH4> : (ov)