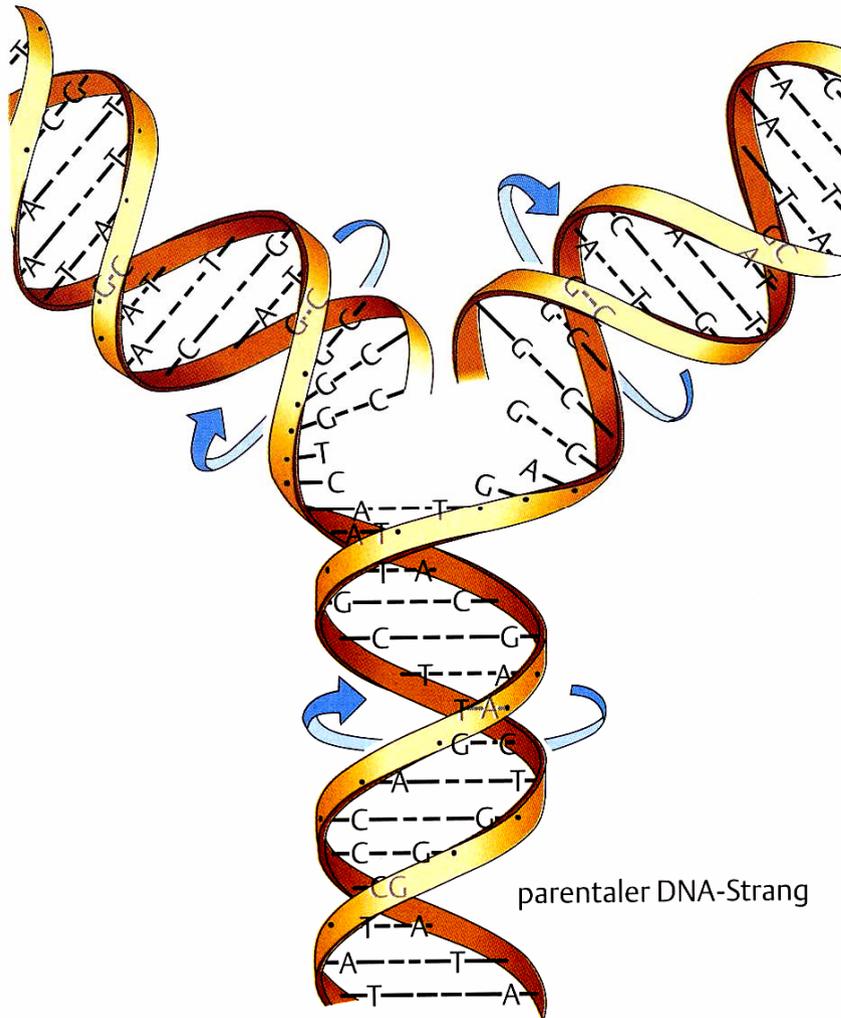


DNA-Replikation: Weitergabe der genetischen Information

DNA-Replikation

Semikonservative Replikation:

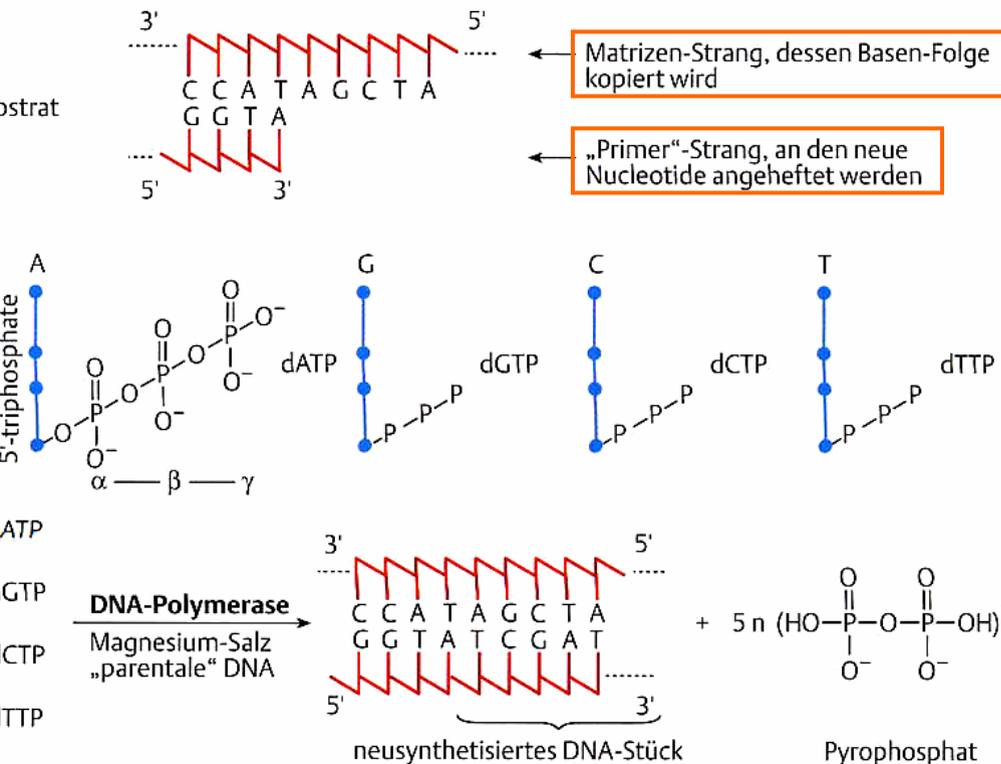


Genetische Information wird von Generation zu Generation durch **DNA- Replikation** weitergegeben

Semikonservativ: Der **Parental-Strang** wird aufgewunden und dient als Matrize für den neuen **Komplementär-Strang**.

DNA-Replikation

DNA-Polymerasen, allgemeiner Reaktionsmechanismus:



DNA-Polymerasen verknüpfen monomere Deoxynucleotide zu Polynucleotidketten.

Voraussetzungen:

Deoxynucleosid-triphosphate (dNTPs, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Mg²⁺, Na⁺ oder K⁺, pH 7,5, 30 –37°C

Teilweise einzelsträngige DNA

Anheften der dNTPs am 3-OH

DNA-Replikation

Die enzymatische Polymerisierung von dNTPs in Einzelschritten:

- **Korrekte Bindung** der Polymerase an die DNA (3'-OH im aktivem Zentrum)
- Anpassung des geeigneten dNTPs über **Basenpaarung** mit Matrizenstrang
- **Konformationsänderung** der Polymerase
- **nucleophiler Angriff** des 3'-OH Primer-Endes auf das alpha Phosphat, Bildung einer **Phosphodiester-Bindung** unter Freisetzung eines Phosphats
- **Abstoßen des Phosphats** und Rückspringen in Ausgangskonformation
- **Neuorientierung** des Enzyms (Bewegung um eine Base)

prozessive DNA-Synthese:

Entlangbewegen am DNA-Strang während der Synthese, viele Polymerasen benötigen Hilfsproteine

Prozessivität: Synthetisierte Basenpaare vor dem Abfallen vom DNA-Strang

DNA-Replikation

DNA-Polymerasen von *E. coli*:

Bakterien besitzen DNA-Polymerasen mit verschiedener Struktur und Funktion

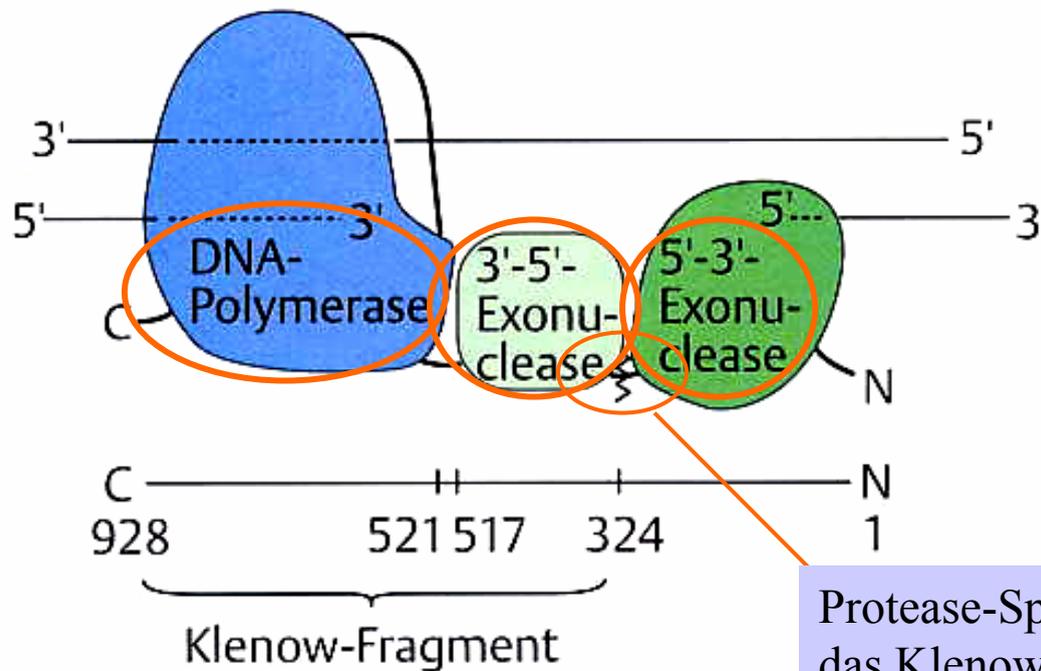
DNA-Polymerasen in *Escherichia coli* [15]

Bezeichnung	Aufbau	Biochemische Funktionen	Funktion in der Zelle
DNA-Polymerase I (Pol I)	1 Untereinheit: 928 Aminosäuren (103 kDa)	DNA-Polymerase 3'-5'-Exonuclease 5'-3'-Exonuclease	Entfernung von RNA-Primer (Abb. 6.4), Reparatur von DNA-Schäden
DNA-Polymerase II (Pol II)	88 kDa	DNA-Polymerase	Reparatur (?)
DNA-Polymerase III (Pol III)	10 verschiedene Untereinheiten (siehe Abb. 6.8)		die Replikations- Polymerase

DNA-Replikation

DNA-Polymerase I:

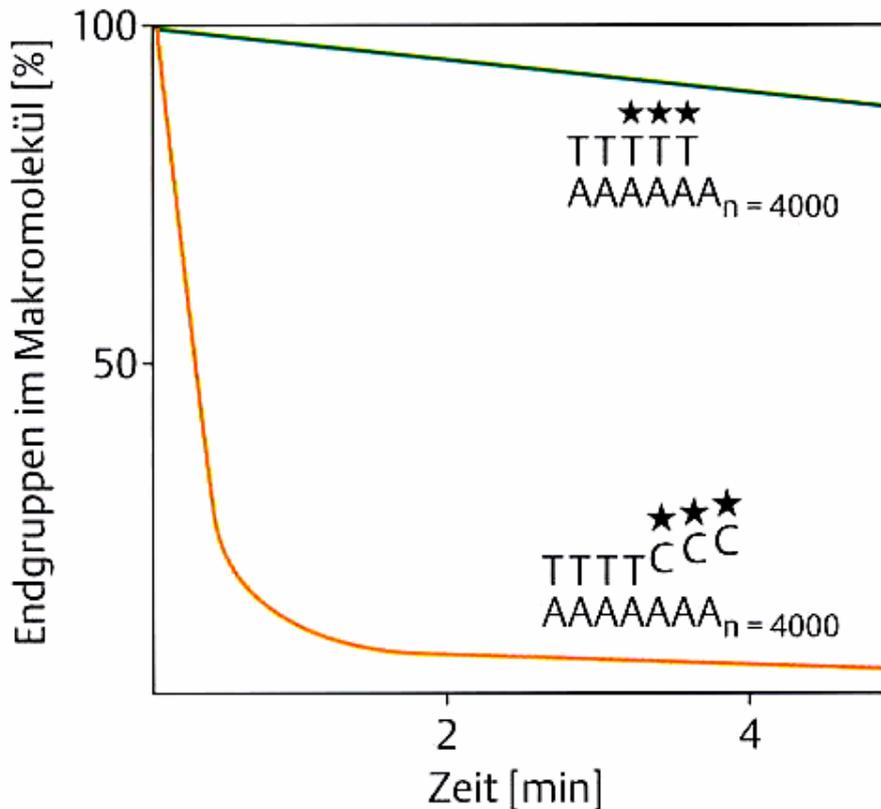
Domänenstruktur mit 3 definierten Funktionen



Protease-Spaltstelle, es entsteht das Klenow-Fragment

DNA-Replikation

Die 3'-5' Exonukleaseaktivität:



Häufige Funktion von Polymerasen

Pol I: Domäne des Proteins

Pol III: Assoziierte Untereinheit

Korrekturfunktion, erkennt und entfernt falsch eingebaute Basen

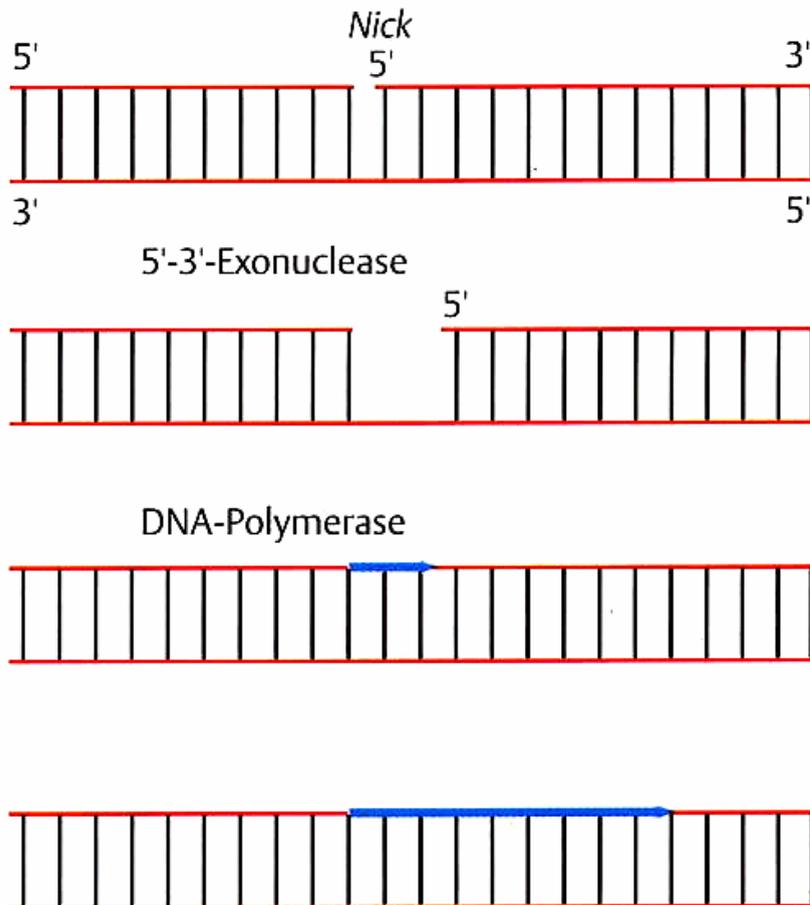
Einer von ca. 10.000

Polymerisationsschritten ist eine

Fehlpaarung, Korrektur durch 3'-5' Exo

DNA-Replikation

Die 5'-3' Exonukleaseaktivität, Nick Translation:



Greift nur DNA in komplett doppelsträngiger Form an

5'-3' Exo: Verdaut einen DNA-Strang, Polymerase synthetisiert neu

Reparatur geschädigter DNA

Bakterien-Mutanten ohne 5'-3'Exo sind wesentlich anfälliger auf UV-Strahlung und chemische Mutagenzien

DNA-Replikation

DNA-Polymerase II:

Unterschieden zu anderen bakteriellen DNA-Polymerasen durch eine Reihe von biochemischen Merkmalen

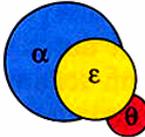
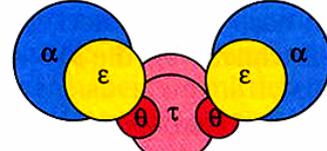
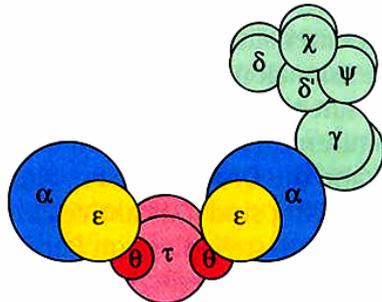
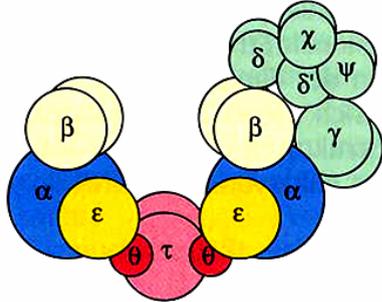
Funktion nicht geklärt

Verstärkte Bildung in Bakterien bei DNA-Schäden (SOS-Antwort)

Vermutet eine Funktion bei der Reparatur von DNA-Schäden

DNA-Replikation

Polymerase III, die Replikations-Polymerase, das Pol III Holoenzym:

Bezeichnung	biochemische Eigenschaften	Untereinheiten	
Pol III-Core	Prozessivität: 10 Nucleotide Geschwindigkeit: 10–20 Nucleotide/Sekunde		kleinste Untereinheit (UE) α-UE: 130 kDa, Polymerase ε-UE: 3'-5' Exo θ-UE: Unbekannte Funktion
Pol III' (Dimer)	Prozessivität: ca. 60 Nucleotide		zwei Pol III- Cores über τ-Protein verbunden
Pol III*	Prozessivität: ca. 200 Nucleotide (in Gegenwart von SSB)		γ-Komplex γ-Komplex und Dimer der β-UE erhöhen die Prozessivität von Pol III
Pol III-Holoenzym	Prozessivität: > 10 000 Nucleotide Geschwindigkeit: ca. 1 000 Nucleotide/Sekunde (in Gegenwart von SSB) dazu notwendig: ATP-Spaltung		γ-Komplex

DNA-Replikation

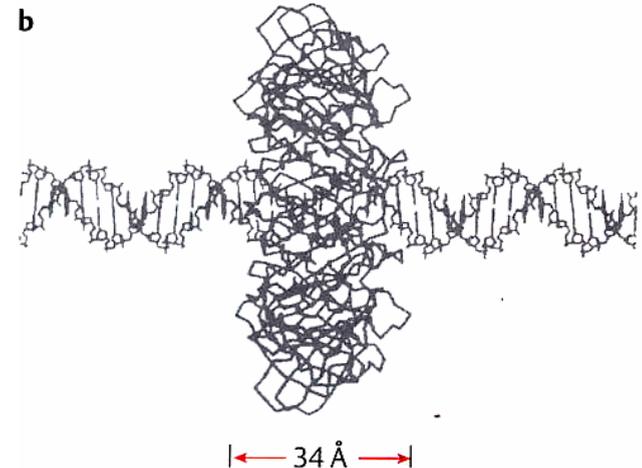
Die β -Untereinheit, Struktur,
die β -Ringklemme:

Die β -Ringklemme ist aus 2 β -Untereinheiten
aufgebaut

Die Enden treffen sich am oberen und unteren
Ringbogen

Beide Untereinheiten gemeinsam bilden 12
symmetrisch gelagerte α -Helices auf der
Innenseite des Rings

Die β -Ringklemme umschließt den DNA-
Strang

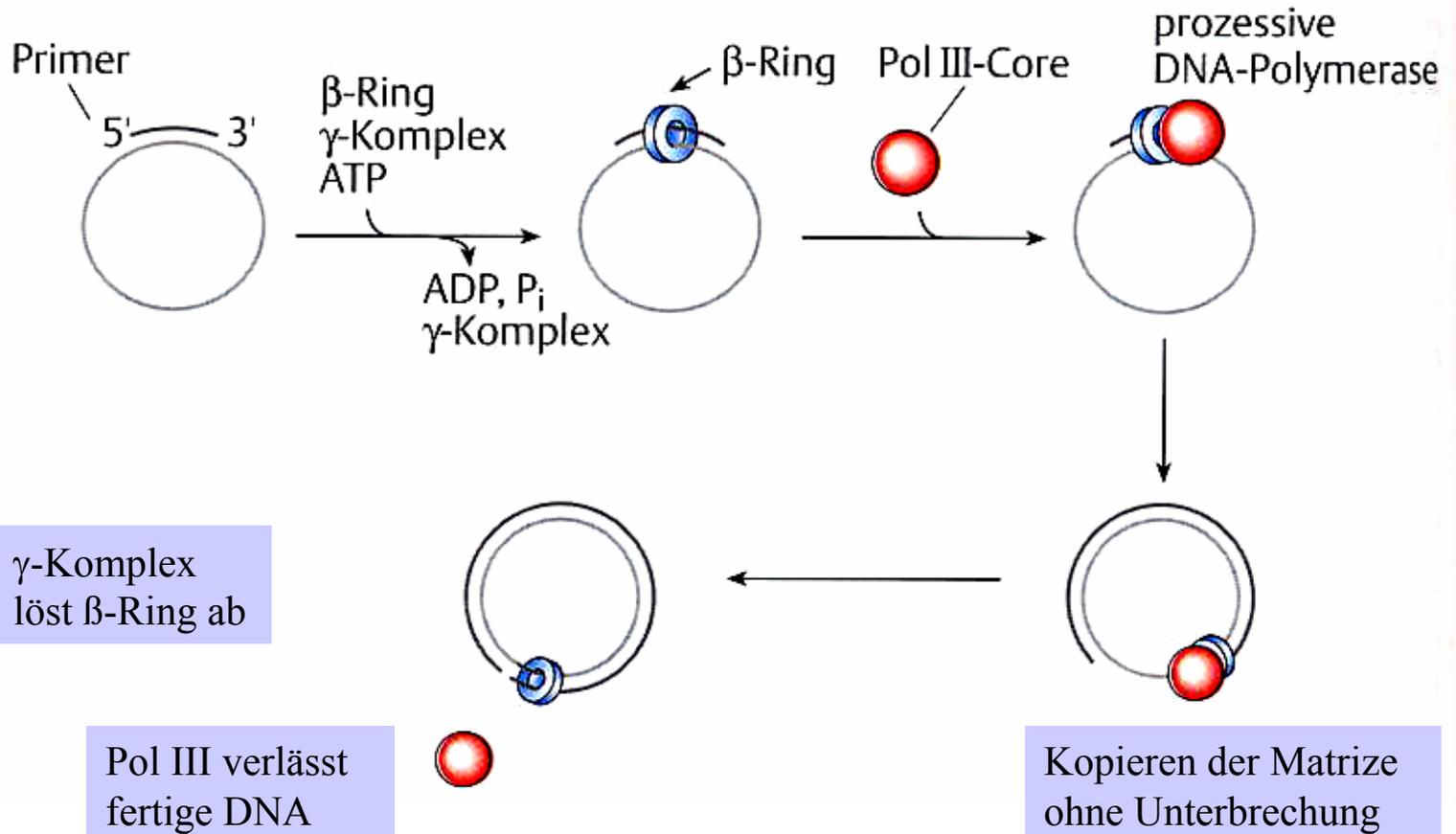


DNA-Replikation

Schritte des Replikationsvorgangs, Funktion von γ -Komplex und β -Ring:

γ -Komplex belädt unter ATP-
verbrauch die DNA mit β -Ring

Pol III-Core-Enzym
bindet an β -Ring



γ -Komplex
löst β -Ring ab

Pol III verlässt
fertige DNA

Kopieren der Matrize
ohne Unterbrechung

DNA-Replikation

Bakterielle SSB-Proteine, eukaryontische Einzelstrang-Proteine (RPA)

SSB: *single strand binding*

RPA: *replication protein A*

- Sind essenziell für DNA-Replikation
- Binden an Einzelstrang-DNA und erleichtern die Bindung weiterer SSBs, RPAs
- Beteiligen sich auch an Reparatur und Rekombination von DNA
- SSB-Proteine: 4 identische Untereinheiten von je 19 kDa
- RPA: 3 Untereinheiten von 70, 34 und 14 kDa

DNA-Replikation

Primase:

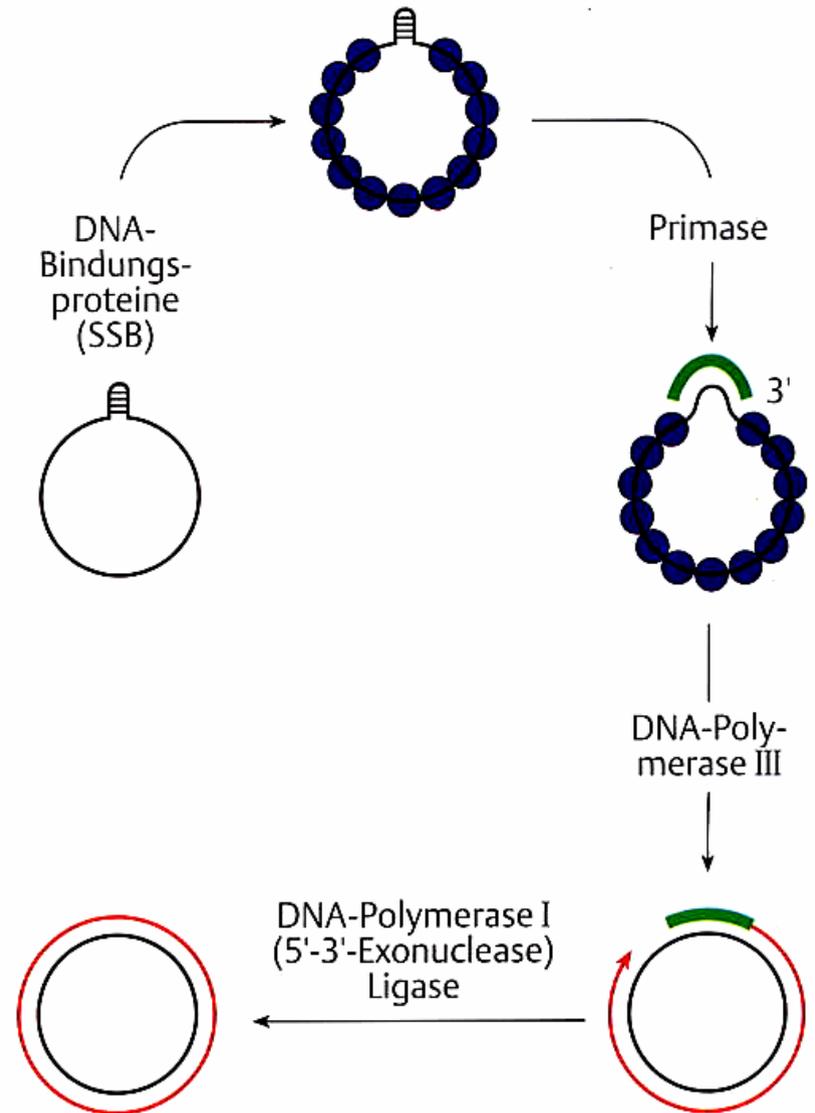
Synthese von DNA-Strängen benötigt Startstück (Primer)

In vitro-Experimente: kurze DNA-Stücke

Bei natürlicher Replikation: kurze RNA-Stücke

Synthese durch Primase auf die DNA-Matrize

Entfernung durch Pol I und RNase H



DNA-Replikation

Eukaryontische DNA-Polymerasen:

Eukaryotische DNA-Polymerasen [29]

DNA-Polymerase	katalytische Untereinheit	andere Untereinheiten	3'-5'-Exonuclease	Hauptfunktion
α	180 kDa	86 kDa 58 kDa 48 kDa	nein	Primase; Synthese kurzer DNA-Stücke; Einleitung der Replikation
δ	125 kDa	53 kDa	ja	Replikation; Reparatur
ε	200 kDa	mehrere	ja	Replikation; Reparatur
β	40 kDa	nein	nein	Reparatur von DNA
γ	125	50 kDa	ja	mitochondriale DNA-Replikation

Pol- α : 4 UE: größte UE= DNA polymerisierend, beiden kleineren: Primase

Pol- δ : replikative DNA-Kettenverlängerung, benötigt wie Pol III Hilfsproteine:

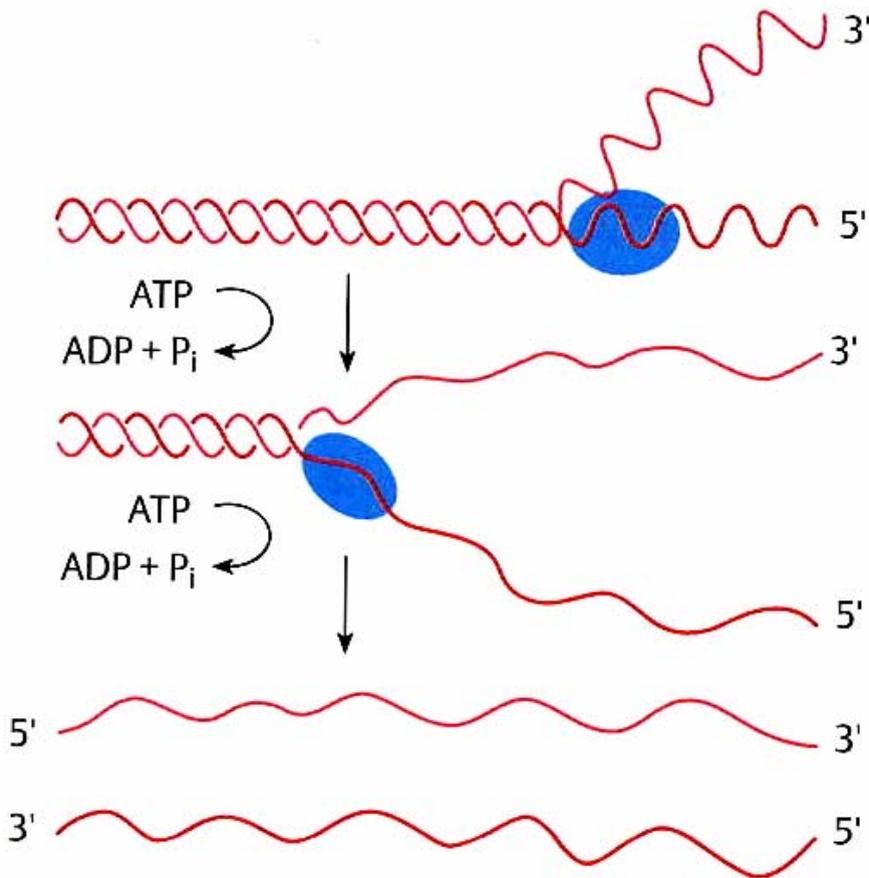
- Protein PCNA als Ringklemme
- Protein RF-C als Beladungshilfe

Pol- ε : benötigt PCNA Protein als Processivitätsfaktor

Pol- δ und Pol- ε : teilen sich die Synthese-Aufgaben an der Replikationsgabel

DNA-Replikation

DNA-Entwindung, DNA-Helikasen:



Zwei Reaktionen für DNA-Replikation:

- **Synthese** des Komplementärstrangs (Polymerasen)
- **Entwindung** des Parentalstrangs (Helikasen)

Helikasen: Bewegen sich entlang des DNA-Strangs und lösen unter ATP-Verbrauch die H-Brücken

Einteilung nach Wirkungsrichtung:

5'-3' und 3'-5' Helikasen

An allen Reaktionen der DNA-Einzelstrangbildung beteiligt, Reparatur, Rekombination, andere genetische Funktionen

DNA-Replikation

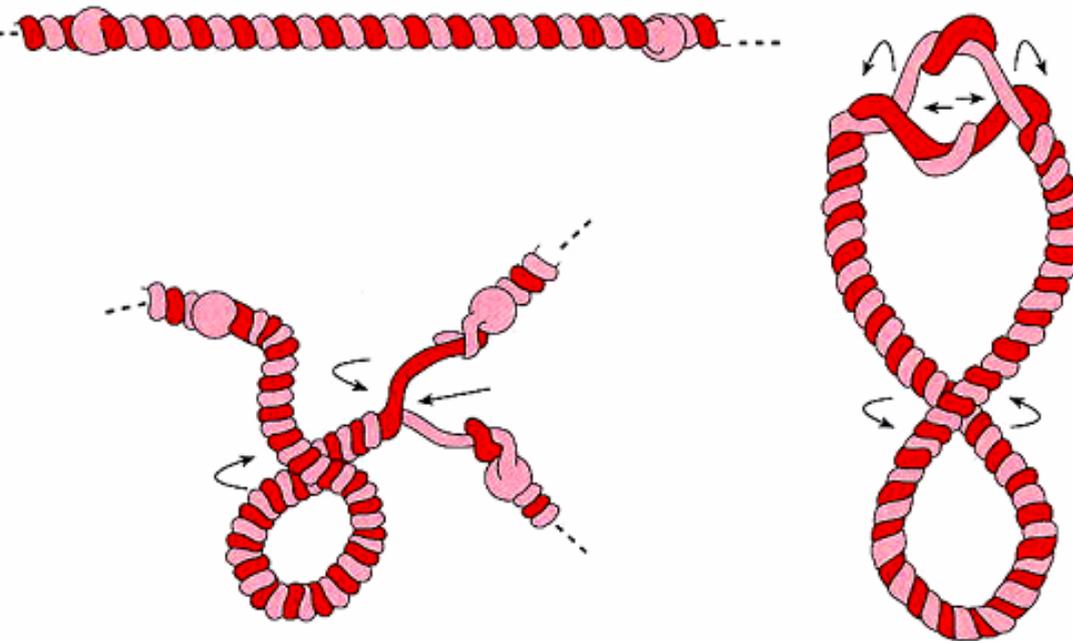
Helikasen von *E. coli*:

Einige DNA-Helikasen in *Escherichia coli*

Bezeichnung	Gen	Richtung	Funktion
DNA-Helikase I	<i>tra I</i>	5' → 3'	konjugativer DNA-Transfer
DNA-Helikase II	<i>uvr D</i>	3' → 5'	Reparatur von DNA
DNA B-Protein	<i>dna B</i>	5' → 3'	Replikation
Rep-Protein	<i>rep</i>	3' → 5'	Replikation bestimmter Einzelstrang-DNA-Phagen; unbekannte Funktion in nichtinfizierten Bakterienzellen
Rec BCD-Protein	<i>rec B, C, D</i>	–	Rekombination

DNA-Replikation

DNA-Entwindung, DNA-Topoisomerasen:



Entwindung von ringförmiger oder langer linearer DNA führt zu Verdrillung

Topoisomerasen öffnen den DNA-Strang, leiten ihn durch die Lücke und schließen ihn wieder

Änderung der Verknüpfungszahl

DNA-Replikation

DNA-Topoisomerasen, Einteilung nach Funktion:

Typ I DNA-Topoisomerasen:

- führen superhelikale DNA in entspannte DNA durch vorübergehende Spaltung eines Strangs.
- Eine Reaktionsrunde verändert die Verknüpfungszahl um 1

Typ II DNA-Topoisomerasen:

- vorübergehende Spaltung beider Stränge.
- Eine Reaktionsrunde verändert die Verknüpfungszahl um 2.
- ATP abhängige Reaktion

DNA-Replikation

DNA-Topoisomerasen, Vergleich Pro- und Eukaryonten:

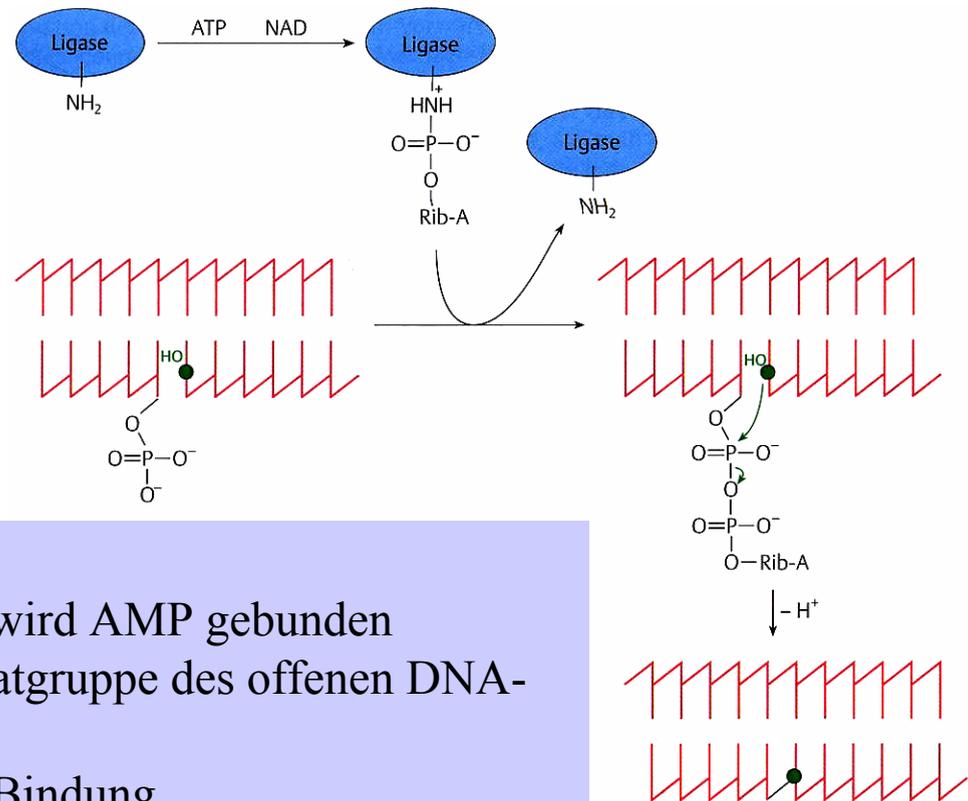
DNA-Topoisomerasen: Eine Zusammenfassung

	Moleküle/Zelle	Struktur	wichtigste Reaktion
Typ I-Topoisomerase			
Bakterien	ca. 1000	eine Untereinheit (97 kDa)	Relaxation negativ superhelikaler DNA
Eukaryoten	1 Million	eine Untereinheit (100 kDa)	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA
Typ II-Topoisomerase (ATP-abhängig)			
Bakterien, Gyrase	ca. 500	Tetramer: 2 · Gyr A (97 kDa) 2 · Gyr B (90 kDa)	Relaxation von negativen Supercoils; Relaxation negativ superhelikaler DNA
Eukaryoten	10^4 – 10^5	Dimer: identische Untereinheiten (160–180 kDa)	Relaxation negativ und positiv superhelikaler DNA

DNA-Replikation

DNA-Ligase:

Schließt neusynthetisierten DNA-Strang, z.B.: Ringschluss, Funktion an der Replikationsgabel, eine Ligase in Prokaryonten (NAD ist Cofaktor), Eukaryonten meist zwei (ATP ist der Cofaktor)



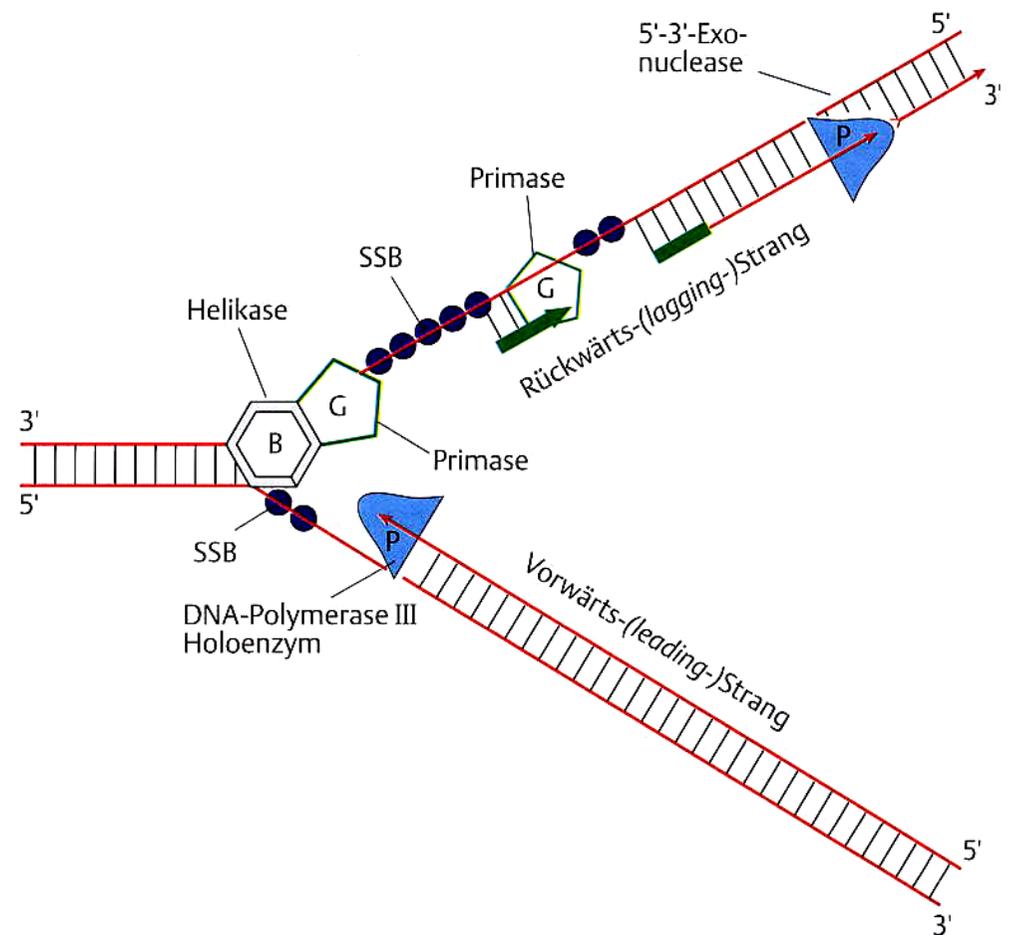
Reaktionsweg:

- An die Seitenkette eines Lysins wird AMP gebunden
- AMP-Rest wird auf die 5' Phosphatgruppe des offenen DNA-Strangs übertragen
- Herstellung der Phosphodiester-Bindung
- entladenes Enzym verläßt DNA

DNA-Replikation

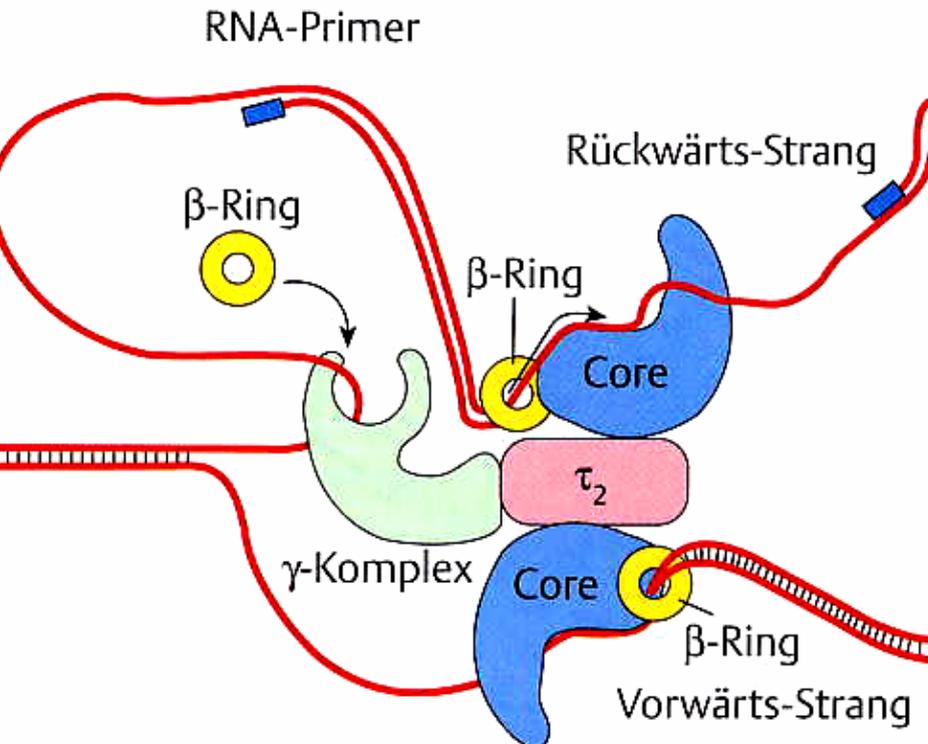
Die Ereignisse an der Replikationsgabel, bakterielle DNA-Replikation:

- Dna B-Helikase bewegt sich in 5'-3'-Richtung, entwindet unter ATP-Verbrauch die Doppelhelix
- Einzelstrangbereiche werden durch Einzelstrang-Binde-Proteine abgedeckt
- Vorwärtsstrang: Pol III heftet dNTPs an 3'-OH Ende
- Rückwärtsstrang: Primase bildet Primer-Stücke (RNA), Pol III synthetisiert Okazaki-Fragmente (1000 –2000 Nucleotide)
- 5'-3'-Exo von Pol I, RNaseH bauen RNA-Primer ab
- Pol I schließt entstandene Lücken
- Ligase verknüpft Stränge



DNA-Replikation

Die Ereignisse an der Replikationsgabel,
Berücksichtigung der Pol III Struktur:

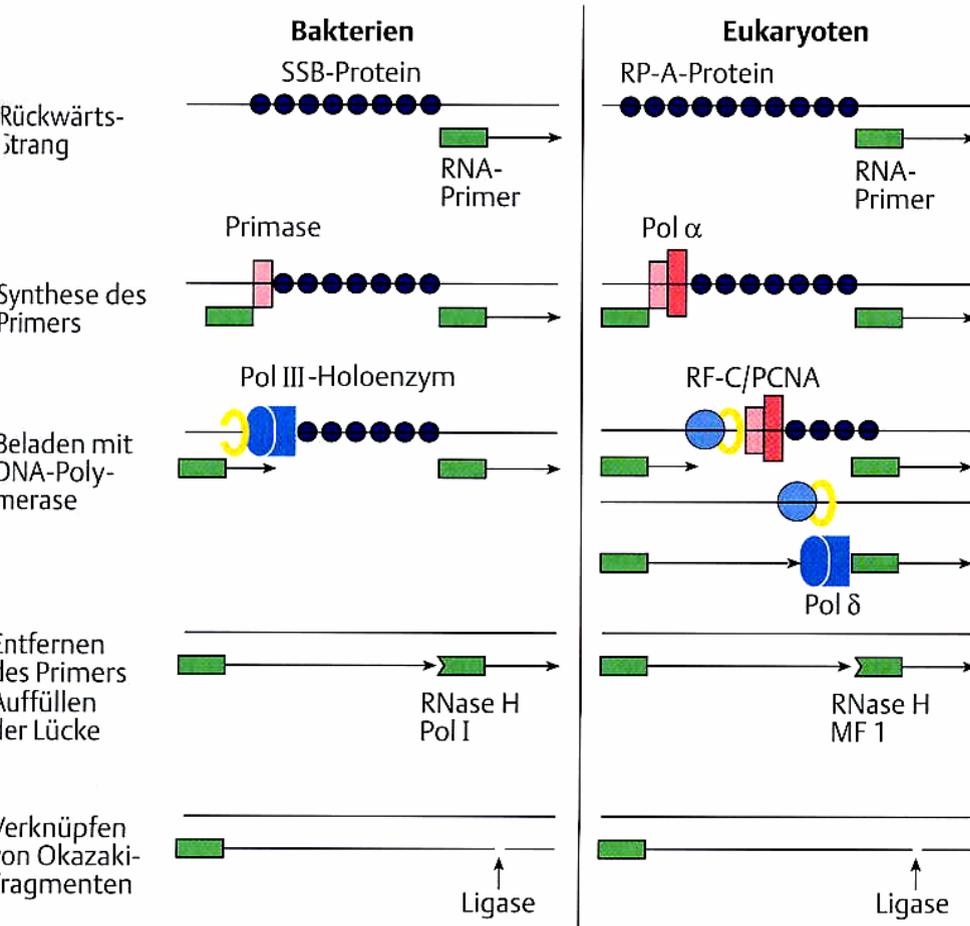


Rückwärtsstrang:

- Pol III Synthese des Okazaki Fragments bis Ende
- Verlassen des DNA-Strangs und Kontaktaufnahme mit dem neuen Primer
- Dies wird ermöglicht durch den γ -Komplex der unter ATP-Verbrauch DNA mit einem neuen β -Ring belädt
- Pol III bindet an β -Ring und startet Synthese des neuen Okazaki-Fragments

DNA-Replikation

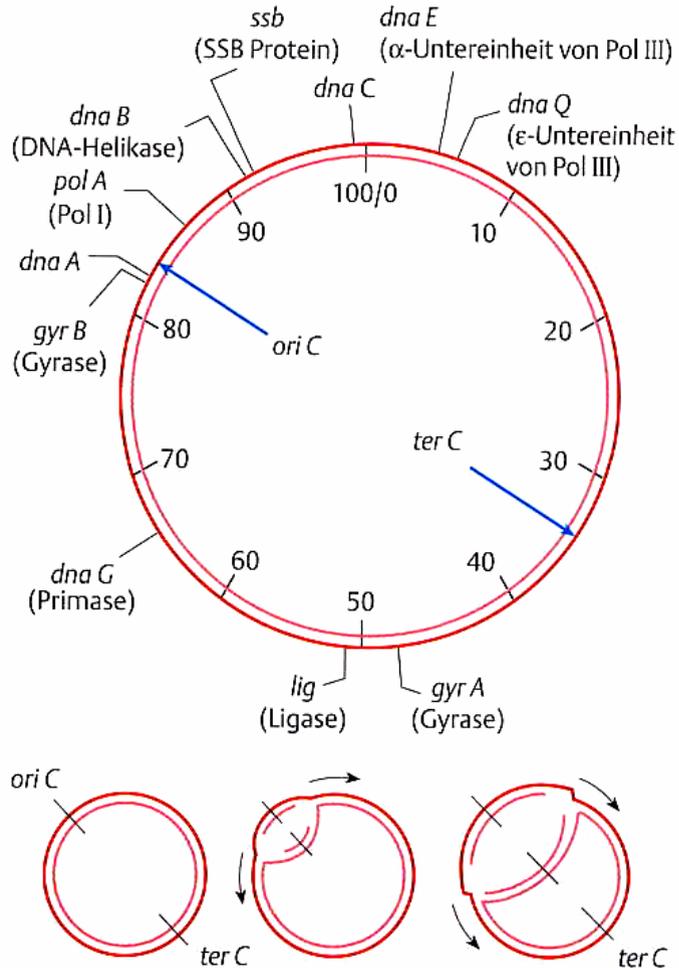
Synthese von Okazaki-Fragmenten, Vergleich Pro- und Eukaryonten:



- Okazaki-Fragmente werden durch Pol- α gebildet
- zuerst Synthese eines kurzen RNA-Abschnitts (8-10 Ribonucleotide) dann um ca. 20 Deoxynucleotide verlängert
- Pol- δ , Pol- ϵ führen die Synthese weiter bis zum Ende des Okazaki-Fragments
- RF-C-Protein positioniert eine PCNA-Ringklemme am neuen Primer
- Start der Synthese des neuen Okazaki-Fragments

DNA-Replikation

Ablauf der Replikation des Bakterien-Genoms:



Grundmodell der Replikation:

- Einleitung der Replikation durch einen Initiator
- Tritt mit einer definierten Stelle im Genom (Origin) in Kontakt
- Die Verfügbarkeit des Initiators und seine Kontaktnahme mit der DNA sind exakt reguliert

Replikation im *E. coli* Genom:

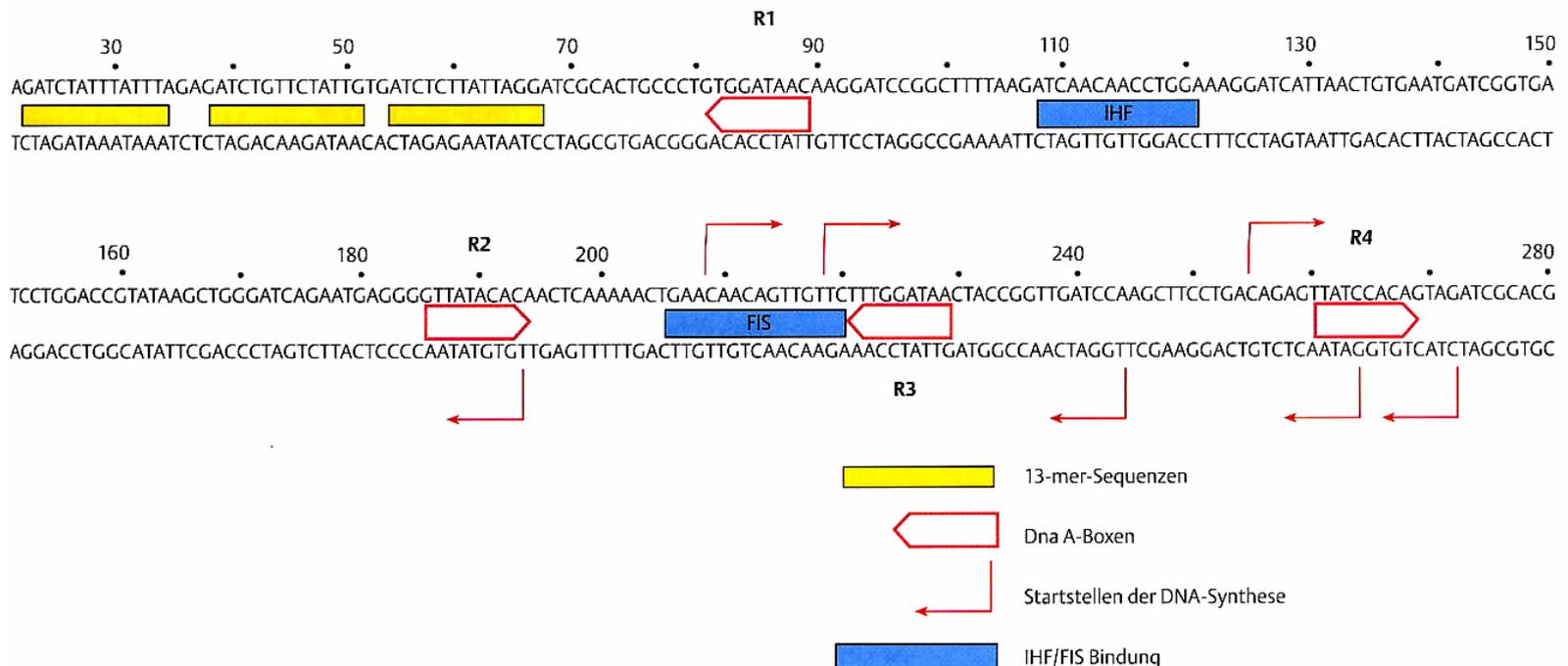
- Origin (*oriC*) bei 83,5 Minuten, gegenüber der Terminator (*terC*)
- Karte zeigt zusätzliche Positionen für die Herstellung von Replikationsproteinen

DNA-Replikation

Struktur des Origins auf dem Genom von *E.coli*:

oriC ist aufgebaut aus:

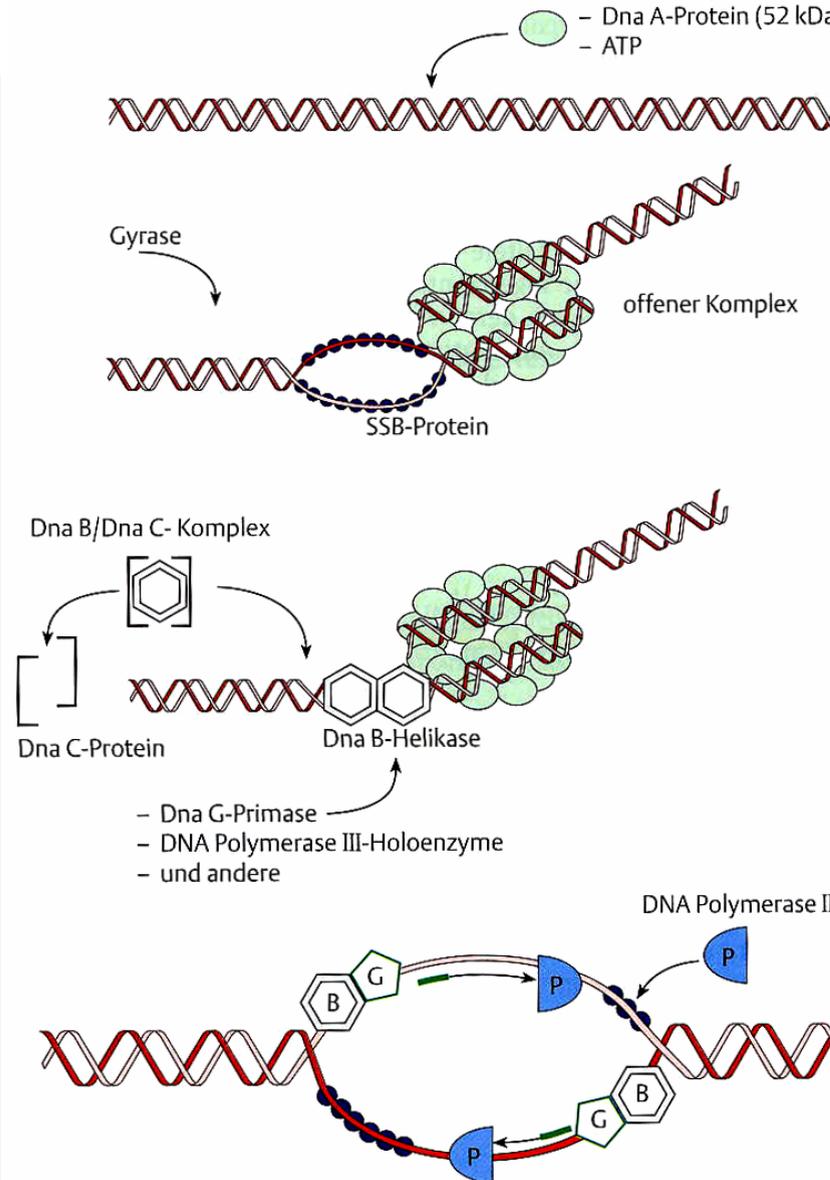
- Dna A-Box Bindungsstelle für das Initiator -Protein Dna A
- Drei hintereinander geschachtelte AT-reiche Regionen (13-mer Sequenz)
- GATC-Blöcke die an den Adenin-Resten methyliert werden können.



DNA-Replikation

Einleitung der Replikation:

- ATP-beladene Dna A-Proteine lagern sich an die entsprechenden Bindungsstellen
- Ausbildung eines dichten Proteinkerns von 20-40 Dna A Proteinen
- Entwindung der DNA in der 13-mer Sequenz
- Der offene Komplex wird durch SSB-Proteine stabilisiert
- Dna B Helikase bindet, Initiationsprotein Dna C unterstützt die Reaktion
- Nach Strangentwindung bindet Primase und legt RNA-Primer auf DNA-Stränge
- Replikationsgabel wird ausgebildet, Synthese startet



DNA-Replikation

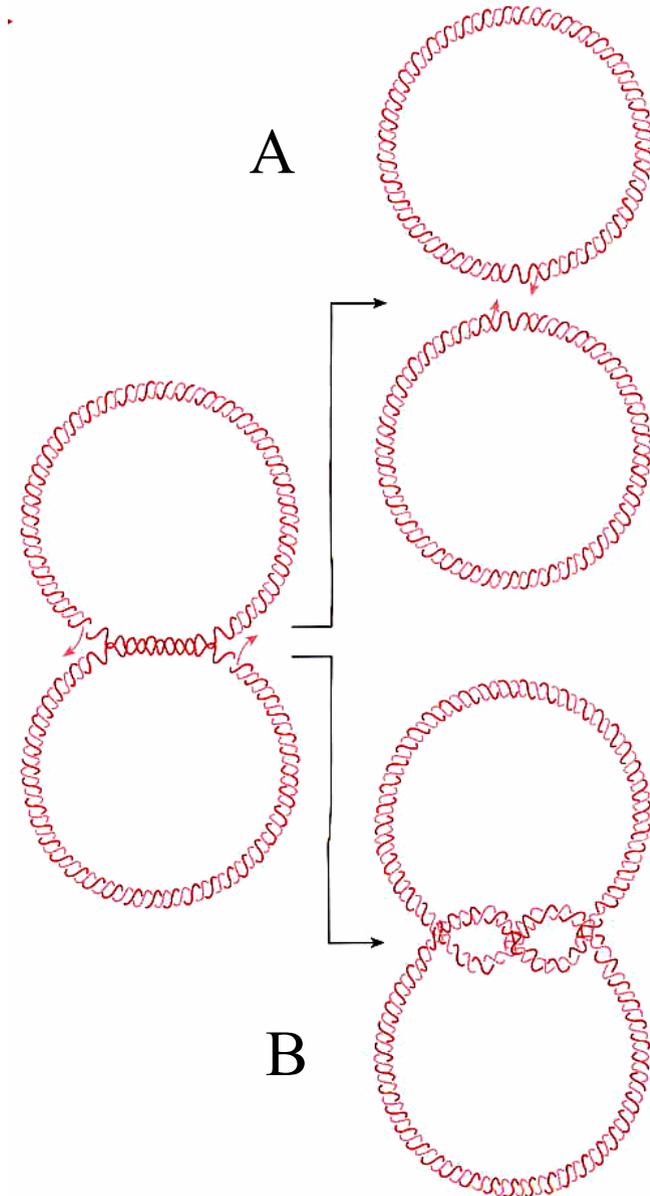
Das Ende der Replikationsrunde:

Nach ca. 40 Minuten treffen sich die Replikationsgabeln am **Terminator**

An die Terminatorsequenz bindet sich das **Tus-Protein**, es blockiert die Helikasen und bringt die Wanderung der Replikationsgabeln zum Stillstand

A: die beiden unreplizierten Teile hängen zusammen und werden über eine Topoisomerase gelöst, entstandene Lücken werden aufgefüllt

B: DNA-Synthese läuft weiter, es entstehen Catenanen
Werden über Topoisomerase II aufgelöst



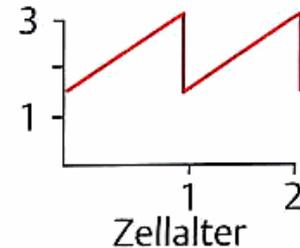
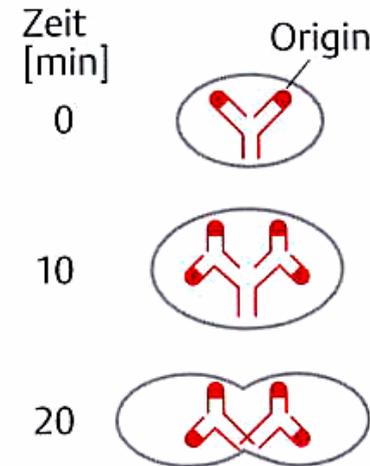
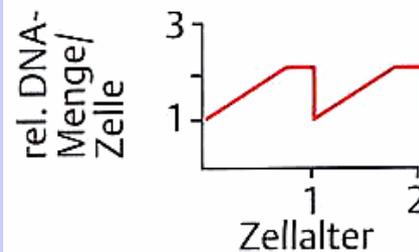
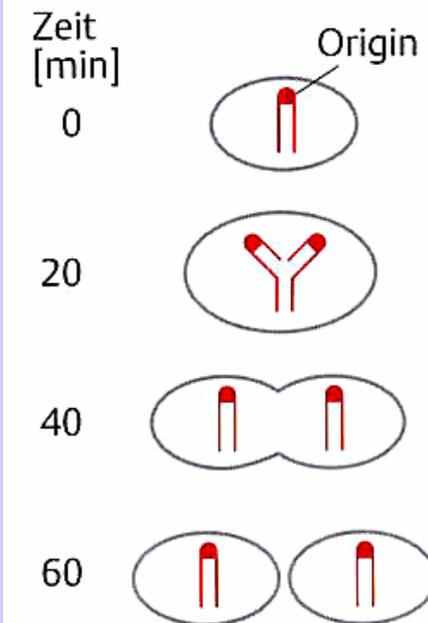
DNA-Replikation

Koordination von Replikation und Zellteilung:

Eine Replikationsrunde dauert 40 Minuten, unabhängig von der Generationszeit. Bei langen Generationszeiten ist die Replikation vor der Teilung abgeschlossen. Bei kurzen Generationszeiten wird die Replikation nie unterbrochen und eine weitere gestartet bevor die erste abgeschlossen ist.

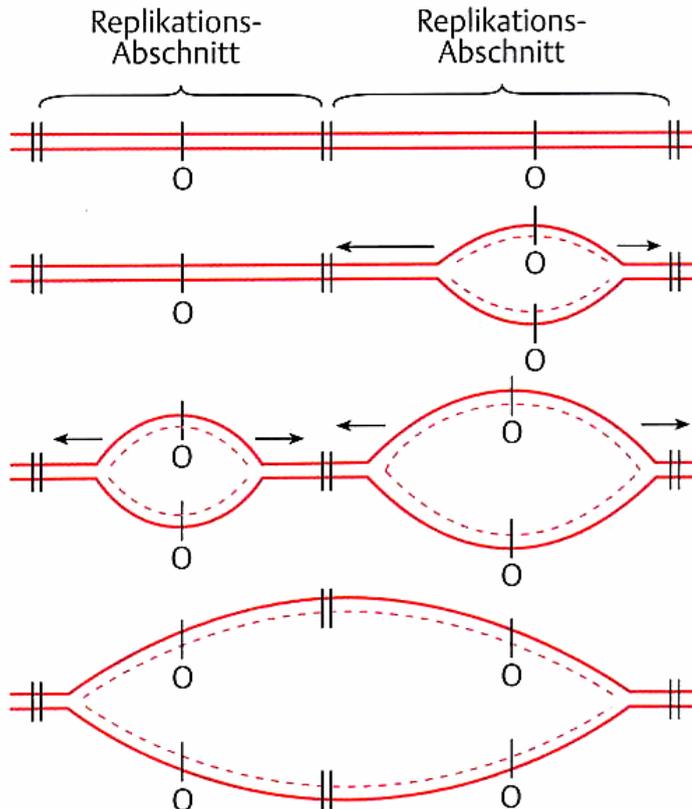
Regulation:

- Über die Häufigkeit von Initiationsereignissen
- Hängt von zellphysiologischen Bedingungen ab u.a. von verfügbarem Dna A-Protein
- Dna A-Boxen kommen auch im *dna A* Promotor vor und wirken dort als Repressor
- Methylierung der GATC-Boxen: *oriC* kann nur gestartet werden wenn beide Stränge methyliert sind



DNA-Replikation

Ablauf der Replikation in Eukaryonten Einleitung der Replikation:



Eukaryonten-Genome enthalten viele Replikationsstartpunkte:

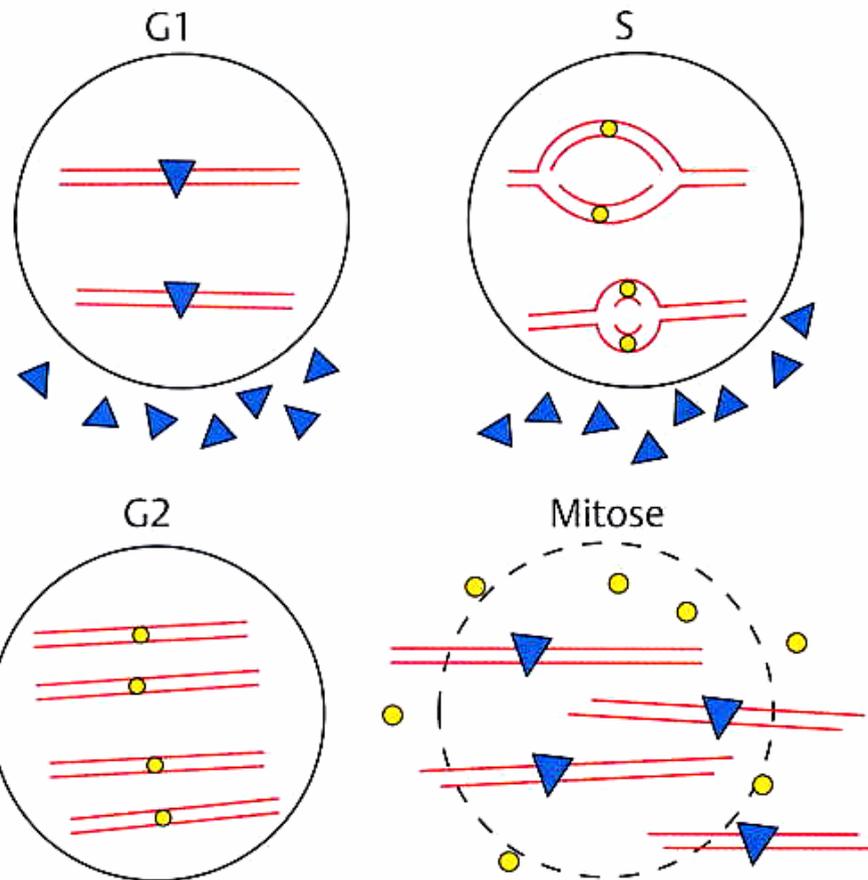
ca. alle 50.000 bis 200.000 bp ein Replikationsstartpunkt.

Einige zehntausend pro Genom.
Bidirektionale Amplifikation.
3000bp/Minute.

Es wird vermutet, dass eine Replikationseinheit einer Chromatinschleife entspricht.

DNA-Replikation

Einleitung der Replikation:



Jeder Abschnitt des Genoms wird während der S-Phase nur ein einziges Mal repliziert;

Lizen-Faktor-Modell:

- Aktive Initiatorproteine binden an Origins und aktivieren diese
- Mit der Einleitung der Replikation werden die Initiatorproteine inaktiv
- Sie verbleiben am Origin und blockieren seine neuerliche Aktivierung
- Zerfällt die Kernhülle bei der Mitose, erfolgt der Austausch von nichtaktivierten durch aktivierte Initiatorproteine

Tumorzellen, bestimmte Entwicklungsstadien von Insekten und Zellen nach der Einwirkung von Zellgiften entziehen sich begrenzt dieser Restriktion:

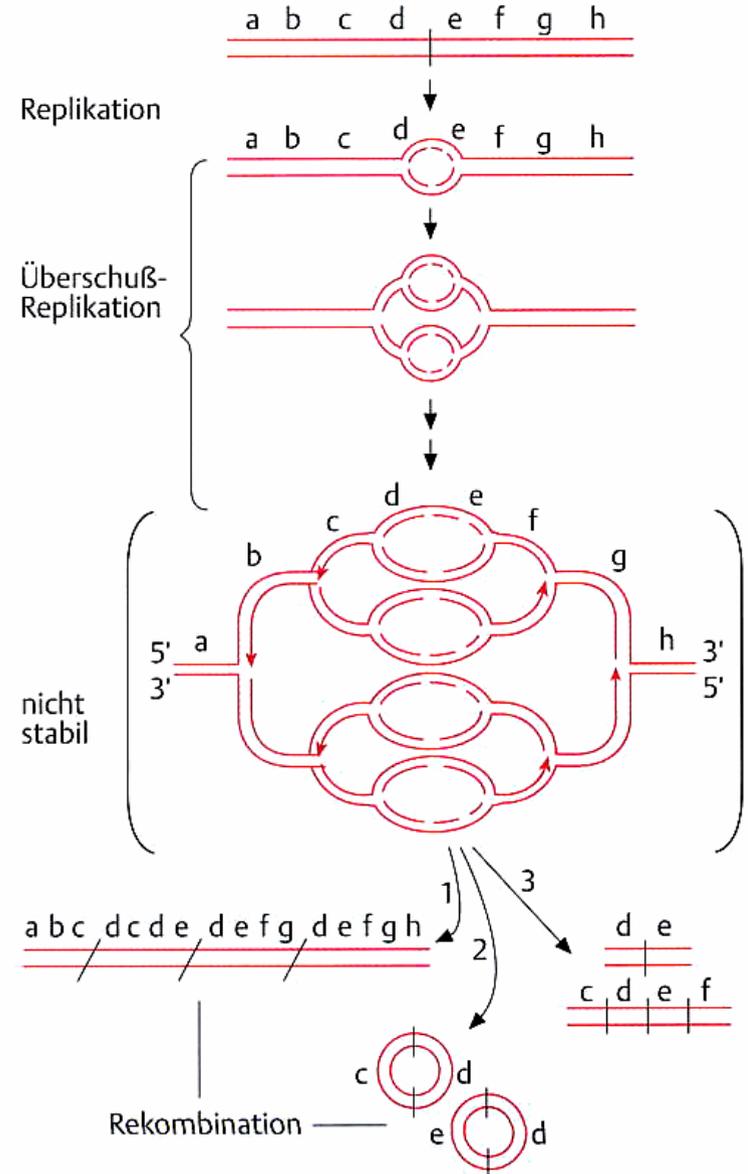
Lokale Polytänisierung

DNA-Replikation

DNA-Amplifikation über lokale Polytänisierung:

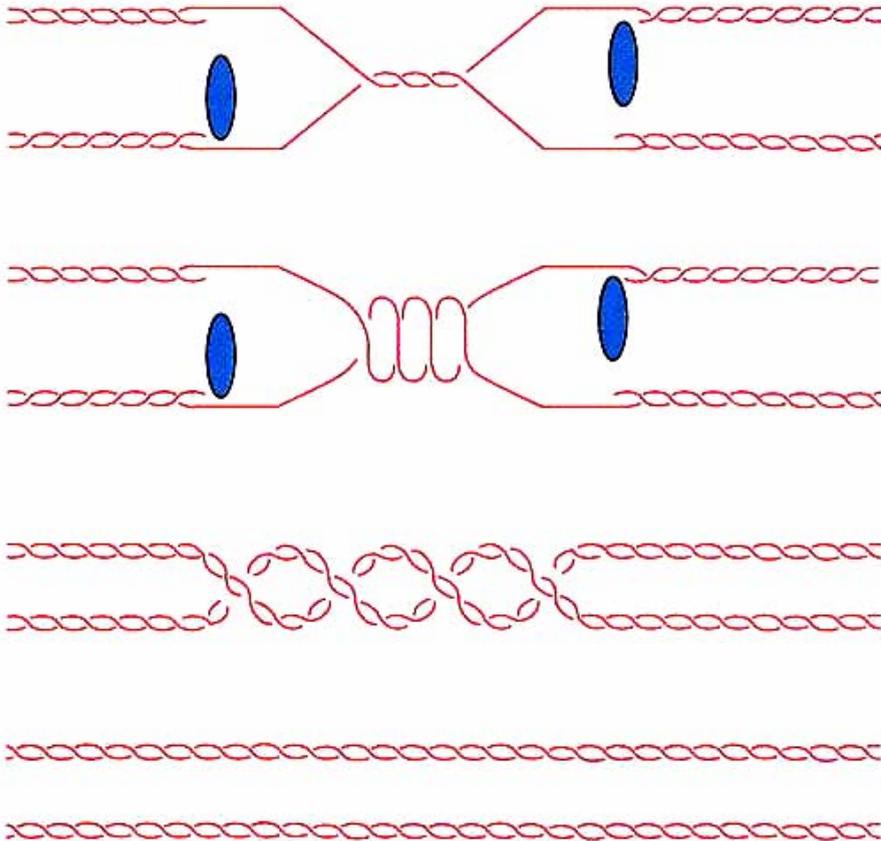
DNA-Abschnitte amplifizieren sich mehrfach während eines Zellzyklus:

Es folgen Rekombinationsvorgänge die zu langen Blöcken sich wiederholender DNA-Sequenzen oder zur Ausbildung extrachromosomaler DNA führen



DNA-Replikation

Ende der Replikation:



Problem 1: Zwei benachbarte Replikationsgabeln treffen sich, die ausgebildeten Catenan-Strukturen werden mit Hilfe der Topoisomerase II beseitigt

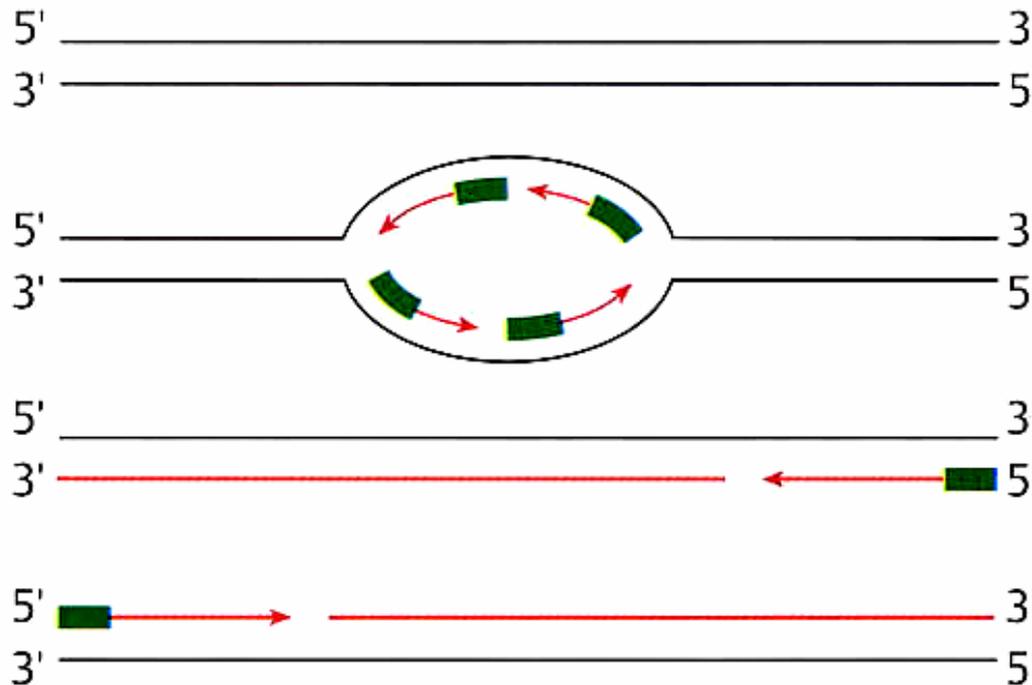
DNA-Replikation

Problem 2: lineare Struktur der Chromosomen von Eukaryonten, die durch RNA-Primer induzierte DNA-Synthese führt zu einem Verlust endständiger DNA

Telomere als Lösung: Endständige repetitive DNA-Sequenzen in monotonen Wiederholungen

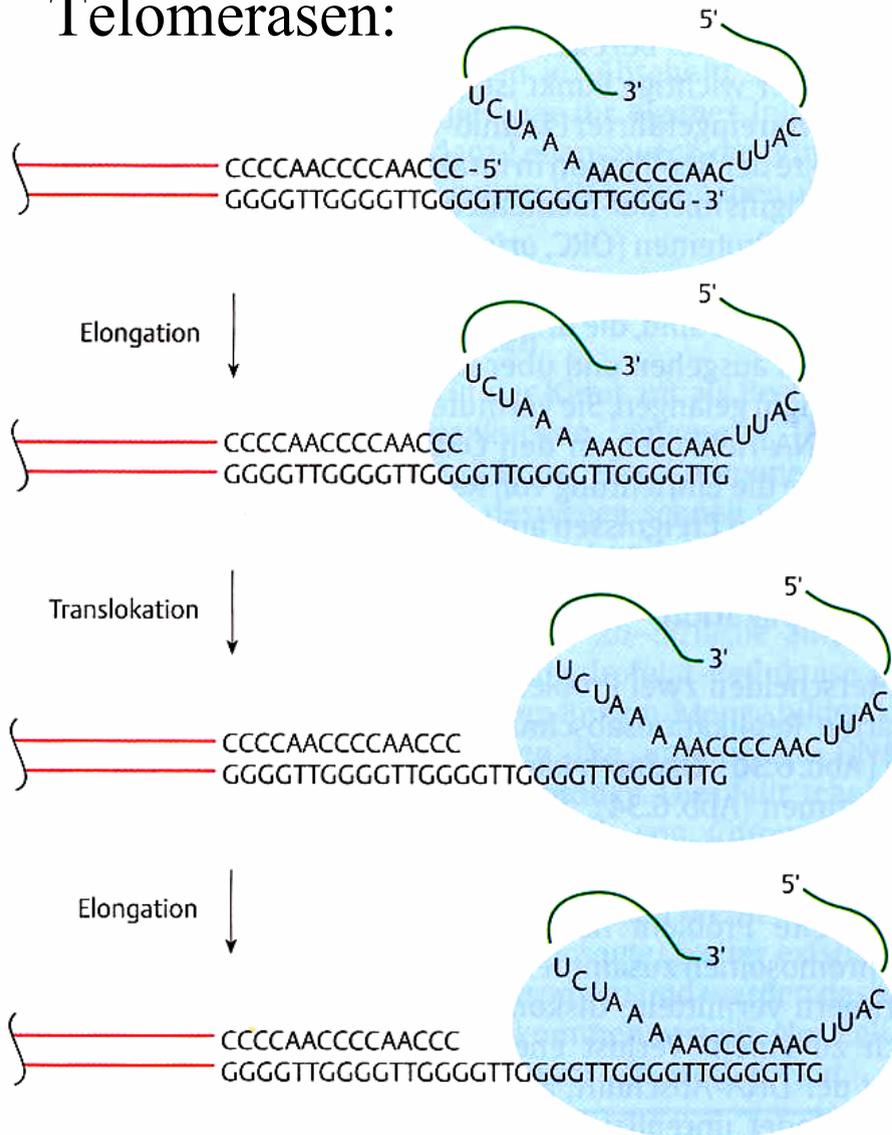
Verluste pro Zellteilung führen letztendlich zum unvermeidlichen Zellalterungsprozess

Telomerasen in Geschlechtszellen, Embryonalzellen, Tumorzellen und schnell proliferierenden eukaryontischen Einzellern



DNA-Replikation

Telomerasen:



Telomerasen:

Zwei funktionelle Teile: ein großer Proteinteil und eine 160 Basen lange RNA

RNA ist mobile Matrize für die Synthese von Telomerenden

- Bildung von Basenpaarungen der überhängenden Telomer-DNA und der Telomerase-RNA
- Deoxynucleotide werden an das 3'-OH Ende der DNA nach RNA-Matrizenvorlage angeheftet
- Translokation der Telomerase und Bereitstellung einer neuen Matrizen-Sequenz