

DAS BAKTERIEN-GENOM

Aufgrund von DNA -Sequenzvergleichen weiß man, dass sich die 3 Hauptabstammungslinien,

Bacteria,
Archaea und
Eukarya

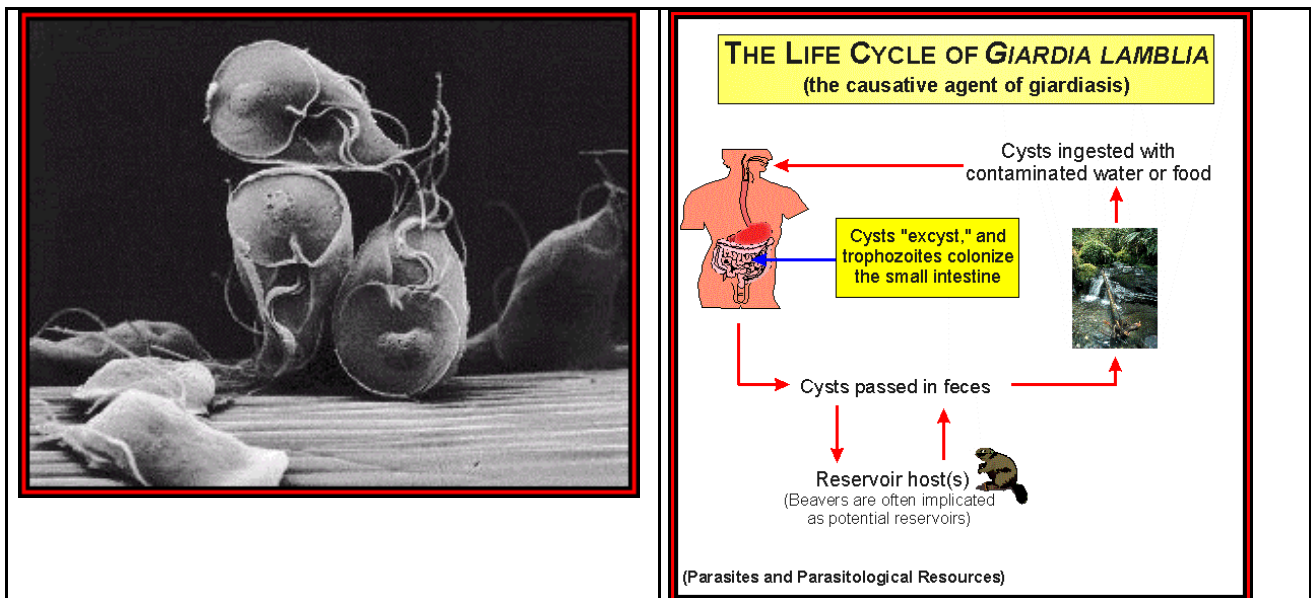
sich relativ früh in der zellulären Evolution auseinander entwickelten.

Zelluläre Evolution

Mrd. Jahre

- 4,5 Entstehung der Erde
- 3,5 Ursprung des Lebens
- 3,0 Entwicklung von
Bacteria
Archaea
kernhaltige Organismen
- 2,0 Cyanobacteria (oxygene photothrophe)
- 1,8 Ozonschicht (1 % O₂)
- 1,5 Ursprung moderner Eukaryoten
- 0,8 Ursprung der Metazoen (21 % O₂)
- 0,06 Dinosaurier
- 0,003 Homo sapiens

Wir wissen aber auch, dass die eukaryotische Zelle, wie wir sie heute kennen, sich strukturell von der primitiven eukaryotischen Zelle unterscheidet.



Die einfachen Eukaryotenzellen wie z.B. der Flagellat *Giardia lamblia* besitzt keine Organellen wie z.B. Mitochondrien oder Chloroplasten. Besitzt jedoch ein ER. Übrigens, dieser Flagellat ist medizinisch-geschichtlich der erste Mikroorganismus der von **Leuvenhoek 1681** als ein Krankheitserreger angesehen wurde, und zwar als Erreger von **Diarrhoe**. Er ist der einzige bekannte Flagellat, der im Menschen seinen **Hauptsitz im Dünndarm** hat, vor allem im vorderen Dünndarm. Seine Verbreitung ist

kosmopolitisch, die Befallsrate in warmen Ländern aber höher als in den übrigen Zonen.

Der Begriff Eucaryoten und Procaryoten wurde von dem franz. Biologen **Edouard Chatton** 1925 geprägt:

"eukaryotisch" und "procaryotisch".

Eukaryoten:

sind Organismen die einen strukturierten Zellkern besitzen und bei denen die Zelle durch Membranen in separate funktionelle Bereiche unterteilt ist: Mitochondrien, Chloroplasten, Liposomen, Golgy-Apparat. Zu den Eukaryoten gehören Tiere, Pflanzen, Protozoen, Pilze.

Man nimmt an, dass der eukaryotische Zellkern und Mitoseapparat mit zunehmender Genomgröße notwendig wurde. Die menschliche Zelle z.B. hat ein etwa 1000 mal größeres Genom als *E.coli* und man kann sich vorstellen, dass die DNA Replikation und eine geordnete Partitionierung der DNA bei diesem Riesengenom, das auch noch in Chromosomen unterteilt ist, einen umgrenzten Bereich erfordert. Mit zunehmender Höherentwicklung der Eukaryoten nimmt auch die sexuelle Vermehrung zu, in deren Folge es zur Kernverschmelzung, Rekombination und Meiose kommt.

Procaryoten:

Bakterien gehören in die andere Kategorie, weil sie keinen richtigen Zellkern besitzen und die DNA nicht in typische Chromosomen angeordnet ist.

Auch Mitochondrien und Chloroplasten, die als symbiontische Bakterien anzusehen sind, gehören dazu.

Endosymbiose

Es gibt Anhaltspunkte, dass die heute existierenden modernen eukaryotischen Zellen sich schrittweise entwickelt haben, indem sie chemoorganotrophe und phototrophe Prokaryoten als Symbionten aufgenommen, und zu Endosymbionten degradiert haben. Diese Theorie wird als **Endosymbiontentheorie** der eukaryotischen Evolution bezeichnet.

Mitochondrien:

Diese Theorie postuliert, dass ein aerobes Bakterium von einer primitiven Eukaryotenzelle aufgenommen wurde, die größere Eukaryotenzelle mit Energie versorgte und im Gegenzug dafür eine stabile geschützte Umgebung bei unmittelbarer Nahrungsquelle erhielt. Dieses aerobe Bakterium entspricht dem Vorgänger der heutigen Mitochondrien. Ein Vergleich der mitochondrialen DNA-Sequenzen mit den bakteriellen DNA-Sequenzen lässt vermuten, dass sich die Mitochondrien von einer kleinen Gruppe von Organismen ableiten, den heutigen

Agrobacterium, *A. tumefaciens*

Rhizobium, *R. leguminosarum* (Erbse) und den **PURPURBAKTERIEN**

Rickettsia, *R. prowazekii* (Fleckfieber, Zoonose) **PROTEOBACTERIA**

Diese Organismengruppe gehört zu einer größeren Gruppe von Bakterien, die als Purpurbakterien (dazu gehören *Rhodopseudomonas* und *Rhodobacter* = anaerobe, anoxigene phototrophe: H_2 , CO_2 + Licht) bekannt sind. Diese ganze Gruppe wird als **Proteobacteria** bezeichnet. Es ist bezeichnend, dass sich die Mitochondrien, die selbst

intrazelluläre Symbionten sind, sich von Organismen ableiten, die ebenfalls eine intrazelluläre Lebensweise aufweisen.

Chloroplasten:

In einer ähnlichen Weise wird von den späteren photosynthetischen Bakterien ein oxygener, phototropher Prokaryot aufgenommen, der die Eukaryotenzelle nicht mehr länger von organischen Verbindungen für die Energieproduktion abhängig macht. Der phototrophe Symbiont wird dann als Vorläufer der Chloroplasten angesehen. Wahrscheinlich leiten sich die Chloroplasten von den **Cyanobakterien** ab, das sind photosynthetisch aktive und Sauerstoff produzierende Prokaryoten.

Das Genom der Bakterien hat Drlika (1987) auch als **Nukleoid** bezeichnet. Der Ausdruck Nukleoid bedeutet dabei soviel wie "Nukleus-ähnlich" und weist bereits auf den fundamentalen strukturellen Unterschied in der Organisation des Genoms hin; bei Eukaryoten ist das Genom von einer Kernmembran umhüllt, bei Prokaryoten nicht.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten eines Bakteriums erscheint das Nukleoid im Bakterium als ein, etwa zentral gelegener, amorpher Körper mit lappigen Ausbuchtungen.

Obwohl das Bakterien-Genom nicht die kompakte Struktur eines eukaryotischen Chromosoms aufweist, hat sich heute eingebürgert, das Bakterien-Genom als **Bakterien-Chromosom** zu bezeichnen.

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Ultradünnschnittes einer sich in Teilung befindliche *E. coli* Zelle.

In Abhängigkeit von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit besitzen Bakterien 1 bis mehrere Bakterien-Chromosomen. Jedes Chromosom stellt ein komplettes Genom dar.

Die meisten Bakterien-Chromosomen sind ringförmige, kovalent geschlossene DNA-Moleküle. Das trifft z.B. für die Chromosomen der Gram-negativen *Escherichia coli* od. *Salmonella*, aber auch der meisten der Gram-positiven Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* zu.

Die Überraschung war jedoch groß, als man bei Streptomyceten (*Streptomyces coelicolor*) zeigen konnte, dass das Chromosom linear ist [Redenbach, 1996 #11]. Typischerweise sind an den Enden linearer Chromosomen lange invertierte Sequenzen, die vermutlich eine Rolle in der terminalen Replikation der Chromosomen spielen.

Am besten ist die Replikation des Chromosoms bei *E. coli* untersucht. Das Chromosom ist zirkulär und weist einen Umfang von 1,6 mm mit 4.720 kbp auf. Im Vergleich zur durchschnittlichen Größe des Bakterien-Genoms, ist das Genom des Menschen mit seinen 46 Chromosomen, ca 1000x länger.

Abb. 2: Die Summe der genetischen Information:

Wenn man die DNA-Sequenz aufschreiben würde, ergäbe das Bakterien-Chromosom mit seinen ca 3 Mio Basenpaaren (bp) ein Buch mit 1000 Seiten und jeder Seite 3000 Buchstaben. Das menschliche Genom mit seinen 3 Mrd. bp ergäbe eine Bibliothek mit 1000 Büchern.

Man muß sich auch vor Augen halten, dass das Chromosom der *E. coli* Zelle mit 1,6 mm Länge mehr als 1000x länger ist als das nur 1,2 µm lange Bakterium. Um in so einer kleinen Zelle Platz zu haben, muß der DNA-Faden zu einem hochstrukturierten DNA-Knäuel zusammengefaltet sein.

Abb. 3:

Isolierung und Entfaltung des Bakterien-Chromosoms aus *E. coli*, ein Größenvergleich im EM

- machen ca. 10 % des Zellvolumens aus;
- da eine 0,1 % ige DNA in einem Reagenzglas bereits in den Gelzustand übergeht,
- daraus folgt, dass die DNA im Bakterium in einem spezifischen physikalisch-chemischen Zustand sein muß;
- wenn Bakterien durch mechanische Mittel aufgebrochen werden, quillt die DNA aus den Zellen, "explodiert" als lange Stränge und verleiht dem Zellysate eine hohe Viskosität;
- in Anwesenheit von hoher Mg^{2+} Konzentration (0,1 M) jedoch, bleibt die DNA kompakt;
- aus Platzgründen superhelikale Aufwindung (super coil) der DNA;
- Verdopplungszeit kann bei optimalem Wachstum nur 20 min betragen;
- in dieser Zeit erfolgt auch die Verdopplung des Bakterienchromosoms.

Auch wenn wir heute einiges über die Synthese und Replikation der DNA wissen, so sind unsere Kenntnisse über die Zusammenfaltung (Assembly) des Bakterien-Chromosoms mangelhaft.

Bakterien sind haploid

Es gibt einige wesentliche Unterschiede zu dem Genom höherer Zellen, den Eukaryoten:

1. Bakterien sind in ihrem ganzen Lebenszyklus haploid (nur einfacher Chromosomensatz / keine Allele);
2. nahezu das ganze Genom wird für Genkodierung oder Regulation verwendet; kaum redundante DNA-Abschnitte;
3. es gibt keine den Eukaryoten entsprechenden Histone (basische DNA-Bindeproteine);
4. es besteht die Tendenz, dass die Gene in Operons zusammengefaßt sind;
5. die Gene sind normalerweise colinear;
Introns in bakteriellen Genen gibt es, sind aber sehr selten.

Andere bemerkenswerte, aber nicht notwendiger einzigartige Eigenschaften sind:

- a) häufig sind zusätzliche genetische Einheiten, wie z.B. Plasmide anwesend;
- b) auf beiden Strängen des Chromosoms treten etwa gleich häufig kodierende Sequenzen auf.

Haploidie:

Auch andere Organismen als Bakterien haben einen haploiden Genotyp, aber meist nur für einen Teil ihres Lebenszyklus (z.B. die Keimzellen höherer Pflanzen und Tiere).

Bei den Bakterien erstreckt sich die Haploidie über den gesamten Lebenszyklus.

Wie aber können wir die Bakterien als haploide Genotypen ansehen, wenn, wie wir bereits gesehen haben, die Bakterienzelle während optimalen Wachstums mehr als 1 Nukleoid aufweist, also mehrere (multiple) Chromosomen besitzt?

Eine diploide Eucaroten-Zelle enthält 2 vollständige Kopien seines Genoms, die es in der Vergangenheit durch Befruchtung, der Fusion zweier elterlicher, haploider Keimzellen (z.B. Eizelle und Samenzelle) mit anschließender Karyogamie erhalten hat. Bei der Zellteilung und der einhergehenden Mitose, gibt eine diploide Zelle, den doppelten Chromosomensatz an die Tochterzellen weiter. Die Folge davon ist, dass eine diploide Zelle heterozygot für ein bestimmtes Gene ist; es hat ein Allel auf einem und das andere Allel auf dem anderen Chromosom. Die Tochterzellen sind ebenfalls heterozygot.

Bei der Sichelzellanämie z.B. die auf einer Punktmutation in der β -Globinkette der roten Blutkörperchen beruht, gibt es

- a) homozygote Menschen bei denen beide Gene defekt sind, mit ausgeprägtem Krankheitsbild;
- b) heterozygote Menschen, mit kaum ausgeprägten Krankheitsbild (ein Allel ist mutiert, das andere nicht) und
- c) homozygote gesunde Menschen, keines der beiden Allele ist mutiert.

Eine Bakterienzelle mag während maximaler Teilungsgeschwindigkeit bis zu 4 Bakterien-Chromosomen aufweisen, aber nur deshalb, weil die DNA-Replikation schneller verlaufen ist als die Zellteilung. Die schnellwachsende Bakterienzelle ist deshalb als eine "Coenozyte" anzusehen (d.h. eine Zelle mit mehreren Genomen).

Diese Zelle hat identische Allele auf jedem Chromosom. Und sollte eine Mutation auf einem Chromosom stattfinden, aber nicht auf dem anderen, so wird spätestens bei der Zellteilung das mutierte Allel in die eine und das wt-Allel in die andere Tochterzelle übertragen.

Bei haploiden Organismen werden die Nachkommen immer homozygot sein, ganz gleich wieviele Chromsomen vorher vorhanden waren.

Welche Konsequenzen hat die Haploidie:

1. Jede Mutation hat sofort Konsequenzen, entweder zum Besseren oder zum Schlechteren; d.h. der natürliche Selektionsdruck kann sofort wirksam werden.

Replikation des Bakterien-Chromosoms

Das Bakterien-Chromosom trägt die Erbinformation die möglichst genau, aber auch nicht 100% ig genau, auf die Tochterzellen weitergegeben werden soll.

Ein zentrales Thema der Molekularbiologie ist die Aufklärung der Vorgänge bei der **Reduplikation** des Chromosoms. Wie bei so vielen zentralen Fragen der Molekularbiologie wurden die grundlegenden Erkenntnisse bei Bakterien, v.a. bei *E. coli* gewonnen. Da waren zunächst die Arbeiten der Elektronenmikroskopiker Kellenberger und Kleinschmidt und Kollegen. Sie entwickelten in den Jahren 1958 - 61 Einbettungs-

und Fixierungstechniken durch die die DNA in einer fibrillären Struktur erhalten werden und im EM sichtbar war.

Abb.: 4:

Autoradiogramm der chromosomalen DNA aus *E. coli*

Cairns (1963), wollte ebenfalls mit Hilfe der EM v.a. die **Länge** der Bakterienchromosomen messen. Er konnte **erstmalig elektronenmikroskopisch ein zirkuläres** Bakterien-Chromosom (aus *E. coli*) darstellen das sich im Stadium der Replikation befindet. Es ist eine berühmte Abbildung die in vielen Lehrbüchern gezeigt ist.

Die DNA wurde über 2 Generationen mit ^3H -Thymidin markiert und dann mit Hilfe von Lysozym aus der Zelle extrahiert. Er überschichtete die freigesetzte DNA behutsam mit einer autoradiographischen Emulsion. Nach etwa 2-monatiger Entwicklung konnte er die Konturen der DNA im Lichtmikroskop sehen.

Der Balken entspricht 100 μm Länge; die DNA ohne den replizierenden Teil beträgt ca 1,1 mm.).

-Die Aufnahme zeigt deutlich, dass das *E. coli* Chromosom zirkulär ist;

-es ist typischerweise eine Theta Q-Struktur sichtbar (Replikationsblase od. -auge)

Die chemischen Bausteine der DNA und die Doppelhelix

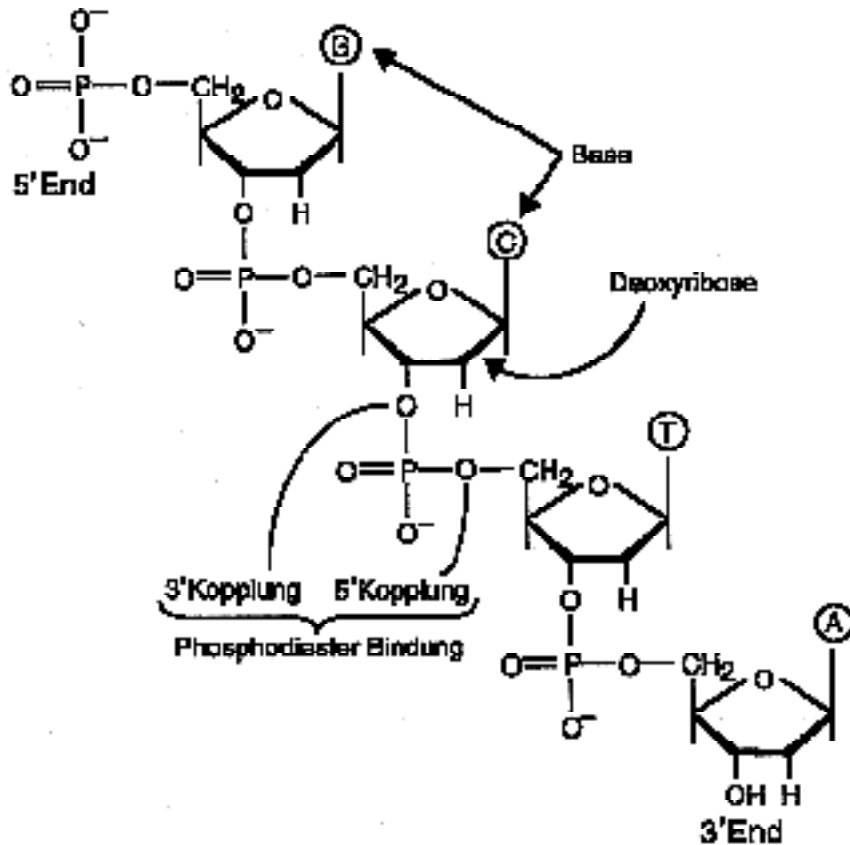
Abb.: Die chemischen Bausteine der DNA

-2-desoxy Ribonukleinsäure (2-desoxy Ribose -3' und 5' -Phosphat)

-die 5' \rightarrow 3' Polarität

-die 3' \rightarrow 5' Polarität

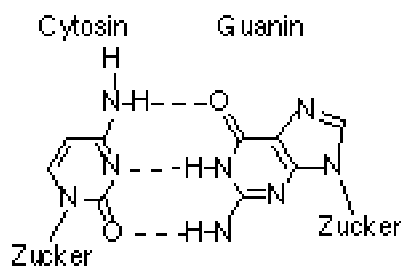
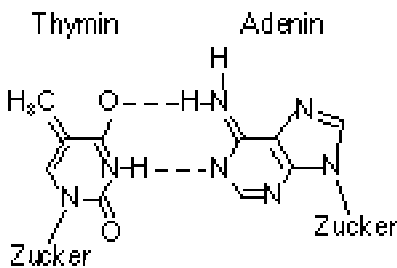
-die Gegenläufigkeit des Komplementärstranges (Watson & Crick, 1953; Prinzip der Doppelhelix);



- die Basen A,C,G,T mit ihren H-Brücken;
- die antiparallelen Stränge werden über die H-Brückenbindung, elektrostatisch, zusammengehalten;
- die Basen-Paarung erfolgt stets zwischen einer Purin- und Pyrimidinbase:

A::T
G::C

T::A
C::G



1952: E.Chargaff (Österr.Biochem.)

-entdeckt Gesetzmäßigkeit über quantitative Zusammensetzung der DNA (Chargaff-Regeln):

1. Die Basenzusammensetzung variiert zw. unterschiedlichen Arten;
2. Die Basenzusammensetzung innerhalb verschiedener Geweben der gleichen Art ist identisch;

3. Die Basen-Zusammensetzung innerhalb einer best. Art ist konstant und nicht von Alter, Ernährung od. Veränderung der Umgebung abhängig;
4. Die Anzahl der A = T und Anzahl der G = C; d.h. die Anzahl der Purinreste ist immer gleich der Pyrimidinreste;
5. Verwandte Arten haben eine ähnliche Basenzusammensetzung;

Die von Watson & Crick 1953 postulierte DNA-Doppelhelix ließ sich am besten mit den Chargaff'schen Regeln in Einklang bringen, da nach diesem Modell die beiden DNA-Stränge komplementär angeordnet sind.

Die selbstkomplementäre Eigenschaft des DNA-ds wurde als Grundlage für die identische Reduplikation der DNA angesehen.

Abb.: 6 Die DNA Struktur

- DNA als Doppelhelix;
- selbst in kleinen DNA-Molekülen sind die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix spiralg angeordnet - viele Male um sich gedreht - aufgewunden;

Abb.: 7

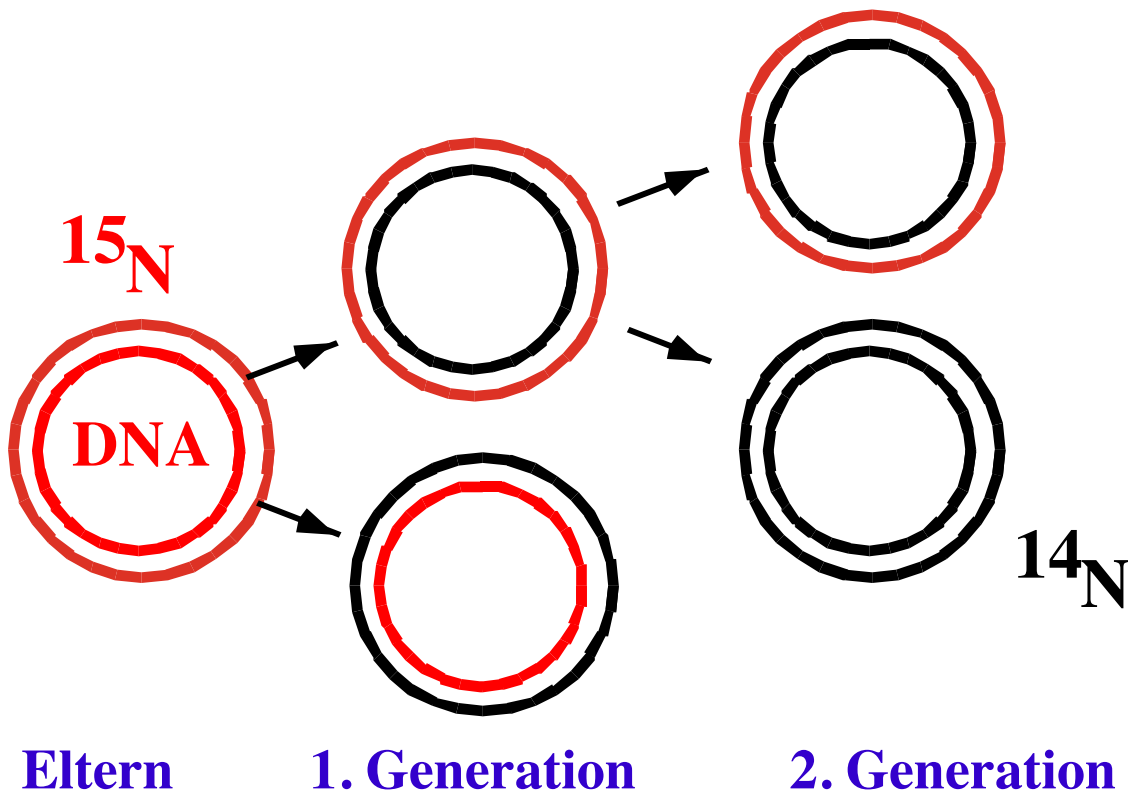
Eltern- und Tochterstränge im Bereich der Replikationsgabel aufgelöst in die molekularen Bestandteile

Postulate der DNA-Reduplikation:

1. Die H-Brücken sind zwar sehr spezifisch, aber doch rel. schwach; es sind keine bes. Enzyme notwendig sie zu bilden oder zu sprengen; die Kräfte die sie zusammenhalten sind elektrostat. Natur.
2. Für die Replikation ist eine Trennung der Eltern-Doppelstranges erforderlich;
3. Damit die beiden Stränge getrennt werden können ist eine Entspiralisierung nötig; die dadurch erreicht wird, dass die DNA im nicht-replikativen Bereich um die eigene Achse rotiert;
4. Die Basenpaarung ist eine der Grundlagen für die Genauigkeit der identischen Replikation;
 - a) eine Fehlpaarung von A : C tritt während der Replikation nur mit einer Häufigkeit von 10^{-8} gegenüber A : T - Paarung auf; die Fehlerquote bei G : C ist noch niedriger;
 - b) der Nukleotid-Selektions-Prozess erreicht jedoch niemals diese hohe Genauigkeit - (imino- od. enol-Tautomerieform führen zu einer Fehlpaarung von 10^{-4});
 - c) heute wissen wir, dass die hohe Genauigkeit 10^{-8} bis 10^{-12} durch das Korrekturlesen erreicht wird.

5. Die Replikation erfolgt nach dem semikonservativen Mechanismus (dispersiv-, konservativ-); Aufklärung durch Meselson & Stahl 1958 ($^{14}/^{15}$ N-Markierung der DNA und Auftrennung von Eltern- und Nachkommen-DNA im Dichtegradienten).

Semikonservativer Mechanismus der DNA-Replikation



$^{15}/^{14}\text{N}$ - Markierung der DNA Meselson & Stahl (1958)

DNA-Replikation

Am besten ist bislang die Replikation des Chromosoms bei *E. coli* untersucht. Das Chromosom ist **zirkulär** und weist den Umfang von **1,6 mm** mit **4720 kbp** auf. Die DNA-Sequenz ist vollständig bekannt (Blattner et al. (1997). **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12**. Science 277, 1453-1474.

Was geschieht an der Replikationsgabel, welche Enzyme sind hier wirksam?

Man postulierte, dass jeder der 2 Stränge eines elterlichen DNA-Moleküls als Matrize ("template") für die komplementäre Synthese der Tochter-DNA dient.

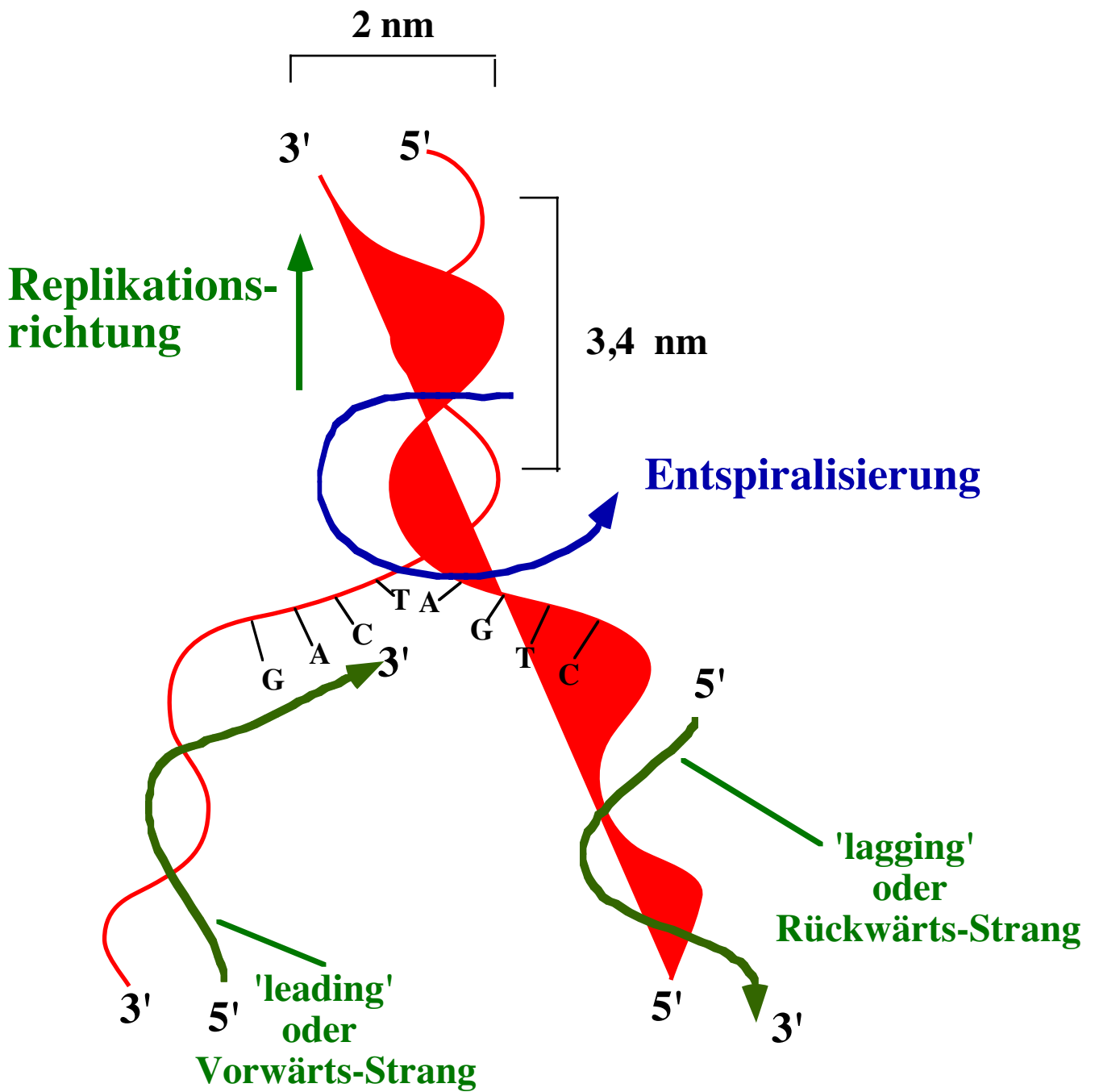


Abb. 7 Entspiralisierung im Bereich der Replikationsgabel in Replikationsrichtung

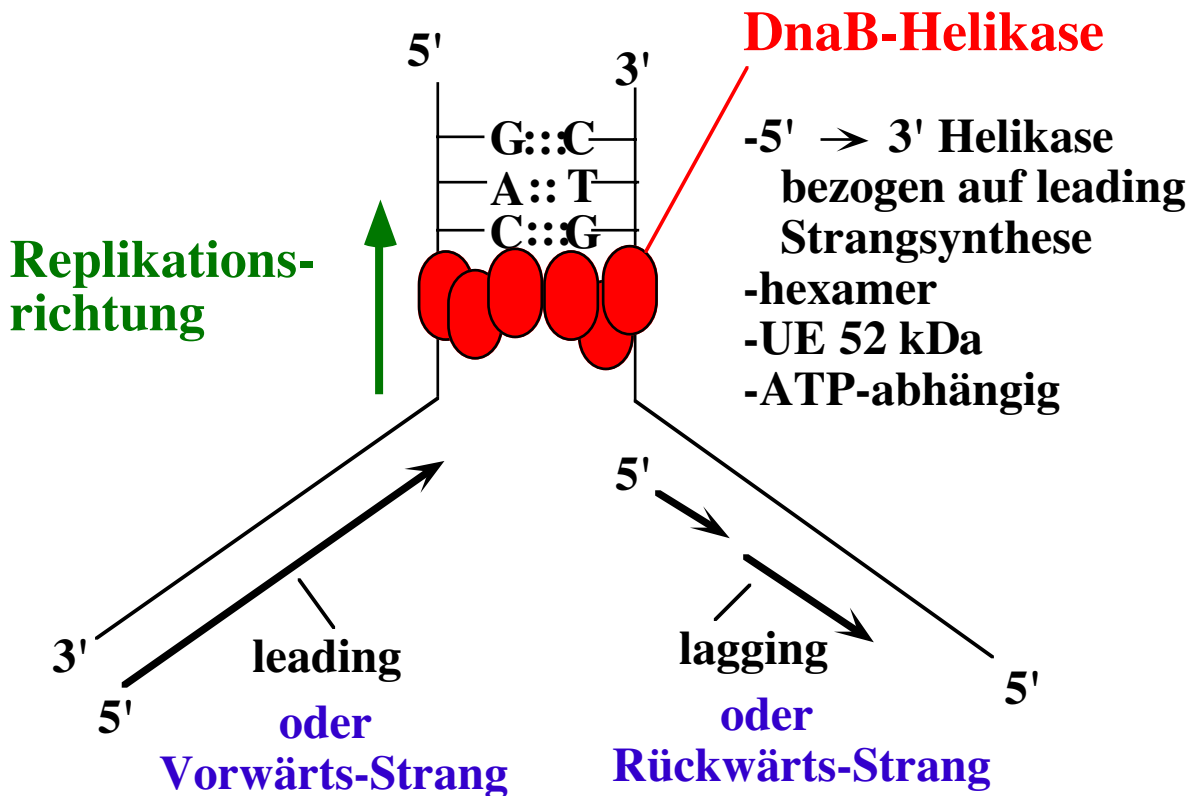
1. Heilikasen winden die DNA-Doppelhelix entlang der Replikationsgabel auf

-Die Doppelhelix würde an der Replikationsgabel durch eine nur spontane Reaktion viel zu langsam aufgewunden.

-Um die Strangtrennung zu erleichtern besitzen die Zellen eine eigene Klasse von Enzymen, die als Helikasen bezeichnet werden. Die erste DNA-Helikase wurde von

Hoffmann-Berling (1976) in *E. coli* gefunden. Mittlerweile sind mehr als 10 DNA-Helikasen in *E. coli* nachgewiesen.

Abb.: 8
Die DnaB-Helikase



DnaB:

- Replikationsgabel-Helikase (5' → 3' Richtung bezogen auf leading Strangsynthese);
 - hexamer; UE 52 kDa;
 - es hat allosterische und katalytische ATP-Bindestelle;
 - für die Helikase-Aktivität wird ATP hydrolysiert (ATPase);
 - die Umsetzung von ATP zu ADP bewirkt vermutl. Konformationsänderungen, die eine propellerartige Bewegung der Helikasen um die Doppelhelix und in Replikations-Richtung bewirkt; DnaB öffnet die Doppelhelix wie einen Reißverschluß;
 - die Bindung an Es- oder Ds-DNA wird durch allosterische ATP-Bindung gefördert;
 - die Aufwindungsgeschwindigkeit beträgt *in vitro* ca 1000 bp/ Sec bei 37°C;
- | | |
|--|--------------|
| das <i>E. coli</i> Chromosom hat 4.720 kbp | |
| 60 | kbp / Min |
| 600 | kbp / 10 Min |
| 1.200 | kbp / 20 Min |

DnaB ist Teil des Primosoms:

-DnaB geht mit DnaC (Chaperon) einen stöchiometrischen Komplex ein, wozu ATP notwendig ist;

2. Topoisomerasen

Problem bei der Aufwindung der DNA:

Wenn beide Stränge intakt sind, führt die Aufwindung eines nur kleinen Abschnittes der DNA in der Gegenrichtung zu einer Überdrehung der Doppelhelix, d.h. mehr Windungen pro Längeneinheit:

Abb. 8a:

Positiv-supercoil-DNA entsteht im Vorfeld der Replikationsgabel

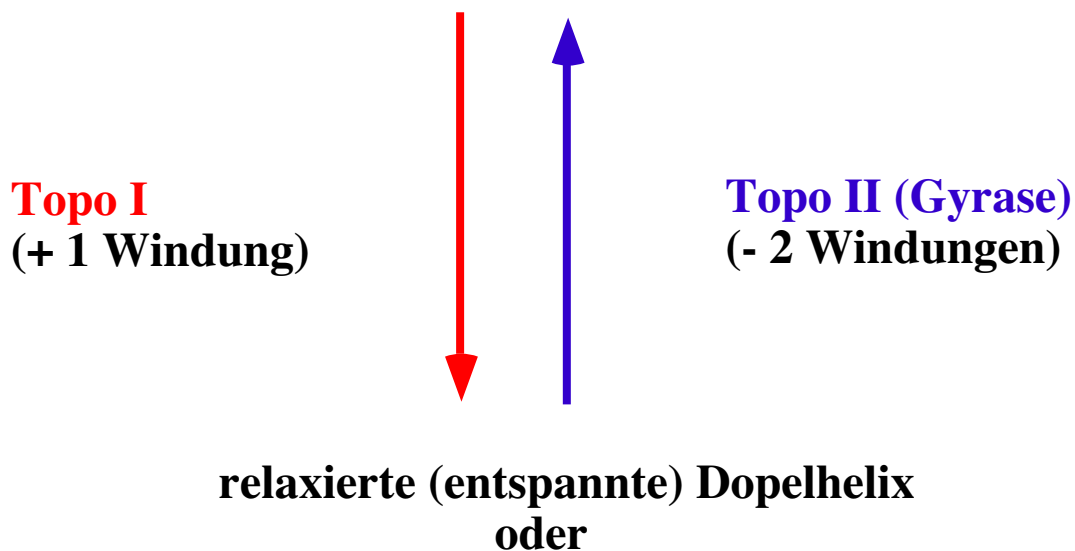
Es wurden daher Enzyme postuliert, die Einzelstrang-Schnitte ("nicks") in den beiden Strängen setzen.

Topoisomerasen sind sog. "nicking-closing" Enzyme, die die DNA stärker verdrillen oder relaxieren (entspannen) können.

Abb. 9

Topoisomerasen

**(-) superhelikale Doppelhelix (Normalzustand)
(unterwundene)**



**(+) superhelikale Doppelhelix
(überwundene)**

Tabelle: 1. **DNA-Topoisomerasen von *E. coli***

	Topo I	Topo II (Gyrase)
MG (kDa):	100	400
Untereinheiten	monomer	tetramer (A ₂ B ₂)
Gen	<i>topA</i>	<i>gyrA</i> (Inhibitoren: Nalidixin- u. Oxolinsäure) / AB: F-Chinolon) <i>gyrB</i> (Inhibitoren: Coumermycin u. Novobiocin / AB: <u>Ofloxacin</u> und <u>Ciprobay</u>)
Relaxation:	+	+
Bildung negativer Superhelices	-	+ (mit ATP)
Bildung positiver Superhelices	+	-

lat. *gyratus*: gewunden, geschlängelt;

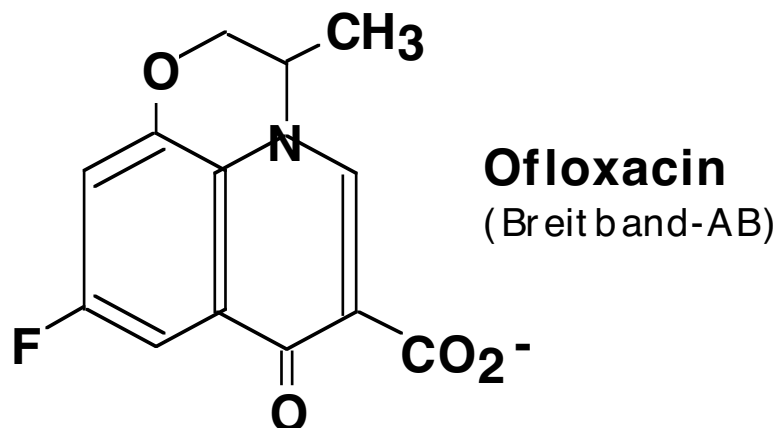


Abb.: 10
Topoisomerase I Wirkungsmechanismus

Topo I:

Führt über einen Es-Bruch mit anschließender Ligation eine zusätzliche Windung in die helikale DS-DNA; die Bedeutung liegt in der Relaxation (Entspannung) einer hoch (-) superhelikaler DNA-Moleküle; es reagiert nicht mit (+) superhelikaler DNA.

Abb.: 11

Topoisomerase II (Gyrase) Wirkungsmechanismus

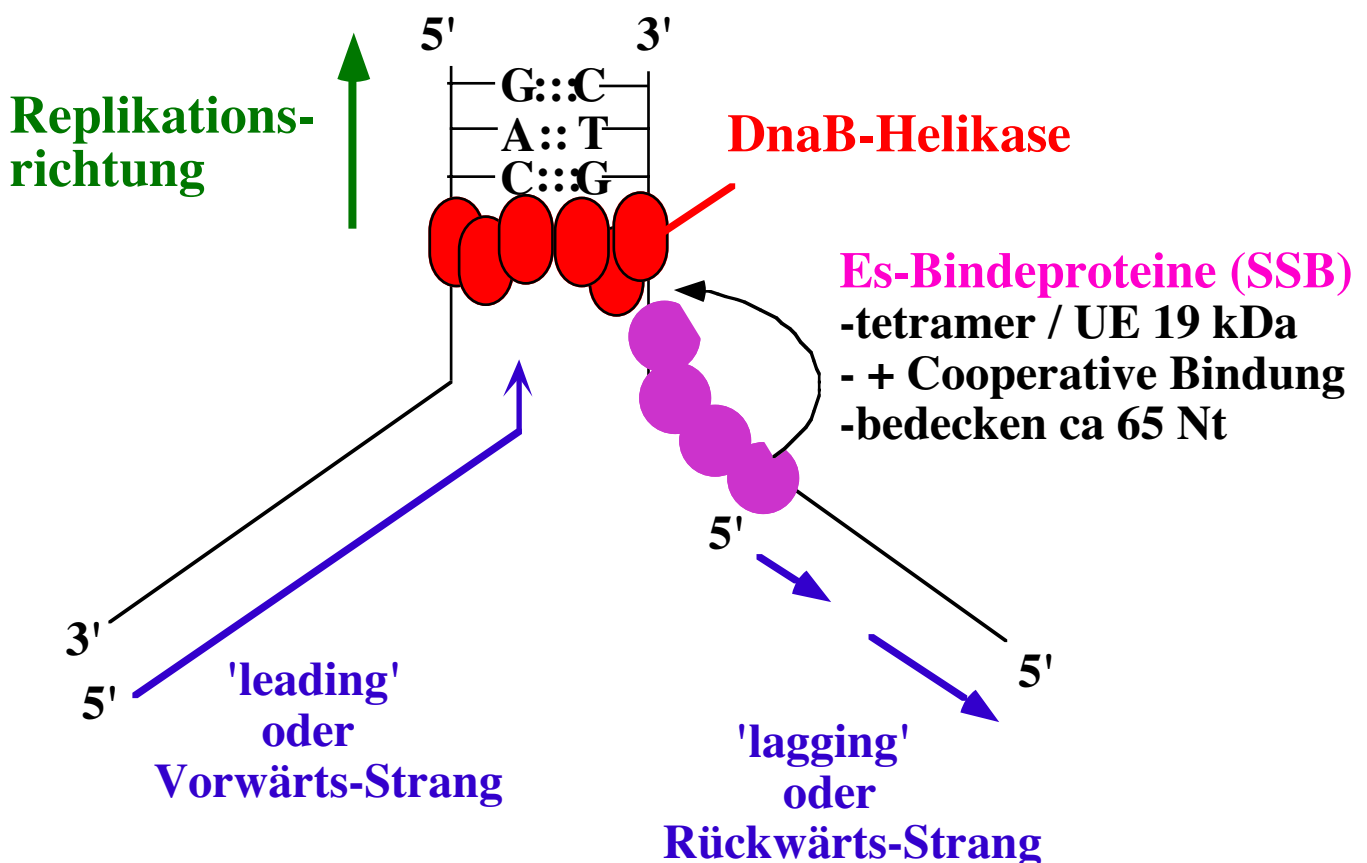
Topo II (Gyrase):

Bewirkt bei einem relaxierten zirkulären DNA-Molekül eine (-) superhelikalen Anordnung indem die Zahl der Windungen pro Längeneinheit verringert wird; hierzu ist ATP notwendig. Im Unterschied zu Topo I entsteht ein Doppestrang-Bruch der anschließend religiert wird. Topo II spielt auch eine Rolle bei der homologen Rekombination.

3. Stabilisierung der Es-DNA Regionen durch Es-Bindeproteine (SSB)

Abb. 12:

Einzelstrang-Bindproteine



-Die durch die Helikase neugeschaffenen Einzelstrang (Es)-Regionen, v.a. bei der "lagging"-Strang-Matrize, werden diese rasch durch spezifische Es-DNA-Bindeproteine (SSB; *ssb*) bedeckt.

-Sie haben keine erkennbare enzymatische Funktion.

- Das Haupt-SSB in *E. coli* ist ein Protein
 - a) mit 177 AS
 - b) Tetramer
 - c) bedeckt ca 65 Nukleotide
 - d) Cooperative Bindung

Die SSB bewirken, dass

- a) die Es-DNA-Region gestreckt wird,
- b) spontane Basenpaarung und die Ausbildung von Haarnadel-Strukturen durch Zurückschnappen einer komplementären Es-Region verhindert wird;
- c) geringere Fehlerquote bei der DNA-Synthese.

4. Synthese von RNA-Primern (Primosom)

- Als die verschiedenen DNA-Polymerasen besser charakterisiert waren, stellte sich heraus, dass sie nur an das 3' Ende einer bereits existierenden Nukleotidkette die komplementäre Nukleotidsynthese fortsetzen können.
- Keine der bekannten DNA-Polymerasen kann *de novo* einen Komplementärstrang synthetisieren, also eine neue DNA-Ketten initiieren.
- Es stellte sich dann heraus, dass fast jede DNA-Neusynthese durch sog. RNA-Primer gestartet wird; das sind kurze zum Elternstrang (Matrizenstrang) komplementäre RNA-Sequenzen.
- Die klassische RNA-Polymerase, die normalerweise in der Zelle DNA in RNA transkribiert, dient im allgemeinen bei der Reduplikation des Bakterien-Chromosoms nicht als RNA-Primer.
- Die Primer werden durch ein spezielles Enzym, die Primase, die in einem Multienzymkomplex eingebettet ist, synthetisiert.

Eigenschaften der Primase (DnaG)

Primase (DnaG):

- stellt die zelluläre Primase dar und weist ca 50 - 100 Kopien pro Zelle auf;
- ist als Monomer (65 kDa) aktiv;
- in vivo* benötigt DnaG die Helikase DnaB für volle Aktivität und das Priming von Es-DNA;
- bei erhöhter Enzymkonzentration (10 nM → 1 mM) ist *in vitro* DnaB nicht notwendig;

Zusammensetzung des Primosoms (7 Proteine beteiligt)

Protein	Funktion	Gen	Phänotyp v. Mutanten
DnaB	5' → 3' Helikase	<i>dnaB</i>	sofortiger Stop
DnaC	bindet an DnaB	<i>dnaC</i>	"
DnaG	Primase	<i>dnaG</i>	"
DnaT	Primosom-Zusammenlagerung (Assembly)	<i>dnaT</i>	langsamer Stop
PriA	3' → 5' Helikase und Assembly	<i>priA</i>	induziert SOS
PriB /PriC	Assembly	<i>priB/ priC</i>	?

aus: Marians, K. J. 1996. Replication fork propagation. 749-763. In: F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. Vol., ASM Press, Washington, D.C.

- Die Primase (DnaG) erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz am Elternstrang v.a. desjenigen der als Matrize für die lagging (Folgestrang)-Strangsynthese dient;
- das RNA-Transkript ist nur 10-12 Nukleotide lang;
- die Erkennungssequenz ist für die verschiedenen Primasen unterschiedlich;
- die volle Aktivität wird nur im Verband mit 6 weiteren Untereinheiten erreicht, die im **Primosom** vereinigt sind;
- das Primosom wandert an der Folgestrang (lagging-Strang)-Matrize in 3' → 5' - Richtung um hier den Tochterstrang zu initiieren, zu "primen".

Das Primosom muß:

- a) die Startsignale erkennen und
- b) die Polymerisierung der 10-12 Ribonucleotide durchführen.

E. coli: Erkennung: 3' -G-T-C
 Primer: **PPP-A-G-(N)₉**

Die -G-T-C -Sequenz taucht statistisch etwa alle 65 Nucleotide im Matrizenstrang auf.

Erkennungssequenzen verschiedener Primasen

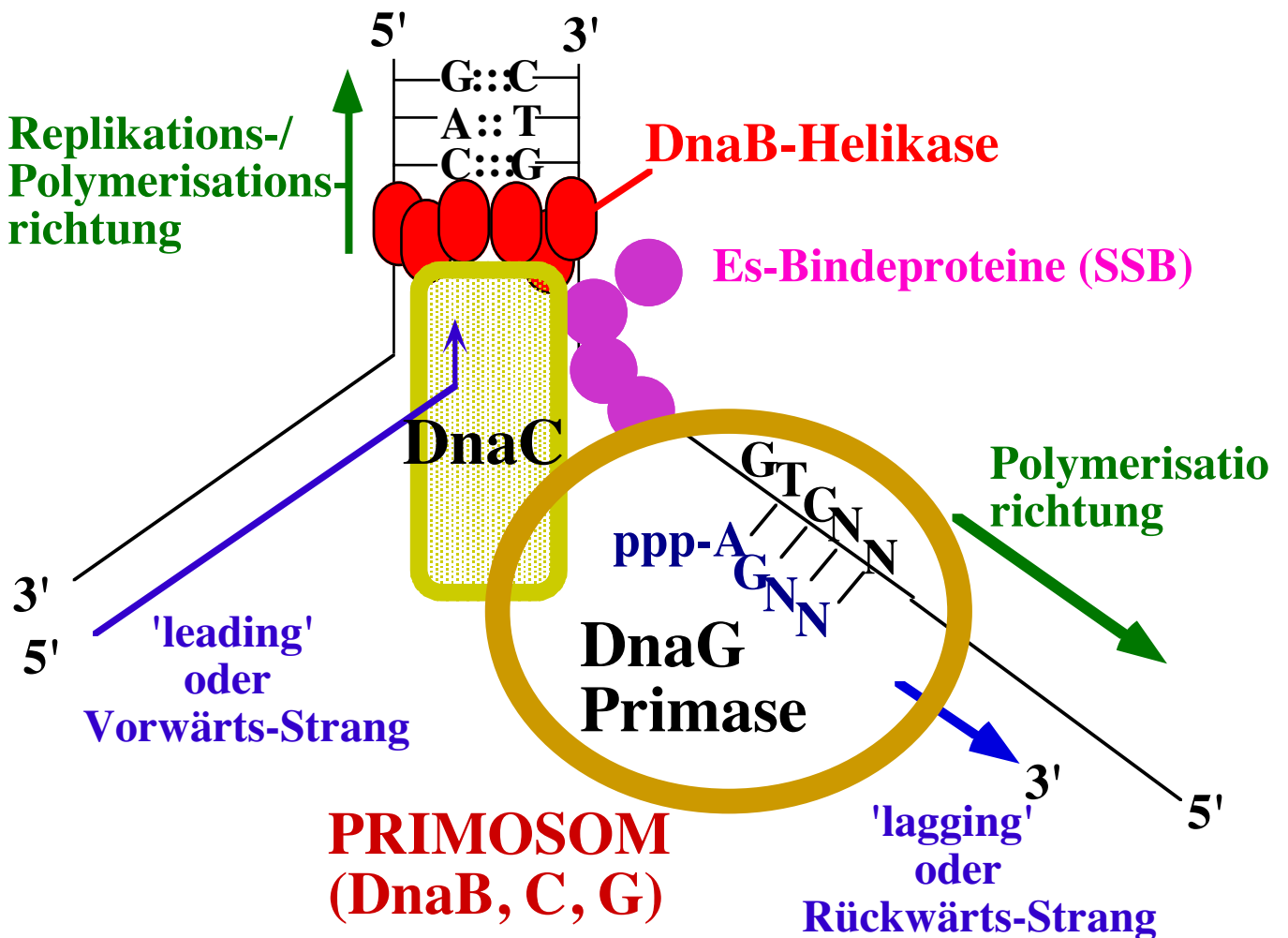
Organismus bzw. Bakteriophagen	Gene für Primase	Erkennungssequenz	Länge der Primer-RNA (Nt)
T7	Gen 4	3' CTG pppAC(N) ₂₋₃	4-5
<i>E. coli</i>	dnaG/dnaB	3' GTC pppAG(N) ₉₋₁₂	11-14
Säuger (SV40)	DNA-Polymerase alpha	3' CCTT pppGAA(N) ₅₋₇	8-10

Harrington, C., and F. W. Perrino. 1995. Initiation of RNA-primed DNA synthesis *in vitro* by DNA polymerase alpha-primase. *Nucl. Acids Res.* 23:1003-1009.

Kusakabe, T., and C. C. Richardson. 1997. Gene 4 DNA primase of bacteriophage T7 mediates the annealing and extension of ribo-oligonucleotides at primase recognition sites. *J. Biol. Chem.* 272:12446-12453.

Swart, J. R., and M. A. Griep. 1995. Primer synthesis kinetics by *Escherichia coli* primase on single-stranded DNA templates. *Biochemistry.* 34:16097-16106.

Abb.: 10 PRIMOSOM



[Kornberg, 1988 #16]

Die Helikase (DnaB) und die Primase (DnaG) beides Bestandteil eines Multienzymkomplexes, des Primosoms, bewegen sich in entgegengesetzter Richtung. Ein Modell, auf das später noch eingegangen wird, löst dieses Problem.

5. Die DNA-Polymerasen

3 Typen an DNA-Polymerasen in *E. coli*

- Bei *E.c.* gibt es mindestens 3 unterschiedliche DNA-Polymerasen;
- 2 davon spielen eine definierte Rolle bei der DNA-Replikation.
- Während man lange Zeit glaubte, Pol-I ist das Hauptenzym das die Nukleotide verknüpft, weiß man jetzt, dass es Pol-III ist.
- Pol-I füllt nur die Lücken, die zwischen den von Pol-III synthetisierten Okazaki-DNA Fragmenten und dem nächstfolgenden RNA-Primer, aus. Diese Lücken entstehen während der "lagging" Strangsynthese.

- Pol-II hat keine erkennbare Aufgabe in der Replikation.
- alle bisher bekannten Formen der DNA-Polymerasen können die Polymerisation nur in 5' → 3' Richtung durchführen;
- DNA-abhängige DNA-Polymerasen sind die einzigen Enzymtypen, die mit Matrizen-DNA als Vorlage einen zu dieser komplementären DNA-Strang synthetisieren;
- Die enzymatische Reaktion, die von den DNA-Polymerasen katalysiert wird, ermöglicht nur die Anheftung eines dNTP an ein freies 3'-OH Ende eines komplementären DNA-Stranges.

Tab.: Eigenschaften der DNA-abhängigen DNA-Polymerasen aus *E. coli*

	Pol I	Pol II	Pol III
Funktionen:			
Polymerisation: 5' → 3'	+	+	+
Exonuklease: 3' → 5' (Korrektur)	+	+	+
Exonuklease: 5' → 3'	+	-	-
		(Reparatur)	
Allgemeines:			
MG (kDa)	109	120	760
Moleküle/Zelle	400	120	10-20
Umsatzrate**	1	0,05	15
Gene	polA	polB	dnaE, N, Z usw.
condit. Mutanten	+	-	+

** (Nt polymerisiert/min/enzym, relativ zu Pol I (ca. 600)

1, 600 Nt/Min.

400 x 600 = 240.000 Nt/min

4,8 Mio Nt/20 min

E.c. Chromosom hat ca 4,7 Mio Bp

Abb.: 11

EM-Aufnahme von Eltern- und Tochter-DNA an der Replikationsgabel

Abb.: 12

Leading- und Lagging-Strang und Okazaki-Fragmente und Kettenverlängerung

1. Jeder Strang wird in 5' → 3' Richtung polymerisiert;
2. Die Polymerisation am "leading" Strang verläuft von 5' → 3' Richtung und damit in Replikationsrichtung;
3. Im Gegensatz dazu verläuft die Polymerisation am "lagging" Strang entgegengesetzt zur allgemeinen Replikationsrichtung;

4. Dadurch kommt es zu einer Verzögerung in der Polymerisationsgeschwindigkeit am "lagging" Strang im Vergleich zu der des "leading"-Stranges; (daher auch der Name engl. **lagging** = verzögern)
5. Diese Verzögerung wird im **EM -Aufnahmen** als eine es-Region des elterlichen Stranges an der Replikationsgabel sichtbar;
6. Die DNA-Pol. III polymerisiert nahtlos an das 3'-Ende der kurzen RNA-Primer den komplementären DNA-Tochterstrang;
7. die Polymerisation erfolgt solange, bis Pol-III an eine vorhergehende Primer-Region oder DNA-Region kommt; Pol-III hat **keine 5' → 3' Exonukleaseaktivität**;
8. dadurch entstehen bei der "lagging" -Strangsynthese je nach Abstand der Primer 60 - 2000 Nucleotide lange DNA-Fragmente, die nach ihrem Entdecker als **Okazaki-Fragmente** bezeichnet werden.
9. Die Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten werden durch die DNA-Pol. I und einer DNA-Ligase geschlossen; so dass auch der "lagging" Strang ohne Unterbrechung und komplementär zum Elternstrang verläuft.

Das Korrekturlesen

3' → 5' - Exonuklease-Aktivität (Korrekturlesen)

-Korrektur von Nukleotid-Paarungsfehlern

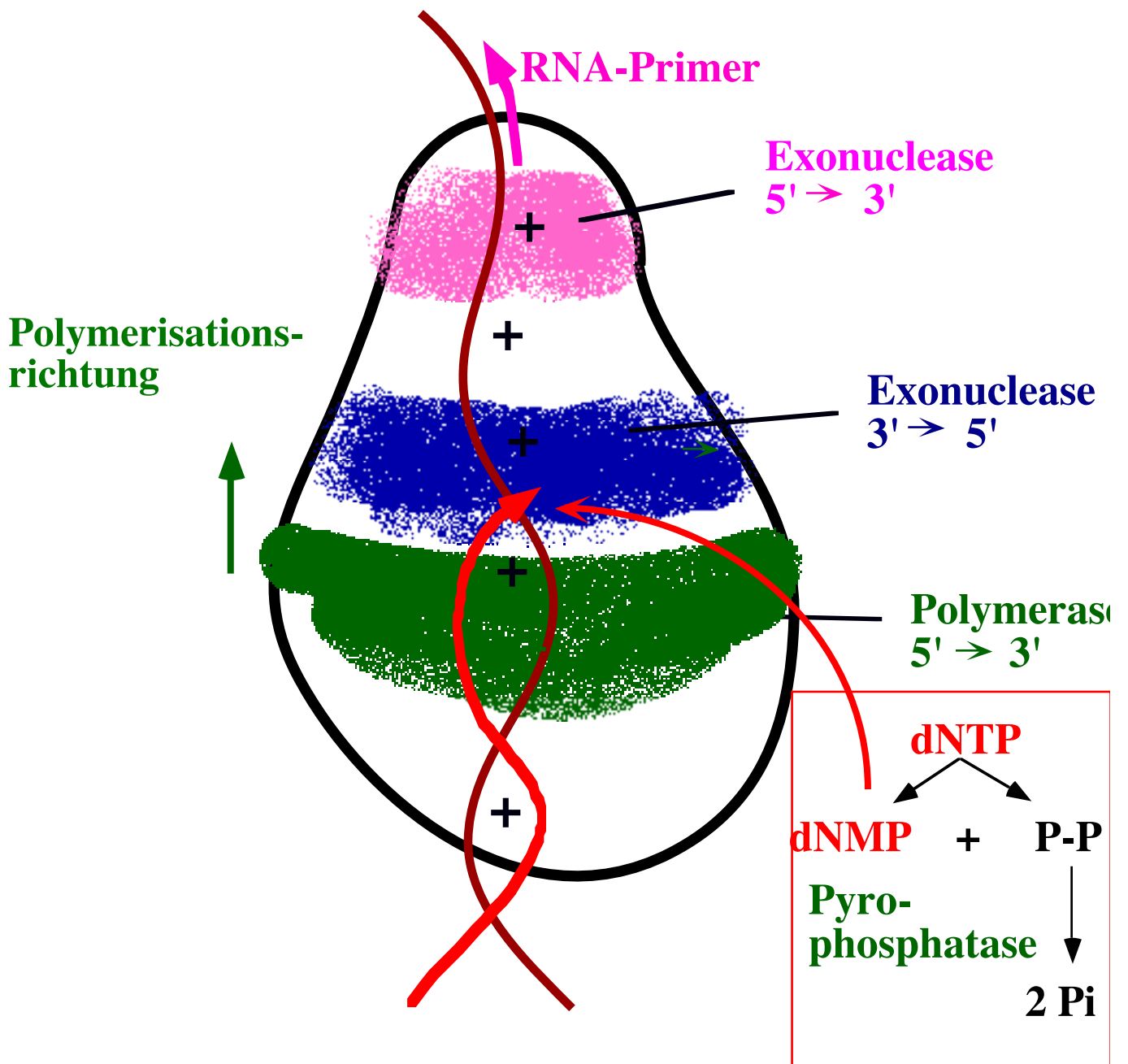
- Alle 3 Polymerasen haben 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität als auch Polymerase-Aktivität;
- Die 3' → 5' Exonuklease ermöglicht ein Zurückschneiden eines gerade eingebauten Nukleotides - vor allem bei nichtkomplementären Nukleotiden - die zu einem "mismatch" führen;
- Auf diese Weise wird verhindert, dass das nächste Nukleotid an ein falsches angehängt wird;
- Bei sehr geringer dNTP - Konz. kann die Exzision auch weitergehen;
- Bei Anwesenheit von bereits leicht erhöhter dNTP-Konz. dominiert die Polymeraseaktivität;

Die Wirkungsweise der DNA-Polymerasen

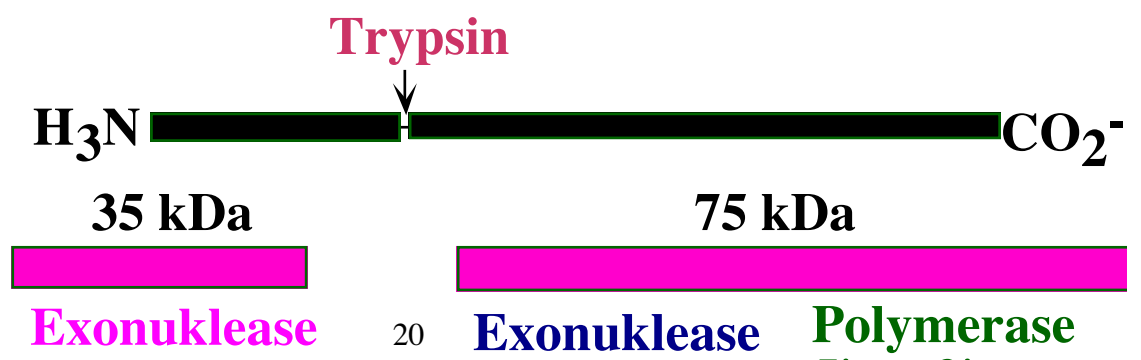
-Hat die DNA-Pol. begonnen an die wachsende Kette Nukleotide anzuheften, so bleibt sie an die DNA gebunden und verknüpft so lange neue Nukleotide, bis ein Signal zum Verlassen der DNA erscheint.

-Wie diese fortschreitende Polymeration erfolgt, war lange Zeit ein Rätsel; - erst als man 1985 die erste 3d Struktur des sog. **KLENOW-Fragmentes** der Pol-I (das große C-terminale Fragment) aufklärte, konnte man sich eine Vorstellung von der Bindung des Enzyms an die DNA machen.

Raummodell von Pol-I



Entstehung des Klenow-Fragmentes (früher DNA-Sequenzierung)



-Im Gegensatz zur intakten Pol-I hat das **KLENOW-Fragment** Polymerase- und 3' → 5' - Exonukleaseaktivität aber keine 5' → 3'-Exonukleaseaktivität mehr. Das KLENOW-Fragment wurde früher v.a. bei der DNA-Sequenzierung nach Sanger verwendet.

Das Fragment besitzt 3 Domänen:

- a) die größere Domäne besitzt eine tiefe, (+)-geladene Furche mit etwa 20 Å Durchmesser welche mit der (-)-geladenen DNA in Wechselwirkung tritt;
- b) bei der kleineren Domäne handelt es sich um die Nukleotid-Binderegion;
- c) eine flexible (schwenkbare) Protein-Domäne verschließt die Furche nachdem die DNA gebunden hat;

-Bildhaft ausgedrückt entspricht die halbfertige Doppelhelix einer Schiene auf der die Polymerase wie eine Lokomotive entlanggleitet und gleichzeitig den Komplementärstrang synthetisiert.

-Wird bei dem Entlanggleiten der Pol I ein nicht-komplementäres Nukleotid eingebaut, so kommt es zu einer Deformation ("mismatch") der Doppelhelix und das Vorwärtsgleiten der DNA Polymerasen wird dadurch beeinträchtigt.

-Die DNA-Polymerasen können nur noch zurückgleiten und dadurch kommt die fehlerhafte Region in Kontakt mit der 3' → 5' -Exonuklease-Domäne (Korrektur-Domäne), welche das nicht-komplementäre Nukleotid herausschneidet.

Funktion der DNA-Polymerase-I

-Die Entfernung der RNA-Primer erfolgt später durch Pol-I dessen Hauptaufgabe die Auffüllung der Lücken-Regionen zwischen den Okazaki-Fragmenten ist.

-Hierfür ist die an vorderster Front und in Polymerisationsrichtung gelegene 5' → 3'-Exonucleaseaktivität der Pol-I verantwortlich;

-Es können sowohl RNA- als auch DNA-Sequenzen entfernt werden.

-Diese Aktivität spielt v.a. auch eine Rolle bei der Korrektur von Strahlungsschäden (z.B. TT-Dimere durch UV-Strahlung);

Warum werden RNA-Primer verwendet?

-RNA-Primer könnten die Fehlerhäufigkeit bei der Initiation der DNA-Synthese herabsetzen;

-Vielleicht handelt sich auch um ein Relikt der Evolution; möglicherweise war bei den ersten zellulären Formen nicht DNA sondern RNA die Erbträger (z.B. RNA-Viren (M13 oder HIV));

-RNA besitzt auch katalytische Aktivität, wie wir bei den Ribozymen noch sehen werden.

Die DNA-Pol-III ist ein Multienzymkomplex

-Sie besteht aus 10 verschiedenen Proteinen (inklusive Assembly-Proteine).

Das Holoenzym besitzt:

- a) 5' → 3' Exonukleaseaktivität

- b) 3' → 5' "
- c) 1 UE bindet ATP; wird benötigt um die Synthese am Ende der RNA-Primer zu starten; die Funktion der Untereinheiten ist zum großen Teil unbekannt.
- d) die Zahl der Holoenz. in E.c. ist rel. gering (10 - 20)

-Man stellt sich vor, dass 2 Holoenzyme an der Replikationsgabel vorhanden sind - beide Holoenzyme sind verbunden;
 -Das eine Holoenzym synthetisiert den "leading" Strang; das andere den "lagging" Strang.

Abb.: 14
Schleifen-(loop)- MODELL:

An jedem Elternstrang ist ein Pol-III - Holoenzym

- a) die Matrize für den "lagging" Strang bildet eine Schleife zum Pol-III - Holoenzym;
- b) die Polymerisierung erfolgt in der gleichen Richtung wie der "leading" Strang;

Ablauf der Reaktionen:

1. Synthese der RNA-Primer durch das Primosom;
2. Verlängerung der RNA-Primer durch Pol.-III;
3. Wenn Pol-III in die Nähe des vorhergehenden RNA-Primers kommt, lockert sich die Schleife und das Produkt, die "lagging" Strang-Matrize, löst sich vom Pol-III - Holoenzym;
4. Mittlerweile hat Pol-III den "leading" Strang weiterpolymerisiert und dadurch an der "lagging"-Strang-Matrize eine Es-Region geschaffen; -
5. Dies ermöglicht erneut die Schleifenbildung und die Synthese des nächsten RNA-Primers.
6. Bei diesem Mechanismus wandern beide Pol-III-Holoenzyme etwa gleich schnell.
7. Das Primosom wird mit der replizierenden DNA mit der gleichen Geschwindigkeit transloziert wie Pol-III.

Der Komplex aus DNA-polymerisierenden und -replizierenden Enzymen hat fast die Größe eines Ribosoms und wird daher auch als **Replisom** bezeichnet. Es setzt sich zusammen aus:

- a) 2 DNA-Polymerase-III-Holoenzyme
- b) das Primosom mit Helikase (DnaB)

Tabelle:
Übersicht über Proteine die an der DNA-Replikation in E. coli beteiligt sind

Abb. 15:
Genkarte von E. coli mit Genen die an der Replikation beteiligt sind:

DER ORIGIN

Initiation der Chromosomenreplikation bei *E. coli*

Abb.: Chromosomenkarte von *E. coli* mit Origin- und Terminations-Region

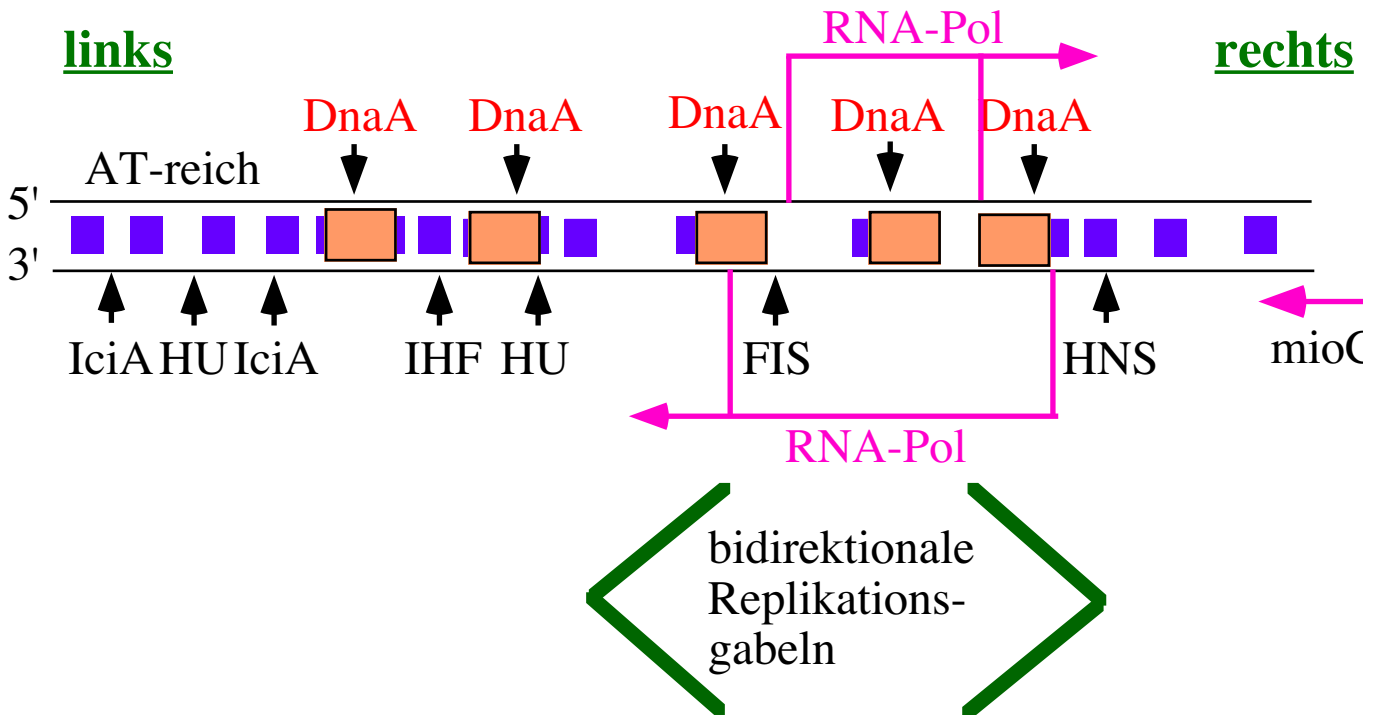
- Die meisten bakteriellen Chromosomen besitzen nur 1 Origin;
- Der *ori* ist eine bestimmte DNA Sequenz an der die Replikation startet;
- Im *E. coli*-Chromos. konnte der *ori* auf ca 245 bp eingegrenzt werden.
- Es handelt sich dabei um eine innerhalb der *Enterobacteriaceae* sehr konservative Region - mit charakteristischen Sequenzmotiven.

Die Replikation beginnt an einem bestimmten Punkt der als '**origin**' (**oriC**) bezeichnet wird. Er liegt bei 84 min auf der Chromosomenkarte. Am Anfang schien es schier unmöglich, die molekularen Ereignisse bei der Initiation der Replikation am Chromosom selbst zu untersuchen, da das Chromosom viel zu groß war. Dieses Problem konnte durch die Klonierung des *oriC* auf ein Plasmid überwunden werden. Solche Plasmide werden als **Minichromosomen** bezeichnet. Die Minichromosomen werden autonom und im Takt mit der chromosomalen DNA-Replikation repliziert. Der *oriC* konnte aber auch auf Bakteriophagen-DNA übertragen werden, die dann ebenfalls eine autonome Replikation aufwies. Es stellte sich heraus, daß die Minichromosomen **bidirektional** repliziert werden, und daß ihre Replikation von den gleichen Faktoren abhängig ist wie die Replikation des Chromosoms. Die Ermittlung der Nukleotidsequenz des *oriC* (1979) hat die Tür für moderne molekularbiologische Experimente geöffnet.

Abb.: 15

Funktionale Motive im *oriC* von *E. coli*

Origin (245 bp bei 84 Minuten)



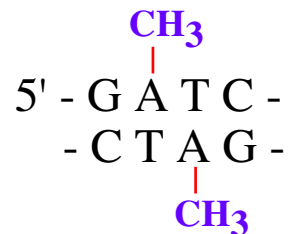
DnaA: 52 kDa, ATP-Bindung (Helikase?), DnaA-Boxen Ausbildung des Primosom- und Replisomkomplexes; Regulator (Autorepression);

<p>HU / HNS: Histon-ähnliche Proteine IHF: (integration host factor) FIS: (factor of inversion stimulation)</p>	<div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; width: 50px; height: 50px; margin: 0 auto;"></div>	<p>DNA-bending, Rekombination</p>
---	---	--

IciA: (inhibitor chromosome initiation) negativer Regulator der Replikationsinitiation

■ **Dam:** (dAdenin-Methyltransferase)

- vollmethylierter oriC ist Substrat für Initiation;
 - hemimethylierter oriC bindet an Membran d.h. nicht für Initiation verfügbar;
 - Hemimethylierung währt 1/3 der Generationszeit (= Eklipse);
- Dam** = molekularer Monitor



RNA-Polymerase: Durch die Transkription wird die Öffnung des Doppelstranges erleichtert und dadurch Primosomenassoziation

Gyrase: negative Superhelicität ist Voraussetzung für Initiation

Elemente der Initiation der Replikation

Replikation ist bidirektional
origin ist ca 245 bp lang
5 DnaA Binderegionen
11 GATC (SauIIIA) Sequenzmotive

ENZYME:

- a) DnaA/ tritt in Wechselwirkung mit RNA-Polymerase
- b) DnaB und C / Primosomzusammensetzung
- c) Dam/ A-Methylierung an -GATC-
- d) DNA-Polymerasen
- e) RNA-Polymerase
- f) Gyrase

-Für die Initiation der Replikation sind noch nicht genauer charakterisierte Proteine beteiligt.

-Ein obligatorischer Schritt für den Start der "leading" Strangsynthese ist eine Transkription der *ori* Region durch die RNA-Polymerase;

-Bei dem Plasmid Col E-1 kann die RNA direkt als Primer verwendet werden - nachdem die RNA durch RNase-H (Hybrid) verkürzt wurde.

-Bei der chromosomalen DNA hat jedoch die durch die RNA-Pol. transkribierte RNA keine Primer-Funktion;

-Die einzige Rolle der RNA-Pol. ist vermutlich die, den Doppelstrang zu öffnen, damit das Primosom besser binden und sich assoziieren kann.

Die minimale Sequenz des *oriC* konnte auf 245 bp eingegrenzt werden. Flankiert ist der origin von folgenden Genen:

rechts von *oriC* :

mioC: (modulation of initiation at *oriC*); kodiert für ein 16 kDa Protein mit unbekannter Funktion;

asnC: ist ein Transkriptionsaktivator des *asnA*-Gens und hat einen positiven Effekt auf die post-transkriptionale Expression von *gidA*;

asnA: kodiert für eines der beiden Asparaginsynthasen in *E. coli*.

links von *oriC* :

gidA und ***gidB*** : (glucose inhibition of division); eine Mutation im *gidA* Gen resultiert in einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit und in einer Glukosehemmung der Zellteilung.

unc - oder ***atp*** - Operon kodieren für Untereinheiten der membrangebundenen FoF1 ATP Synthase.

Die Struktur des *oriC*

Am linken Ende von *oriC* sind **AT- reiche** Sequenzabschnitte.

R1-4 und **M** stellen Konsensussequenzen dar, an denen das Initiationsprotein **DnaA** (DnaA-Boxen) bindet.

GATC - Sequenzen kommen bei allen enteriobakteriellen origins etwa 9-16 Mal vor.

Bindungsstellen für DNA-Biegungsproteine:

IHF (integration host factor);

FIS (factor for inversion stimulation);

beide Proteine assistieren dem DnaA-Protein in der Aufwindungsreaktion.

IciA (*oriC* binding protein) bindet spezifisch an die AT-reiche 13-mer repetitive Sequenz; es weist Homologie zu Transkriptionsregulatoren auf; bei *in vitro* Replikationsversuchen hemmt IciA die Replikation, wenn es vor DnaA-Protein zugegeben wird. IciA könnte daher der lang gesuchte **negative Regulator der Replikationsinitiation** sein.

Rob (right origin binding): erkennt eine 26 bp Sequenz rechts von R4.

Histon-ähnliche Proteine:

Die Initiation am *oriC* wird stimuliert durch geringe Konzentrationen an HU oder IHF und FIS und HNS. IHF und FIS verändern die DNA-Struktur über die Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes, wodurch es zur einer Biegung (**bending**) der ansonsten gestreckten DNA kommt.

Die **-GATC-** Sequenzen werden von der **Dam-Methyltransferase** methyliert, die Methylierung erfolgt nur bei einem DNA-Strang (Hemimethylierung).

Promotoren im Bereich des *oriC*

Vom *mioC* -Promotor wird links in den *oriC* transkribiert. Der *mioC* -Promotor erfordert Dam-Methylierung für maximale Aktivität. Der *gidA* Promotor ist links vom *oriC* und wird auch in entgegengesetzter Richtung transkribiert.

2 Promotoren sind in der linken Hälfte von *oriC* : *Pori* L transkribiert in die linke Richtung und *Pori* -R1 transkribiert in die rechte Richtung.

Das DnaA Protein:

Das Gen für *dnaA* liegt zumindest für *E. coli* nicht im Bereich des *oriC*. Das DnaA ist ein **basisches Protein** mit einer Masse von **52 kDa**. Das Gen liegt in einem Operon, das auch *dnaN* kodiert (für die β - Untereinheit der DNA-Polymerase III) und *recF* (ein Gen, das in der Rekombination involviert ist). Die Anordnung dieser Gene und Gensequenzen sind bei den Eubakterien hoch konserviert.

Konservierte Aminosäuresequenzen im DnaA:

Es besitzt eine ATP- Bindedomäne mit dem typischen Motiv (G-X-X-G-X-G-K-T-X₅-V).

DnaA besitzt Ähnlichkeiten zu **Helikasen** der Superfamilie III und zu

Transkriptionsaktivatoren der NtrC Familie.

Das DnaA Protein kontrolliert seine eigene Synthese (Autoregulation); die Regulation erfolgt über eine DnaA-Box, die zwischen den beiden DnaA Promotoren lokalisiert ist. Bei einem Überschuß an DnaA-Protein sind beide Promotoren reprimiert. Das DnaA Protein ist als Monomer aktiv, hat aber eine hohe Tendenz zu aggregieren. Nur wenn ATP an DnaA gebunden ist, besitzt es Aktivität in der *oriC*. Die ATP freie Form bildet große Aggregate.

Funktion des DnaA-Proteins:

Die primäre Rolle des DnaA-Proteins ist die Hinführung und richtige Platzierung des Replisoms. Es erkennt den *oriC* und dirigiert alle Proteine, die für die Replikation erforderlich sind an diese Stelle. Es bewirkt die Ausbildung des **Initiationskomplexes**. Die zweite wichtige Rolle des DnaA-Proteins in *oriC* ist seine Beteiligung an der **Zusammensetzung des Primosoms** und des RNA priming.

Darüber hinaus beeinflusst DnaA die Genexpression auf vielfältige Weise. Es wirkt als **Repressor** bei der Expression seines eigenen Gens aber auch von *mioC*, *rpoH*-Gen (kodiert für den Hitzeschock-Faktor σ^{32}) oder *drpA* (essentiell für die globale RNA- und DNA-Synthese).

Bei anderen Genen wirkt es als **Aktivator** wie z. B. *nrd* (Operon, das 2 Untereinheiten der Ribonucleosid-Diphosphatreduktase kodiert) oder *glpD* kodiert für die aerobe Glycerol-3-Phosphatdehydrogenase.

Alle diese von DnaA kontrollierten Gene weisen in ihrem Promoterbereich DnaA-Boxen auf.

Abb.: 16

Stufen der Initiation bei der *in vitro* Replikation

Der *oriC* bindet spezifisch an eine Membranfraktion. Die Rolle der Membrankomponenten ist nicht bekannt, außer daß die Membranfraktion spezifische hemimethylierte *oriC* - DNA bindet. Durch *in vitro* Versuche konnte man die Initiation der Replikation in Stufen einteilen:

1. Ausbildung eines Initiationskomplexes:

Das DnaA-Protein bindet an die DnaA-Boxen, der *oriC* muß in negativ-superhelicaler Struktur vorliegen.

2. Der offene Komplex:

Der Initiationskomplex wird in einem offenen Komplex durch Zugabe relativ hoher Konzentrationen an ATP (5mM) überführt. Die AT-reichen Sequenzen in der linken Hälfte des *oriC* sind zum Teil aufgewunden. Wie das DnaA-Protein zur Aufwindung führt, ist unbekannt.

Prepriming Complex I

DnaB ist die Helikase der Replikationsgabel. DnaB umgibt sich mit einem hexameren Ring von DnaC-Proteinen, von denen jedes ein ATP bindet. In dem Komplex mit DnaC ist die Helikaseaktivität von DnaB gehemmt, die Freisetzung von DnaC geht mit der ATP-Hydrolyse einher und führt gleichzeitig zur Aktivierung der Helikaseaktivität von DnaB.

Prepriming Complex II:

Die Helikase übt ihre Funktion an der Entstehung der Replikationsgabel aus, und zwar im rechten Teil des *oriC* nahe der DnaA-Box R2 , R3 und R4.

Priming Complex:

Die DnaG-Primase verbindet sich mit DnaB -Helikase unter Ausbildung des sogenannten 'priming complexes'. Die Primase spielt eine Schlüsselrolle insofern, als sie garantiert, daß die Initiation innerhalb des *oriC* und nur im *oriC* erfolgt und daß 2 gekoppelte Replikationsgabeln ausgebildet werden für die bidirektionale Replikation. In dieser Stufe wird das DnaA-Protein nicht mehr länger benötigt.

Das Replisom:

Ein dimerer Komplex der DNA-Polymerase III assoziiert sich an jeder Replikationsgabel; hierzu ist ATP notwendig. Die Primer werden verlängert und resultieren in einer koordinierten 'leading- und lagging-Strangsynthese'.

Die DNA-Gyrase wird für die Aufhebung des positiven-superhelikalen Stresses benötigt. Die Startstelle für die bidirektionale leading-Strangsynthese werden nahe der DnaA-Boxen R2, R3 und R4 angenommen.

DNA-Gyrase:

Eine negative Superhelizität ist Voraussetzung für die Initiation der Replikation. Die Gyrase ist notwendig für die Aufhebung des superhelikalen Stresses, der bei der Wirkung der Helikase an der Replikationsgabel entsteht.

Dam-Methylierung und Replikationsinitiation

Membranbindung und Dam-Methylierung:

CH ₃	
-G-A-T-C-	Hemimethylierung oder Vollmethylierung
-C-T-A-G-	wird von Restriktionsenzymen erkannt und
(CH ₃)	registriert.

Wenn voll methylierte DNA vorübergehend aufgrund der Replikation hemimethyliert wird, kommt es zum Verlust der Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme, und damit zu einer Signalwirkung für den Beginn der Replikation. Der Methylierungsgrad stellt einen **molekularen Monitor** für neu replizierte DNA dar, die zunächst hemimethyliert ist.

Das **Dam-System** ist daher ideal geeignet, um zu gewährleisten, daß alle origins einer individuellen Zelle nur einmal initiieren, bevor ein origin ein zweites Mal initiiert.

Zusätzlich spielt die Dam-Methylierung eine Hauptrolle bei den zellulären Reparaturprozessen ('mismatch repair') und ist auch in der Regulation verschiedener Promotoren involviert.

Die Anhäufung von Dam-Methylierungsstellen innerhalb der *Enterobacteriaceae* Replikations origins läßt vermuten, daß die Dam-Methylierung eine Rolle in der Replikationskontrolle spielt.

Als **Substrat** für die **Initiation der Replikation** dient vor allem **voll methylierter origin**. Unmethylierte oder hemimethylierte *oriC* -Plasmide können zwar in gewisser Weise als Substrate bei der *in vitro* Replikation dienen, sind aber viel weniger effizient als voll methylierte DNA. Es wurde auch herausgefunden, daß hemimethylierte, aber nicht voll methylierte oder unmethylierte *oriC* -DNA an spezifische *E. coli* -Membranfraktionen *in vitro* bindet. In rasch sich teilenden Zellen ist die *oriC* -DNA hemimethyliert für ungefähr 1/3 der Generation bevor es schnell remethyliert wird. Das bedeutet, daß nach Beginn der Replikation die DNA hemimethyliert vorliegt, dadurch in der Membran eingeschlossen ist, und somit für die Dam-Methylase nicht zugänglich ist. Die Zeit, die verstreicht, bis neu replizierte *oriC* -DNA eine zweite Replikationsrunde durchführen kann wird als '**eclipse period**' bezeichnet.

Initiation der chromosomalen Replikation, die unabhängig von *oriC* und DnaA ist

Neben dem *oriC* hat man in *E. coli* auch noch 3 *oriM* -Regionen gefunden, 2 davon liegen innerhalb des *oriC*. Wenn der *oriC* zerstört ist besteht offensichtlich noch die Möglichkeit die DNA über den außerhalb des *oriC* gelegenen *oriM* zu replizieren.

Kontrolle der Replikations Initiation in vivo

1. Die Initiation der Replikation ist zeitlich mit dem **Zellzyklus abgestimmt**;
2. Jeder origin initiiert nur einmal und nur einmal pro Zellzyklus;
3. Alle origins, die in der gleichen Zelle enthalten sind, initiieren ihre Replikation synchron.

Die Replikation verläuft nach einem **molekularen Uhrwerk**. Das **DnaA-Protein** ist vermutlich der **molekulare Schrittmacher**. Die Überproduktion des DnaA-Proteins mittels eines starken Promotors führt zu einer dramatischen Erhöhung der Initiationsereignisse, was vermuten läßt, daß DnaA die Initiation positiv reguliert.

Tabelle.

Zusammenstellung der Proteine die in der Initiation und DNA-Replikation beteiligt sind

Termination der Replikation

Die bidirektionale Replikation eines Bakterienchromosoms beginnt am Origin der Replikation und wird beendet, wenn die beiden Replikationsgabeln gegenüber des Origins zusammenlaufen.

Sie laufen in einer Region zusammen, die als **Terminus** bezeichnet wird.

Die **Terminus-Region** erstreckt sich relativ lang (350 kb) und beinhaltet 7 Terminator-Sequenzen, an denen das Fortschreiten der Replikationsgabel verhindert wird.

Abb.: Terminus-Region beim E.c. Chromosom

Die Terminator-Sequenzen:

TerE, TerD und TerA: sind für die Termination der Replikation im Gegenuhrzeigersinn verantwortlich;

TerC und TerB: sind für die Termination der Replikation im Uhrzeigersinn verantwortlich.

Die Terminatoren enthalten eine Sequenz von 24 bp Länge, die hoch konserviert ist (auch bei *E. c.* Plasmiden und *B. subtilis* Chromosom) und die die eigentliche Terminatorsequenz darstellt.

Tus: (terminator utilization substance)

Die Funktion der Terminatoren ist absolut abhängig von einem DNA-Bindeprotein, **Tus** das spezifisch an die Terminatoren bindet.

-36 kDa (309 As), bindet spez. an die Terminatoren;

-ist unmittelbar neben der TerB Stelle kodiert;

-hemmt Helikasen *in vitro* (vermutlich alle 3 Helikasen: Rep-Protein, Helikase II und DnaB-Helikase; Ergebnisse sind noch widersprüchlich);

-hemmt aber auf alle Fälle die Strangtrennung der Dna-B Helikase (5' → 3' - Polarität) eine essentielle Komponente des Replikationsapparates.

Ter-Region:

Die Terminus Region erleichtert die Dekatenation und Partition der Tochter-Chromosomen.

Eine orts-spezifische (RecA-abhängige) Rekombination spielt eine entscheidende Rolle bei Trennung der beiden kovalent verknüpften Chromosomen.

Im Bereich der Ter-Regionen sind Rekombinationsereignisse gehäuft, man spricht von sog. hotspots (Hot DNA). Insgesamt sind 8 solcher hotspots identifiziert worden.

Die Hyper-Rekombinationsaktivität (> 1000 Mal höher) ist an den meisten, aber nicht an allen Stellen, von einem funktionellen **tus** Gen abhängig.

TRZ (HotC) weist z.B. eine **tus**-unabhängige Hyper-Rekombinationsaktivität auf.

dif: eine cis-aktive Rekombinationsstelle

Die **dif** -Stelle (deletion-induced filamentation) representiert eine DNA-Sequenz ziemlich genau gegenüber von oriC. Mutationen in der dif -Sequenz führen zu filamentösem Wachstum und zur Unfähigkeit der Chromosomen-Partition. Sie dient als Substrat für die orts-spezifischen Rekombinasen XerC und XerD. dif-ähnliche Sequenzen kommen auch bei Plasmiden vor.

XerC und XerD:

sind Rekombinasen, die zur Monomerisierung der Chromosomen führen. Die biologische Funktion des Tus-Ter-Komplexes ist noch unklar. Das gleiche gilt für den Mechanismus der **Dekatenation** und **Partition der Tochterchromosomen**.

Abb.:

Auflösung des dimeren Chromosoms an der dif Stelle

Transkriptionale Aktivierung

Abb.: Initiation der Replikation

Abb.: ColE-1 Plasmid RNA-Polymerase // Primer // RNaseH

Abb.: RNA-Polymerase/ Primosomen

-Die bakteriellen Chromosomen werden normalerweise bidirektional repliziert;

-Einige Plasmide jedoch unidirektional;

-Wodurch dies gesteuert wird ist noch unklar.

REPLIKATION VON LINEAREN DNA MOLEKÜLEN

AM BEISPIEL VON T7-DNA

-Hier haben wir das Problem, daß das 3' -Ende nicht fertiggestellt werden kann.

-Der Antwort auf diese Frage kam man näher, als sich herausstellte, daß die T7-DNA an beiden Enden ein 160 bp lange, komplementäre Sequenz aufweist.

-Nach der Replikation kann das überstehende 3' -Ende des einen Moleküls mit dem komplementären 3' -Ende eines anderen Moleküls paaren und die entstehenden Lücken können durch

a) DNA-Pol-I aufgefüllt und

b) durch Ligase geschlossen werden.

-Dadurch können lange Konkatmere entstehen

Abb.: Replikation von T7-DNA

-Eine spezifische Endonuklease schneidet so, daß ein 5' -Überhang entsteht, der durch DNA-Pol-I aufgefüllt werden kann.

ALTERNATIVE REPLIKATIONS-FORMEN:

Rolling circles

- Ein alternativer Weg, um zirkuläre DNA zu replizieren ist der sog. Rolling circle - Mechanismus.
- Nach diesem Schema werden einige Plasmide (F-Faktor) und viele virale DNA-Moleküle repliziert.

Replikation von zirkulärer Doppelstrang-DNA

- Die DNA-Synthese beginnt mit einem es-Schnitt im (+)-Strang der elterlichen Doppelhelix;
- Dabei wird das 5"-Ende von der Duplex abgehoben, wodurch der DNA-Pol-III die Bindung an das 3'-Ende ermöglicht wird an das anpolymerisiert wird.
- Das 5'-Ende wird abgerollt als freies Ende und wird bald von den SSB-Proteinen bedeckt.

Abb.: Rolling circle

(da das Abrollen des 5' -Einzelstranges von einer Rotation um die Achse begleitet wird)

- Das freie 5'-Ende wird ebenfalls repliziert, vermutlich nach dem loop- oder Schleifen-Modell. (Primosomen/ RNA-Primer/ Okazaki-Fragmente/ Replisom)
- Auf diese Weise können lange Catenane entstehen, die vermutl. wieder über eine spez. Endonuklease getrennt werden können.
- Ringschluß kann durch die komplementären Enden erfolgen.
- Je nach Phagenart kann die DNA in ihrer linearen oder zirkulären Form in Viruspartikel verpackt werden.

WIE WIRD ZIRKULÄRE ES-DNA IN DIE REPLIKATIVE FORM ÜBERFÜHRT ?

-3 für E.c. spezifische es-DNA Viren wurden eingehender untersucht:

a) M13 b) G4 und c) PhiX174

- in allen 3 Fällen dringt in E.c. der als (+) bezeichnete zirkuläre Es in die Zelle ein.
- Sie werden nach Infektion sofort mit SSB bedeckt.
- Bei allen 3 ES DNA-Molekülen wird die DNA-Synthese durch RNA-Moleküle initiiert.

-Die Primer-(RNA-)-Synthese erfolgt jedoch bei allen 3 Viren in unterschiedlicher Weise; - der Mechanismus hängt ab von der Spezifität der (+) Strang-Matrize.

Abb.: Die Primer-RNA wird synthetisiert in:

- a) M13 (+): durch die RNA-Polymerase - an einer Duplexregion die frei von SSB ist;
- b) G4: durch die Primase - " - "
- c) PhiX174: durch Primosomen

- (-) Strangsynthes erfolgt durch Pol-III die fast um den ganzen Ring polymerisiert. (Pol-I/ Ligase);

-Dadurch entsteht die sog. Replikative DNA-Form (RF);

WIE ERFOLGT DIE SYNTHESE DES (+) STRANGES AUS DER REPLIKATIVEN FORM ??

- Aus der Replikativen Form (RF) muß wieder der zirkuläre (+)-Strang synthetisiert werden, welcher in die Viruspartikel verpackt wird.
- Am besten ist dieser Vorgang bei dem Virus PhiX174 untersucht.

Abb.: FX174 Replikation

- An RF-1 bindet das virus-codierte Protein A, das am *ori* des (+)-Stranges einen ES-Schnitt setzt ("nick").
- RF-1 wird dadurch relaxiert und in die RF-2 Form überführt.
- Das A-Protein bleibt kovalent an das 5"-Ende gebunden.
- Das Rep-Protein (Helikase) entspiralisiert // + ATP
- SSB-Proteine binden an Es-Regionen
- Das A-Protein am 5' -Ende ist mit dem Rep-Protein assoziiert.
- Replikation durch Pol-III;
- Nach einer Runde kommt Protein A in die Nähe des *ori*; es löst sich vom 5'-Ende des ES ab, und bindet erneut an den *ori* eines RF-Moleküls;
- Das 5' -Ende des abgerollten (+) Stranges wird vermutl. unmittelbar vor der Ablösung mit dem freien 3" -Ende verknüpft. Damit ist ein cirkulärer, Es, (+) Strang entstanden.
- In einem späteren Stadium der Virusinfektion werden die Tochter (+)-Stränge mit virusspezifischen Proteinen bedeckt, die
 - a) die Synthese von RNA-Primern verhindern und
 - b) als Nukleationsstellen für die Zusammensetzung neuer Viruspartikel fungieren.

Abb.: FX174-Infektion

Besitzt das Bakterienchromosom eine Chromatinstruktur? (nicht direkt)

Tabelle: Histone und Histon-ähnliche Proteine

HU:

- ist ein 19 kDa Heterodimer: HU1 und HU2;
- 20.000 Dimere/ Genom in E. c.: häufigste DNA-Bindeprotein
- ähnelt den Histonen, da es
 - a) klein
 - b) basisch
 - c) hitzestabil
 - d) reich in Lys + Ala
 - e) weit verbreitet (Cyanobakterien) ist
- bindet an ss und ds-DNA

Funktionen:

- Initiation der DNA-Replikation (*oriC*)
- bewirkt DNA-bending + -Faltung; Kondensiert DNA zu einer gewundenen Struktur;
- spielt eine Rolle bei der Transposition von Tn10, Phasenvariation (genetische Inversion),
- höhere Konz. an HU hemmen die *oriC*-Replikation durch Verringerung der

Superhelicität;

-HU beeinflusst die Transkription - erhöht die Wirkung des lac-Repressors und des CAP
Mutanten:

-hupB (kein HU1) weisen keine phänotypischen Veränderungen auf;

-hupA (kein HU2) wächst langsam, ist defektiv in der Zellteilung und Mu kann sich nicht mehr vermehren.

-Überproduktion eines der Untereinheiten: führt zu

a) Filamentation,

b) Induktion des SOS-Systems und

c) Verringerung der Plasmidkopiezahl

IHF (Integration Host Factor)

-ein Histon-ähnliches Protein

-ist ein Dimer (IHFa/himA: 11,2 kDa + IHFb/HimD: 10,6 kDa)

-hitzestabil

-35 % identische aa mit HU

-es windet wie HU ds-DNA um seine Oberfläche und erzeugt eine Biegung (bending) der DNA

-wurde als eine Komponente der Ortsspezifischen-Rekombination von Phagen Lambda entdeckt (Johnson et al. 1986: Cell 46:531)

-seitdem wurde mehrfach bei anderen ortsspez. Rekombinationen wiederentdeckt, so dass man von "ein Protein für alle Fälle" sprach.

H-Protein

-ein Dimer (28 Kd) bindet es + ds-DNA;

-weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu dem eukaryontischen Histon H2A auf;

-seine Bindung an DNA hemmt Replikation, Transkription und andere DNA-abh. Reaktionen;

-1989 hat Bruckner & Cox (NAR 17: 3145) entdeckt, daß das H-Protein mit dem S3-Protein identisch ist;

-d.h. es ist natürlicherweise ein RNA-Bindeprotein

FirA Protein:

-ist hitzestabil, säure-löslich, 17 kDa Protein -Tetramer;

-bindet DNA

-4.000 Monomere/Zelle

-Rif-resistente (β -UE-RNA-Pol.) werden Rif-sensitiv;

-spielt möglicherweise bei der Transkription eine Rolle

Histone und Histon-ähnliche Proteine

	MG (Kd)	Ladung	Kopien/ Zelle	Umhüllung v. DNA	Funktion
Histone (Eukaryonten):					
H2A, H2b, H3/ H4	11-15	basisch	?	+	Chromatinstr.
Histon-ähnliche Proteine (Prokaryonten)					
HU (α,β)	9,5	basisch	40.000	+	therm. Stabilis. ds-DNA
IHF (α,β)	10	?	?	+	ortsspez. Rec. bei Bakteriophagen (integr.host fact.)
H	28	?	120.000	?	
H1abc	15.5	neutral	15.000	+	
FirA	17.5	?	4.000		Rif ^R