

5 Nucleinsäuren: Struktur und Organisation



Zusammenfassung

- Nucleinsäuren sind hochmolekulare Polynucleotide. Sie gelten als Schlüssel­moleküle des Lebens, denn sie enthalten die genetische Information. In allen Zellen ist die **Desoxyribonucleinsäure** (DNA) die „Gensubstanz“.
- **Bausteine der Nucleinsäuren.** Die Nucleinsäuren sind aus den *Basen* Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil, den *Zuckern* Desoxyribose (in DNA) bzw. Ribose (in RNA) und *Phosphorsäure* aufgebaut. Die Phosphorsäure bildet als Diester die Brücke zwischen den Zucker-Resten.
- Die **genetische Information** ist in der *Sequenz der Basen* enthalten. Diese determiniert die *Aminosäure-Sequenz von Proteinen*. Sie ist in einem Code verschlüsselt, bei dem eine Folge von drei Basen eine Aminosäure festlegt. Mittlersubstanz zwischen DNA und Protein ist eine informationstragende RNA, die sogenannte Messenger-RNA (abgekürzt mRNA).
- **Pyrimidin- und Purin-Basen** können im Organismus aus kleinen Bausteinen aufgebaut werden. Der Abbau der Purin-Basen führt zur Harnsäure.
- Die DNA bildet Makromoleküle von sehr großer Länge. Durch die Wirkung von **Restriktionsendonucleasen** kann die DNA an spezifischen Sequenzen gespalten werden.
- Für die **Raumstruktur der DNA** gilt das Watson-Crick-Modell der Doppelhelix: Zwei Nucleinsäure-Einzelstränge sind als Schraube umeinander verdreht. In dem so entstehenden Doppelstrang sind die Basen stets paarweise angeordnet, wobei Thymin mit Adenin und Cytosin mit Guanin durch Wasserstoff-Brücken in Wechselwirkung treten. Diese *Basenpaarung* erklärt die identische Replikation, wobei ein Strang jeweils den anderen eindeutig determiniert, sowie die Informationsübertragung (Transkription) auf die mRNA.
- Die **Chromosomen** der Eukaryonten bestehen aus DNA und Proteinen. Grundstruktur ist das Nucleosom, das aus Histonen und DNA aufgebaut ist. Die bakterielle DNA ist ringförmig geschlossen.
- **Pathobiochemisch** spielen die Nucleinsäuren neben den funktionellen Folgen von Mutationen im Genom bei folgenden Erkrankungen eine Rolle:
Gicht ist durch erhöhte Harnsäure-Konzentrationen im Blut gekennzeichnet (Hyperurikämie). Sie ist meist Folge einer Nierenfunktionsstörung mit verminderter renaler Clearance der Harnsäure, selten beruht sie auf Enzymdefekten des Purinstoffwechsels.
Das *Lesch-Nyhan-Syndrom* ist eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der die Wiederverwertung von Purin-Basen gestört ist. Das betroffene Enzym ist die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.
Adenosin-Desaminase-Mangel und *Nucleosid-Phosphorylase-Mangel* führen zu Störungen der Bildung von T- und B-Lymphozyten.
Bei verschiedenen *Autoimmunerkrankungen* werden Antikörper gegen Bestandteile des Zellkerns (DNA, Ribonucleoprotein-Partikel, Histone) gefunden.

Übersicht

- 5.1 Desoxyribonucleinsäure als Träger genetischer Information** · 96
- 5.2 Bausteine der Nucleinsäuren** · 97
- 5.3 Primärstruktur der Nucleinsäuren** · 102
- 5.4 Raumstruktur der Desoxyribonucleinsäure** · 104
- 5.5 Analyse der DNA-Struktur** · 106
- 5.6 Chromosomenstruktur** · 109
- 5.7 Pathobiochemie** · 112

Die Nucleinsäuren wurden 1869 von Miescher in Lymphocyten (aus Eiter) entdeckt. Ihre biologische Bedeutung blieb lange Zeit unbekannt, bis Avery, MacLeod und McCarty (1944) den Beweis für ihre genetische Funktion erbrachten und Watson und Crick 1953 im Prinzip der Basenpaarung den Schlüssel zur Informationsübertragung fanden.

Die Nucleinsäuren gelten als die Schlüsselmoleküle des Lebens, denn sie enthalten die genetische Information.

Nucleinsäuren sind chemisch Polynucleotide. Sie sind aufgebaut aus heterozyklischen Basen, Kohlenhydrat und Phosphorsäure. Wir unterscheiden nach der Art des Kohlenhydrats die

1. *Desoxyribonucleinsäuren*, DNS bzw. DNA abgekürzt, mit 2-Desoxyribose als Kohlenhydrat, und
2. *Ribonucleinsäuren*, RNS oder RNA abgekürzt, welche Ribose als Kohlenhydrat enthalten.

Dieser rein chemischen Unterscheidung entspricht biologisch eine verschiedene Funktion: Die Desoxyribonucleinsäure stellt das Substrat der genetischen Information dar, die Ribonucleinsäuren sind an der Biosynthese der Proteine unmittelbar beteiligt.

5.1 Desoxyribonucleinsäure als Träger genetischer Information

Das Gen als Einheit der Vererbung. Die Erbfaktoren oder Gene sind zunächst als biologische Einheiten definiert worden, und zwar durch die Fähigkeit zur *Merkmalsauslösung*, zur *identischen Reproduktion* und zur *Mutation*.

Im Erbxperiment wird das Verhalten bestimmter erblicher *Merkmale* (z. B. Haarfarbe, morphologische Besonderheiten, Stoffwechselfunktionen u. a.) untersucht. Die Erbfaktoren oder Gene sind auf den Chromosomen lokalisiert und werden nach den Mendel-Gesetzen vererbt. Die Tatsache, dass die Gene unverändert von Generation zu Generation weitergegeben werden, oft an viele tausend Nachkommen und an Millionen von Zellgenerationen, zwingt dazu, ihnen die Fähigkeit zur *identischen Replikation* zuzuschreiben.

Als sehr seltenes Ereignis beobachtet man plötzliche Veränderungen der Erbfaktoren. Das veränderte Gen wird in dieser Form weitergegeben. Solche *Mutationen* sind ursächlich an der Evolution beteiligt.

5.1 DNA-Menge verschiedener Genome*

Organismus	Basenpaare ca.
Erdkröte (<i>Bufo bufo</i>)	$6,6 \cdot 10^9$
Maus (<i>Mus musculus</i>)	$3,3 \cdot 10^9$
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	$2,8 \cdot 10^9$
Fruchtfliege (<i>Drosophila melanogaster</i>)	$1,7 \cdot 10^8$
Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	$7,0 \cdot 10^7$
Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	$2,0 \cdot 10^7$
<i>Escherichia coli</i> (Bakterien)	$3,8 \cdot 10^6$
Chloroplasten (Tomate)	$1,6 \cdot 10^5$
Mitochondrien (Hefe)	$0,8 \cdot 10^5$
Mitochondrien (Mensch)	$1,7 \cdot 10^4$
Bakteriophage λ	$4,6 \cdot 10^4$
Affenvirus SV 40	$5,2 \cdot 10^3$
Plasmid pBR322	$4,4 \cdot 10^3$

* bei Eukaryonten ist der haploide Chromosomensatz angegeben.


Desoxyribonucleinsäure (DNA) als Gensubstanz. Den Beweis dafür, dass die DNA die genetische Information trägt, haben die klassischen Experimente zur *Transformation* von Bakterien (Avery, MacLeod, McCarty 1944) geliefert. Das transformierende Agens erwies sich als hochmolekulare DNA. DNA ist bei Bakterien, vielen Viren und höheren Organismen die genetische Substanz. Die DNA-Menge und damit der Umfang der Information ist allerdings bei Viren, Bakterien und höheren Organismen (und innerhalb dieser Gruppen) sehr verschieden, wie 5.1 zeigt.

Bei Bakterien kennt man neben dem ringförmigen Chromosom noch kleinere ringförmige DNA-Moleküle, die *Plasmide* genannt werden. Sie sind oft in mehreren Kopien vorhanden, können unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert und bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden. In den Zellen höherer Organismen ist DNA, d. h. genetisches Material, nicht nur in den Chromosomen des Zellkerns, sondern auch ringförmig in Mitochondrien und in den Plastiden der Pflanzen enthalten.

Grundprinzip der Informationsübertragung durch Nucleinsäuren („Zentrales Dogma der Molekularbiologie“). Ein DNA-Strang besteht aus einer Folge von Nucleotiden (s. u.), die sich in ihrem Basenanteil unterscheiden. Im Doppelstrang sind zwei DNA-Stränge helikal umeinander gewunden, wobei die Basen nach innen zeigen und jeweils

komplementäre Basen einander gegenüberliegen (s. S. 104). Für die Informationsübertragung durch Nucleinsäuren gelten die folgenden Prinzipien:



- Die genetische Information ist in der DNA als Sequenz der Basen codiert; die vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bilden gewissermaßen ein Alphabet mit den vier Buchstaben A, G, C und T.
- Nach dem Prinzip der Paarung komplementärer Basen (A paart mit T, G paart mit C) vermag jede dieser Basen die korrespondierende Base eindeutig zu determinieren. Damit kann die Information beliebig weitergegeben und übertragen werden: Die Nucleinsäuren haben die Fähigkeit zur Selbstinstruktion, die identische Reduplikation (Replikation) gehorcht dem Prinzip der Basenpaarung.
- Die genetische Information determiniert die Aminosäure-Sequenz von Proteinen. Sie ist in einem Code verschlüsselt, bei dem eine Folge von drei Basen eine Aminosäure bedeutet (s. S. 142).
- Mittlersubstanz zwischen DNA und Protein ist eine informations-tragende RNA, die sogenannte Messenger-RNA (Boten-RNA); abgekürzt mRNA.


Die Zusammenhänge sind in  5.1 schematisch dargestellt. Wichtig ist, dass danach der Fluss der Information von der Nucleinsäure zum Protein verläuft, nie umgekehrt.

Die gesamte in der DNA codierte Erbinformation eines Organismus bezeichnet man als *Genom*. Es enthält nicht nur Informationen für die proteincodierende mRNA, sondern auch für andere RNA-Arten wie Transfer-RNA und ribosomale RNA; auch die DNA-Abschnitte, welche die Information für diese weiteren RNA-Arten enthalten, werden als *Gene* bezeichnet. Es gibt ferner DNA-Sequenzen, an denen regulatorische Faktoren, z.B. im Rahmen der Kontrolle der RNA-Synthese, angreifen, und es gibt noch andere Sequenzen, an denen keine RNA-Synthese (Transkription) stattfindet. Inwieweit diese eine funktionelle Bedeutung haben, ist im Einzelnen noch nicht geklärt.

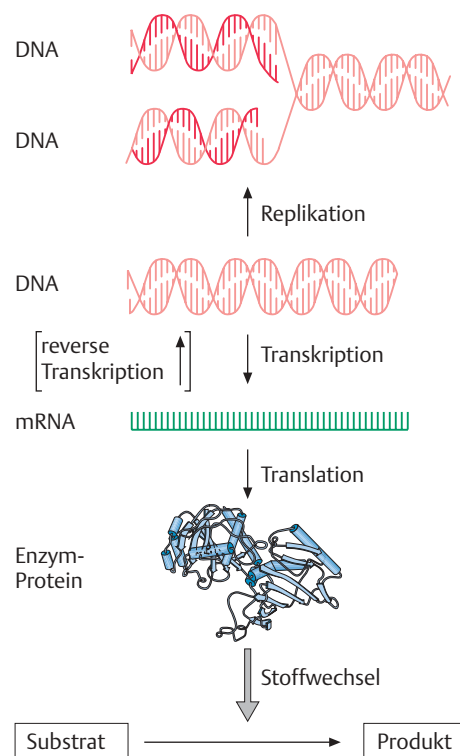
5.2 Bausteine der Nucleinsäuren


Die Bausteine der hochmolekularen Nucleinsäure sind die Nucleotide. Sie können im Körper selbst aufgebaut werden und sind, wie bereits erwähnt, aus einer Base, einem Zucker und Phosphorsäure zusammengesetzt. Durch *N*-glykosidische Verbindung einer Ribose oder 2-Desoxyribose mit einer Nucleinbase entsteht ein Nucleosid. Ein Nucleotid ist der 5'-Phosphorsäureester eines Nucleosids.


Die Basen. In den Nucleinsäuren kommen Purin-Basen und Pyrimidin-Basen vor ( 5.2). Ihre Namen und Formeln sind in  5.2 aufgeführt. Das Thymin ist typischer Bestandteil der DNA; Uracil wird praktisch nur in RNA gefunden. Hypoxanthin ist in erster Linie ein Produkt des Purin-Stoffwechsels, aber es wird (wie auch andere seltene Basen) in tRNA gefunden.


Der Zucker. Wie schon erwähnt, kennt man Desoxyribonucleinsäure (DNA) mit 2-Desoxyribose als Zucker, und Ribonucleinsäure (RNA) mit Ribose als Zucker ( 5.2).

Die Nucleoside bestehen aus einem Zucker und einer *N*-glykosidisch damit verknüpften Purin- oder Pyrimidin-Base. Sie haben Trivialnamen, die von denen der Basen abgeleitet sind und bei Pyrimidin-Derivaten auf -idin, bei den Purin-Nucleosiden auf -osin enden. Zur Unterscheidung von der Bezifferung der Basen mit einfachen Ziffern



 5.1 Grundprinzip der Informationsübertragung durch Nucleinsäuren. Nach oben ist die identische Replikation dargestellt, nach unten der Fluss der Information über mRNA und Protein, hier ein Enzymprotein, welches in den Stoffwechsel eingreift. In Klammern: Umkehr der Transkription bei RNA-Tumorviren.

 Ein **Gen** ist ein Abschnitt einer Nucleinsäure, der die Information für ein Protein oder ein RNA-Molekül enthält. Bei diploidem Chromosomensatz kann ein Gen in zwei Ausprägungen vorliegen; diese nennt man **Allele**. Die Gesamtheit der Erbinformation eines Organismus bezeichnet man als dessen **Genom**.

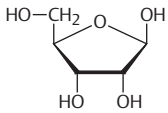
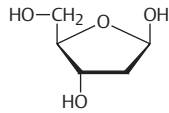
 Base-Zucker-Phosphat
 Nucleosid
 Nucleotid



Purin



Pyrimidin

 β -D-Ribose β -D-Desoxyribose

5.2 Grundstruktur der Nucleinsäure-Bausteine.

werden die C-Atome des Zuckers mit 1' bis 5' bezeichnet (s. die Formelzusammenstellung in 5.2).

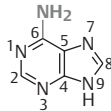
Die Nucleotide sind Phosphorsäureester der Nucleoside. Die 5'-Phosphate haben wir bereits als Bestandteil der Coenzyme kennen gelernt (S.77 ff.). Die Phosphorsäure wird gemäß einer internationalen Vereinbarung durch ein großes P abgekürzt. Wir werden dies meist zusätzlich durch eine rote Unterlegung kenntlich machen. Während zum Aufbau der Nucleotid-Coenzyme oftmals Vitamine nötig sind (s. 4.1, S. 73), können deren Nucleotid-Bestandteile und die Bausteine der Nucleinsäuren im Organismus selbst aufgebaut werden.

Seltene Bausteine der Nucleinsäuren. Außer den lange bekannten Bausteinen findet man in manchen Nucleinsäuren (vor allem bei Bakteriophagen und in der Transfer-RNA, s. u.) seltene Basen bzw.

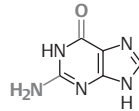
5.2 Die wichtigste Nucleinbasen und Nucleotide.

Purin-Derivate

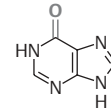
Basen:



Adenin (Ade)

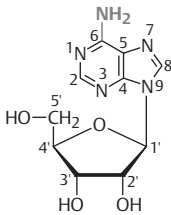


Guanin (Gua)

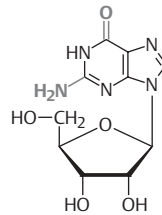


Hypoxanthin (Hyp)

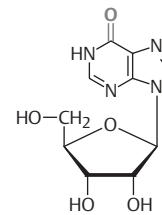
Nucleoside:



Adenosin (A)



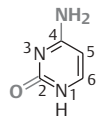
Guanosin (G)



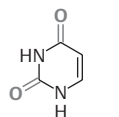
Inosin (I)

Pyrimidin-Derivate

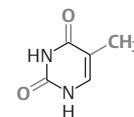
Basen:



Cytosin (Cyt)

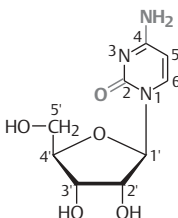


Uracil (Ura)

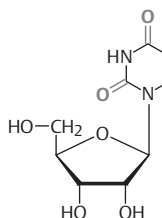


Thymin (Thy)

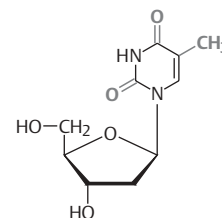
Nucleoside:



Cytidin (C)

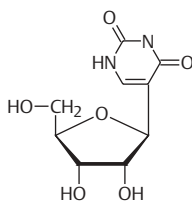
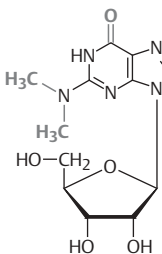
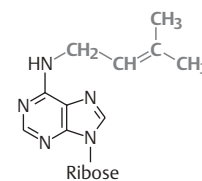


Uridin (U)



Thymidin (dT)

Seltene Nucleoside

Pseudouridin (ψ) N^2 -Dimethylguanosin (m_2^2G) N^6 -Isopentenyladenosin (iA)

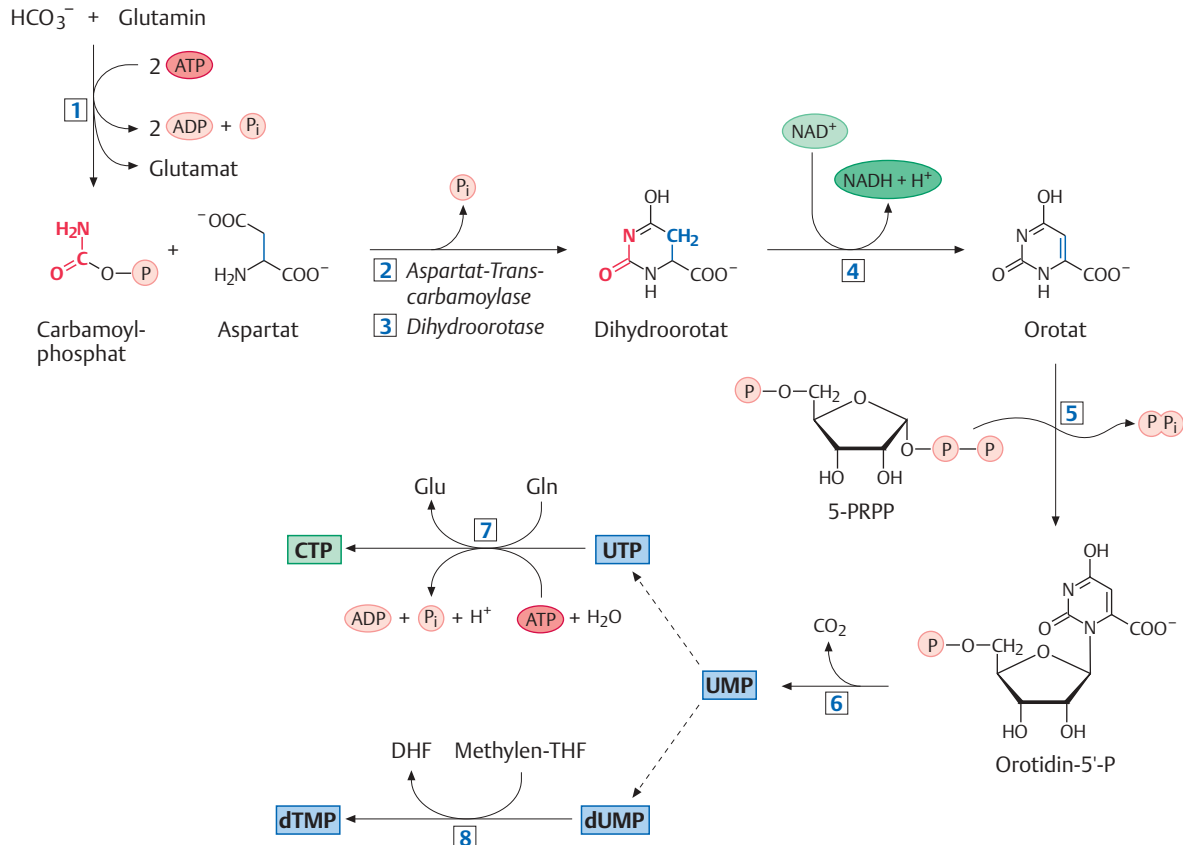
Nucleoside. Hierzu gehören u. a. 5-Methylcytosin, die am Stickstoff methylierten Basen der Hauptnucleotide, das N^6 -Isopentenyl-adenosin und das Pseudouridin, bei dem das C-1 der Ribose mit dem C-5 des Pyrimidin-Rings über eine C-C-Bindung verknüpft ist (Tabelle 5.2, unterste Zeile). Auch einige seltene Nucleoside sind in Tabelle 5.2 mit aufgeführt. Diese seltenen Bausteine entstehen durch nachträgliche Modifizierung.

Synthese und Abbau der Pyrimidine

Die **Pyrimidin-Biosynthese** (S. 5.3) beginnt mit der Bildung von **Carbamoylphosphat** durch die cytoplasmatische Carbamoylphosphat-Synthetase II (das mitochondriale Enzym des Harnstoffzyklus, S. 211, wird mit I beziffert) (1).

Carbamoylphosphat, eine Verbindung mit hohem Gruppenübertragungspotenzial, reagiert mit Aspartat zum Carbamoyl-aspartat (2), welches in einer Gleichgewichtsreaktion (3) zum Dihydroorotat zyklisiert. In tierischen Zellen sind alle drei Enzymaktivitäten (Carbamoylphosphat-Synthetase, Aspartat-Transcarbamoylase und Dihydroorotase) in einer einzigen Peptidkette verankert. Die Synthetase und die Dihydroorotase werden allosterisch reguliert, nicht aber die Aspartat-Transcarbamoylase.

Dihydroorotat wird nun zum Orotat dehydriert (4), und dieses reagiert mit 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat (PRPP) zum Orotidin-5'-phosphat (5), welches zum Uridin-5'-phosphat (UMP) decarboxyliert wird (6). Die weitere Phosphorylierung zum UTP geschieht durch spezifische Kinasen mit ATP als Phosphat-Donor.

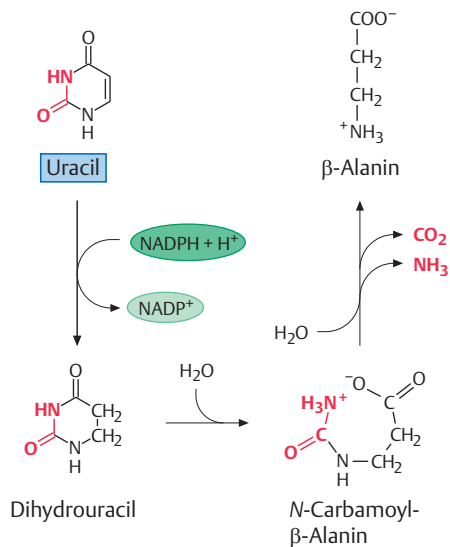


5.3 Biosynthese der Pyrimidin-Nucleotide. Sie verläuft über Uridin-5'-phosphat (UMP).

Allgemeines zur Nomenklatur. Die Nomenklatur der Nucleotide haben wir bereits am Beispiel der Adenosinphosphate (AMP, ADP, ATP) kennen gelernt (s. S. 83). Die übrigen ganz entsprechend aufgebauten Nucleosidphosphate werden in analoger Weise bezeichnet und abgekürzt, wobei das Nucleosid meist nur mit dem ersten Buchstaben abgekürzt wird; so steht G für Guanosin, C für Cytidin usw.

Die Desoxyribonucleotide, die als Bausteine der DNA wichtig sind, werden durch Vorsetzen von d gekennzeichnet, also dAMP für Desoxyadenosinmonophosphat, dCTP für Desoxycytidintriphosphat. Aus Gründen der Einheitlichkeit kürzt man das Thymidin mit dT ab, da es ein Desoxyribonucleosid ist. Das Pseudouridin wird mit dem griechischen Buchstaben ψ bezeichnet.

Regulation der Aspartat-Transcarbamoylase bei *E. coli*. Im Gegensatz zu Eukaryonten liegen bei *E. coli* drei getrennte Proteine vor, von denen besonders die Aspartat-Transcarbamoylase für die Regulation von Bedeutung ist. Sie besteht hier aus 6 Untereinheiten. Das Enzym wird durch CTP allosterisch gehemmt und durch ATP stimuliert. Die *de-novo*-Synthese des Enzyms wird durch CTP gehemmt (☞3.19c, S. 67).



☞5.4 Abbau des Uracils.

Die anderen Pyrimidine gehen aus Uridin-Derivaten hervor. Die CTP-Synthase (7) wandelt die OH-Gruppe am C-Atom 4 des Uridintriphosphats mit *Ammoniak* oder *Glutamin* in die Amino-Gruppe um, wodurch Cytidintriphosphat entsteht. Die Thymidin-Derivate werden mit Hilfe der Thymidylat-Synthase (8) durch Methylierung von Uridin- bzw. Desoxyuridinmonophosphat mit $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ *Methylen-tetrahydrofolat* synthetisiert (zur Regenerierung von Methylene-THF s. ☞4.19, S. 89).

Der **Abbau des Uracils** (☞5.4) verläuft als Umkehrung der Biosynthese, d.h. der Ring wird partiell hydriert und zwischen N-3 und C-4 hydrolytisch geöffnet. Da jedoch beim Übergang Orotsäure \rightarrow Uridin CO_2 abgespalten wird, erscheint als Abbauprodukt nicht Aspartat, sondern das Decarboxylierungsprodukt β -Alanin.

Synthese und Abbau der Purine

Die **Biosynthese des Purin-Rings** (☞5.5) verläuft wesentlich umständlicher als jene der Pyrimidine. Zwei Prinzipien sind bemerkenswert: Erstens vollzieht sich die Synthese am Ribose-5-phosphat-Teil des Nucleotids, zweitens erfolgt der Aufbau des Rings aus kleinsten Einheiten; das größte Bruchstück ist ein Glycin-Molekül, alle anderen C- oder N-Atome werden einzeln eingeschoben. Aus ☞5.5 und der Erläuterung dazu geht das Wesentliche hervor. (Zur Übersicht über den Purin-Stoffwechsel s. a. ☞5.28, S. 114.)

Die **Regulation** der Purin-Biosynthese erfolgt in erster Linie bei der Bildung des 5-Phosphoribosylamins, die von der *Glutamin-PRPP-Amidotransferase* katalysiert wird (Reaktion 1 in ☞5.5). Dieses Enzym wird durch die Nucleotide AMP, GMP und IMP allosterisch gehemmt; sind also ausreichend Mononucleotide – die Endprodukte dieses Biosyntheseweges – vorhanden, dann ist die Synthese abgeschaltet.

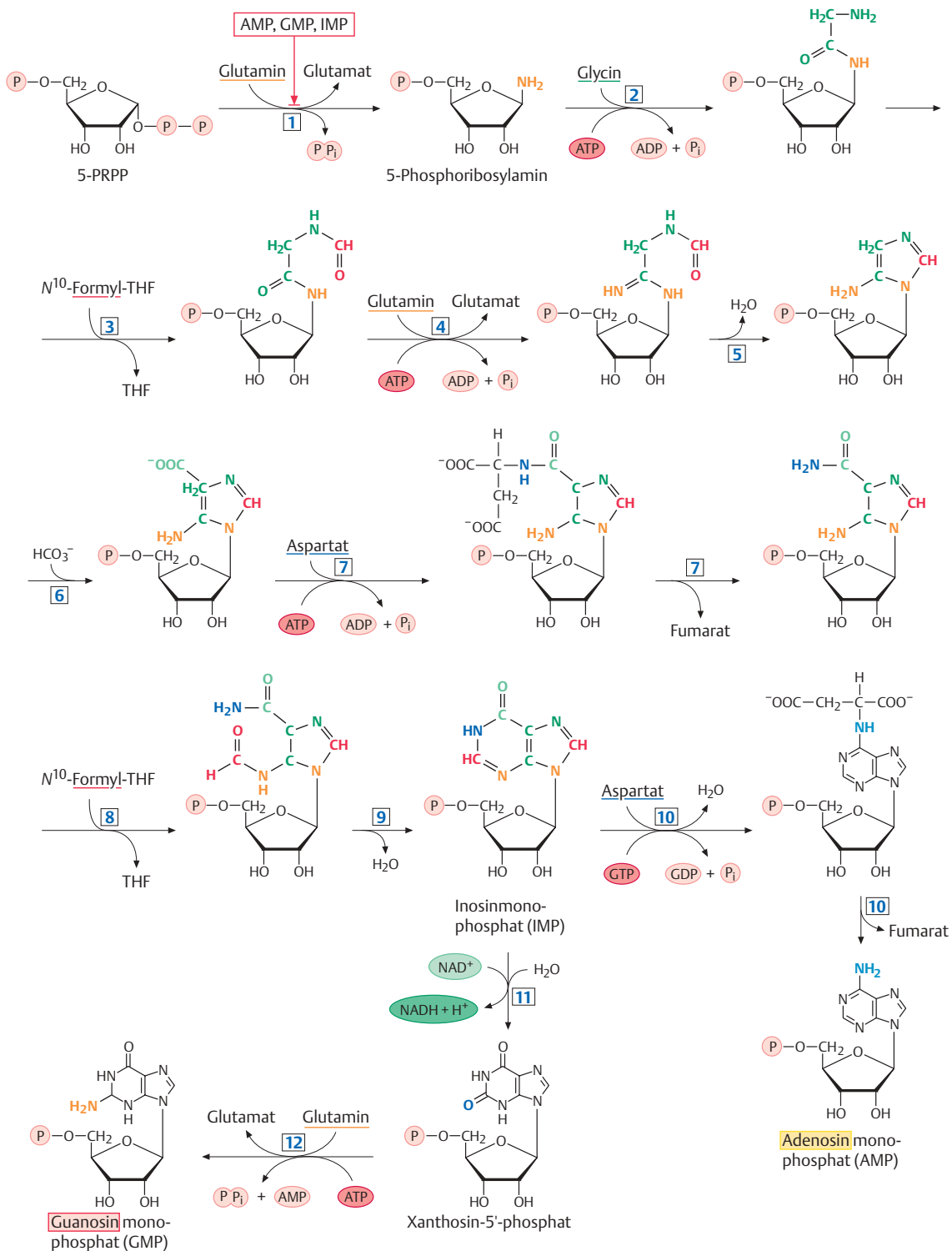
Abbau der Purin-Basen (☞5.6). Im Stoffwechsel entstehen stets freie Purin-Basen. Ebenso entstehen bei der Verdauung aus den Nucleinsäuren Nucleoside und freie Basen, die in die Stoffwechselprozesse einbezogen werden. Soweit die Purin-Basen nicht wieder verwendet werden (Salvage-Pathway, s. u.), werden sie zur Harnsäure oxidiert, welche beim Menschen die Endstufe des Purin-Abbaus darstellt. Wie ☞5.6 zeigt, wird dabei Adenosin zunächst zu Inosin desaminiert. Durch phosphorolytische Abspaltung der Ribose entsteht Hypoxanthin, das weiter zu Xanthin oxidiert wird. Vom Guanosin wird zunächst die Ribose abgespalten, das Guanin wird dann zu Xanthin desaminiert. Die Oxidation von Hypoxanthin und von Xanthin zu Harnsäure (☞5.6) wird durch die Xanthin-Oxidase bewirkt. Dieses Enzym ist ein Flavoprotein von sehr geringer Substratspezifität, das z. B. auch Formaldehyd zu Ameisensäure oxidieren kann. Die Reaktion ist sauerstoffabhängig.

Bei den meisten Säugetieren wird die Harnsäure weiter abgebaut zu *Allantoin* oder *Allantoinsäure*; beim Menschen und Menschenaffen wird sie jedoch unverändert ausgeschieden.

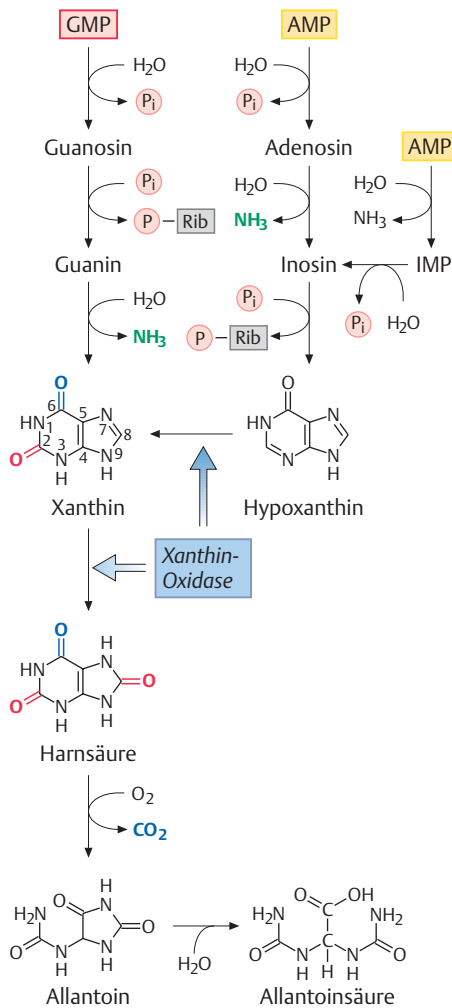
Die methylierten Xanthine haben pharmakologisches Interesse (*Theophyllin* = 1,3-Dimethylxanthin, *Coffein* = 1,3,7-Trimethylxanthin. Manche Analoga der Purine (*6-Thioguanin*, *6-Mercaptopurin*) werden als Chemotherapeutika gegen Tumoren verwendet.

Bildung der Desoxyribonucleotide. Die Desoxyribonucleotide, die als Bausteine für die DNA wichtig sind, entstehen durch reduktive Entfernung der 2'-OH-Gruppe. Die Reaktion, katalysiert durch die *Ribonucleotid-Reduktase*, vollzieht sich bei den Pyrimidin- und Purin-Nucleotiden in gleicher Weise auf der Stufe der Diphosphate. Wasserstoff-Donor für die Reduktion ist das *Thioredoxin*, ein Protein aus 106 Aminosäuren (S. 81). Es enthält zwei reaktionsfähige HS-Gruppen,

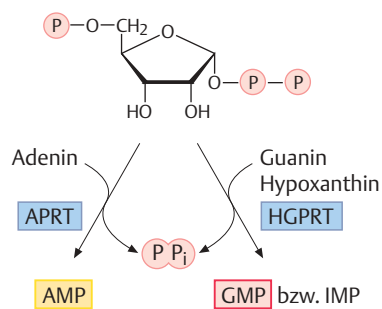
Neben der Reduktion auf Diphosphat-Ebene gibt es bei manchen **Bakterien** einen Stoffwechselweg, bei dem die Triphosphate durch ein Cobalamin-Coenzym zu den Desoxynucleosidtriphosphaten reduziert werden. Auch hierbei ist Thioredoxin beteiligt.



➤ **5.5 Biosynthese der Purin-Nucleotide.** Durch die Glutamin-PRPP-Amido-Transferase wird zunächst eine Aminogruppe (aus Glutamin) auf 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat übertragen (1). Dabei entsteht 5-Phosphoribosylamin, an das nun Glycin in Säureamid-Bindung angegliedert wird (2). An dieses Gerüst werden nun die einzelnen Atome angelagert. In Reaktion (3) wird ein C₁-Fragment vom N¹⁰-Formyl-Tetrahydrofolat auf den Amino-Stickstoff des Glycins übertragen, dann wird der Sauerstoff der Glycinamid-Bindung durch Stickstoff ersetzt (4, NH₂-Donor ist auch hier wieder Glutamin). In der Reaktion 5 wird der Fünfring geschlossen. In einer weiteren Reaktion (6) wird eine Carboxy-Gruppe an C-6 eingeführt, die aus Bicarbonat stammt; die Reaktion benötigt keine Biotin-aktivierte Carboxy-Gruppe. Die Carbonsäure wird nun in das Amid umgewandelt (7), wobei Aspartat den Stickstoff liefert. In Reaktion 8 wird eine Formyl-Gruppe vom N¹⁰-Formyl-Tetrahydrofolat eingefügt, um den Sechsring zu schließen (9); das Produkt ist Inosin-5-phosphat (IMP). Beim Übergang in Adenosin-5-phosphat (AMP) liefert Aspartat den Stickstoff (10), Adenylosuccinat ist Zwischenprodukt. Der Übergang in Guanosin-5-phosphat (GMP) erfolgt durch Wasseranlagerung in 2,3-Stellung, Dehydrierung der Hydroxy-Gruppe zum Xanthosin-5-phosphat (11) und Amidierung zu GMP (12), wobei Glutamin NH₂-Donor ist.



5.6 Abbau der Purin-Nucleotide.



5.7 Wiederverwertung von Purin-Basen. APRT: Adenin-Phosphoribosyltransferase, HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase.

die an der Reduktion des Zuckers mitwirken. Das oxidierte Thioredoxin (-S-Form) kann durch NADPH wieder reduziert werden.

Wiederverwertung der Purin- und Pyrimidin-Basen (5.7). Die im Stoffwechsel entstehenden freien Purin-Basen werden zum Teil wieder verwertet, und zwar durch einen Stoffwechselweg, der im Englischen „Salvage Pathway“ genannt wird. Die wichtigste Reaktion hierbei ist die Bildung der Nucleotide aus 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat (PRPP) und den entsprechenden Purin-Basen. Hierfür gibt es zwei verschiedene Enzyme, eine für Adenin spezifische Phosphoribosyltransferase (APRT) und eine Phosphoribosyltransferase, die Hypoxanthin und Guanin als Substrate akzeptiert (HGPRT). Eine solche Phosphoribosylierung der freien Basen wurde für die Pyrimidine bisher nur im Falle von Uracil beschrieben, weiterhin eine Phosphorylierung von entsprechenden Nucleosiden.

5.3 Primärstruktur der Nucleinsäuren

Die Nucleinsäuren sind kettenförmige Makromoleküle. Ihre Bausteine sind die Nucleotide. Ähnlich wie bei den Proteinen kann man verschiedene Stufen der molekularen Ordnung unterscheiden:

1. Die Primärstruktur ist die Sequenz der Nucleotide bzw. Basen; in dieser Sequenz liegt die Information, die die DNA bzw. RNA trägt.
2. Die Sekundärstruktur ist hier definiert als die Folge der Paarung komplementärer Basen (z.B. in der tRNA als kleblattförmige Darstellung, s. S. 141).
3. Die Tertiärstruktur bezeichnet die vollständige Raumstruktur mit bekannter Position aller Atome (z.B. die DNA-Doppelhelix, aber auch die räumliche Anordnung des tRNA-Kleblatts als hakenförmige Struktur).

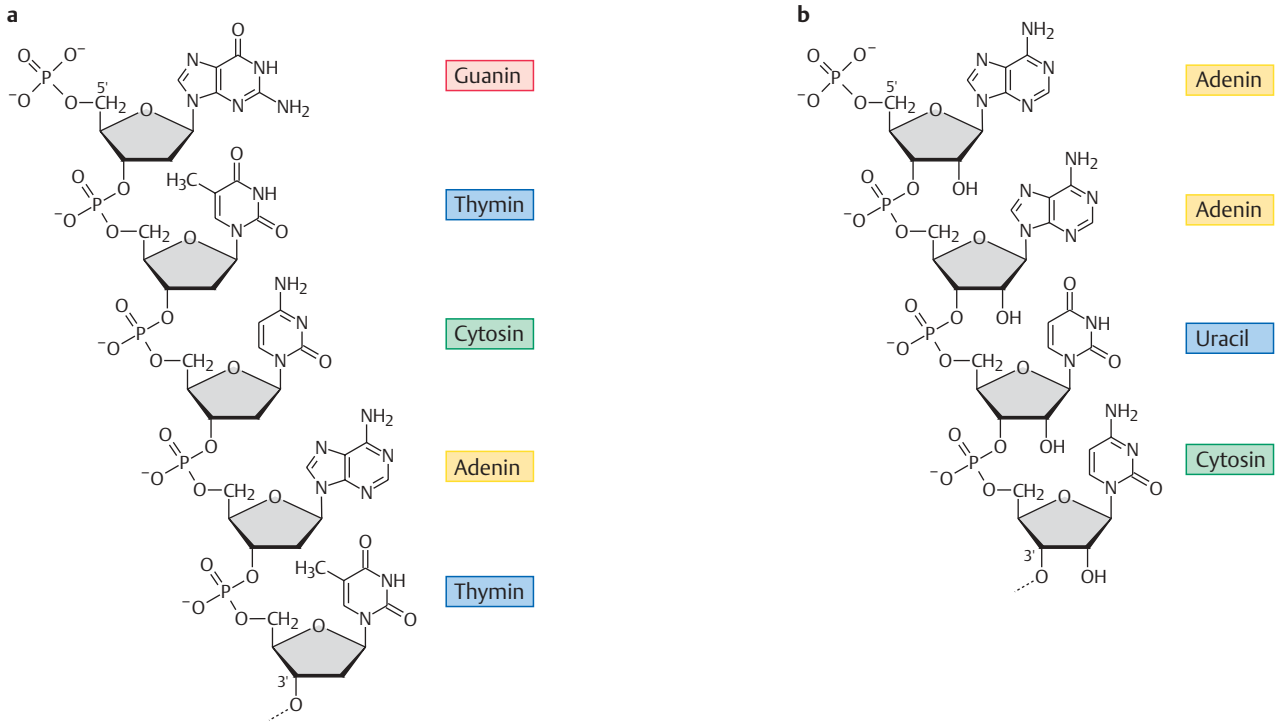
Primärstruktur der Desoxyribonucleinsäure (DNA). Die Nucleinsäuren sind chemisch Polynucleotide: Zahlreiche Nucleoside sind durch Phosphorsäure (in Diesterbindung) miteinander verknüpft. Da bei den Desoxyribonucleosiden, die wir zunächst betrachten, die Stellung 1' der Desoxyribose durch die Base, die Stellung 4' durch den furanoiden Ring besetzt ist, kann die Phosphorsäure nur die Hydroxyle 3' und 5' miteinander verknüpfen. Aus dieser Art der Kettenbildung ergeben sich zwei definierte Enden des Nucleinsäure-Moleküls: Nach einer Übereinkunft schreibt man die Kette so, dass das 5'-OH-Ende, das noch einen Phosphat-Rest trägt, links, das 3'-OH-Ende rechts steht. Das 5'-Ende mit den ersten fünf Desoxynucleotiden eines DNA-Strangs ist in 5.8a dargestellt.

Bei einer anderen Darstellung wird die Fischer-Projektion der Ribose oder Desoxyribose durch einen senkrechten Strich, die Phosphorsäure durch ein P symbolisiert (5.9).

Als Basen sind in 5.8a die Purin-Derivate Adenin und Guanin und die Pyrimidin-Derivate Cytosin und Thymin aufgeführt. Das Vorkommen von Thymin kennzeichnet die Desoxyribonucleinsäure, Ribonucleinsäuren enthalten stattdessen Uracil (5.8b).

In der DNA stehen Adenin und Thymin im Molverhältnis 1:1, ebenso Guanin und Cytosin. Damit sind in doppelsträngiger DNA stets gleich viele Purin- und Pyrimidin-Basen vorhanden. Wie später gezeigt wird, ist dies eine logische Konsequenz der Basenpaarungsregeln.

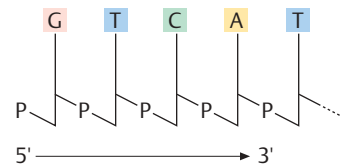
Molekülgröße. Die Länge der DNA-Ketten kann außerordentlich groß sein. Es hat sich eingebürgert, als Maß für die Kettenlänge die Zahl der Basen (bei Doppelsträngen: Basenpaare) in Einheiten von je 1000, d. h. in Kilobasen (kb) anzugeben (s. 5.1, S. 96). Man kann natürlich auch die relative Molekülmasse M_r (S. 15) als Einheit wählen; zur



5.8 Struktur der Nucleinsäuren.

a Formelausschnitt eines DNA-Strangs mit Phosphat am 5'-Ende. Kurzschreibweise dieser Sequenz: pdG-dT-dC-dA-dT oder d(pGpTpCpApT) oder GTCAT.
 b Formelausschnitt eines RNA-Strangs mit Phosphat am 5'-Ende.

Umrechnung sei angegeben, dass die mittlere Molekülmasse einer Nucleotid-Einheit 310 beträgt; näherungsweise rechnet man oft mit 330 (3 Nucleotide zu M_r 1000).
 Die DNA einzelner Chromosomen ist aus einer einzigen Doppelhelix aufgebaut. Diese erreicht zum Beispiel bei dem längsten der vier Chromosomen von *Drosophila melanogaster* eine Länge von ca. 26 mm und ist aus $76 \cdot 10^6$ Basenpaaren aufgebaut.
 Das ringförmige Chromosom des Bakteriums *Escherichia coli* enthält 3800 kb, und eine der kleinsten Virusnucleinsäuren, die des Affenvirus SV 40, ist nur 5230 Basenpaare lang (s. a. 5.1).



5.9 Sequenzdarstellung einer Nucleinsäure. Der senkrechte Strich symbolisiert die Ribose oder Desoxyribose, P steht für Phosphorsäure.

Primärstruktur der Ribonucleinsäuren (RNA). Sie sind ganz ähnlich aufgebaut wie die DNA, bestehen also ebenfalls aus zahlreichen Nucleosiden, die durch Phosphorsäure über die 3'- und die 5'-OH-Gruppe miteinander verknüpft sind. Das Prinzip ist in der 5.8b dargestellt.

Man unterscheidet nach ihrer Funktion verschiedene Klassen von Ribonucleinsäuren:

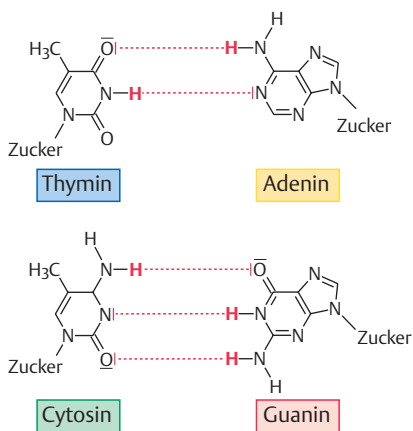
- Transfer-RNA (tRNA),
- ribosomale RNA (rRNA),
- Messenger-RNA (mRNA)

und weitere RNA-Arten (wie z. B. die Vorläufer von mRNA, prä-mRNA bzw. hnRNA, *heterogeneous nuclear RNA*) oder kleine Kern-RNA-Arten, „small nuclear RNA“, (snRNA), deren Funktion bei der Besprechung der Transkriptionsmechanismen (S. 128) beschrieben wird.

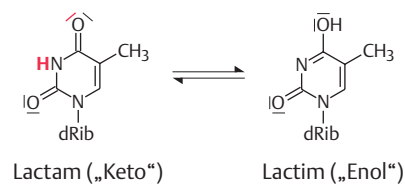
Wir behandeln diese verschiedenen Ribonucleinsäuren an späterer Stelle (Kap. 6); hier sei nur erwähnt, dass sie nicht nur verschiedene Funktionen besitzen, sondern auch verschieden lang sind. Im Vergleich zu Messenger-RNA und ribosomaler RNA sind *Transfer-Ribonucleinsäuren* kleine Moleküle, sie bestehen aus circa 90 Nucleotiden und enthalten relativ viele seltene Basen. In den Ribosomen höherer

Länge der verschiedenen RNA-Arten.

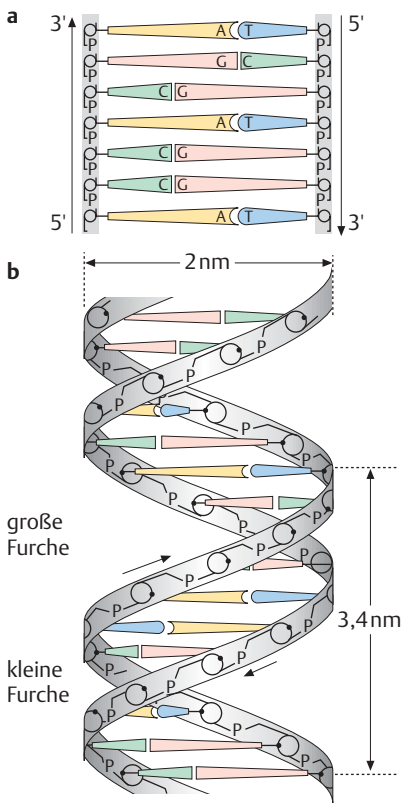
	Anzahl Nucleotide
tRNA	80-90
mRNA	je nach codiertem Protein
rRNA	150-4000 (5S, 5,8S, 18S, 28S)
snRNA	50-200 (U1-U6 snRNA)



☛5.10 **Basenpaarung durch Wasserstoff-Brücken.** Die glykosidischen Bindungen zum Zucker stehen einander nicht diametral gegenüber, sondern bilden einen Winkel.



☛5.11 **Lactam- und Lactim-Form des Thymins.**



☛5.12 **Basenpaarung der DNA.** a Schema der Basenpaarung. Die komplementären Stränge haben entgegengesetzte Polarität. b Räumliche Struktur der Doppelhelix.

Organismen findet man vier verschiedene *ribosomale Ribonucleinsäuren*, nach ihren Sedimentationskonstanten als 5S-, 5,8S-, 18S- und 28S-rRNA bezeichnet (s. ☛6.5, S. 144).

Die *Messenger-Ribonucleinsäuren* (mRNA) stellen eine heterogene Gruppe mit Kettenlängen von einigen 100 bis zu mehreren 1000 kb dar. Im Zellkern findet man Vorstufen der mRNA, die aus noch sehr viel größeren Molekülen bestehen.

5.4 Raumstruktur der DNA

Watson und Crick haben aufgrund der von Chargaff bestimmten Basenzusammensetzung und der von Franklin und Wilkins ermittelten Röntgendaten ein Modell entwickelt, das die Grundlage der modernen Molekularbiologie geworden ist.

Basenpaarung. Dem Strukturmodell liegt die Annahme zugrunde, dass je zwei Basen durch Wasserstoff-Brückenbindungen (s. S. 2) miteinander in Beziehung treten; das ist bei dem Paar Adenin-Thymin und bei Guanin-Cytosin möglich. Dabei werden zwischen A und T zwei und zwischen G und C drei Wasserstoff-Brückenbindungen ausgebildet (☛5.10).

Durch diese Basenpaarung werden zwei Polynucleotid-Stränge zusammengehalten; gleichzeitig bestimmt jede der Basen den entsprechenden Partner, so dass *ein* Strang die vollständige Sequenz der Basen im anderen Strang festlegt. In ☛5.12 ist das dargestellt; jedes Basensymbol korrespondiert nur mit einem bestimmten Partner und bestimmt ihn damit. Kurze und lange Symbole verdeutlichen, dass immer eine *Pyrimidin*- mit einer *Purin*-Base paart. Die Basenpaarung kann nur stattfinden, wenn alle jeweils beteiligten Basen in der *Lactam*-(Keto)-Form vorliegen (☛5.11).

Die Doppelhelix. Denkt man sich das zweisträngige Band verdreht, so erhält man ein ungefähres Abbild vom Watson-Crick-Modell der Desoxyribonucleinsäure: Zwei DNA-Einzelstränge (oder zwei Hälften des Moleküls) sind in Form eines Doppelstranges so zu einer rechtsgängigen Schraube miteinander verdreht, dass eine Windung ca. 10 Basenpaare enthält (Grund- oder B-Konformation, s. u.). Eine Schemazeichnung des Modells zeigt ☛5.12b. Die Basenpaare liegen horizontal, dadurch können ihre π -Elektronen über van-der-Waals-Kräfte in Wechselwirkung treten. Diese Stapelung der Basen (engl. *base stacking*) trägt wesentlich zur Stabilität der Konformation bei. Die Zucker-Fünfringe und die Phospho-Diester-Brücken bilden den äußeren Mantel der Schraube, deren Durchmesser etwa 2 nm beträgt. Die beiden Stränge haben entgegengesetzte „Polarität“ (= Richtung vom 5' zum 3'-Ende).

Wie schon das Schema der Basenpaarung (☛5.10) zeigt, stehen die beiden Zuckerreste sich nicht diametral gegenüber. Dies führt dazu, dass die Windungen der beiden Helices z. T. weiter entfernt sind, z. T. näher beieinander liegen. Es gibt deshalb eine *große (breite) Furche* und eine kleine oder *schmale Furche* auf der Oberfläche der DNA-Doppelhelix (☛5.12b und ☛5.13a).

A- und B-Konformation. Neben der Grundform der DNA, welche als B-DNA bezeichnet wird, wurde bei geringerer Hydratisierung eine parakristalline A-DNA beobachtet, bei der die Basen gegenüber dem Zucker-Phosphat-Gerüst geneigt erscheinen und eine vollständige Windung 11 Basenpaare umfasst. Wie die B-DNA, so entspricht auch die A-DNA einer *rechtsgängigen Schraube*.

Nach dem Prinzip der Basenpaarung können auch RNA-RNA-Doppelstränge und DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge ausgebildet werden.

RNA-RNA-Doppelstränge und DNA-RNA-Hybrid-Doppelstränge besitzen eine A-Form.

Die unterschiedlichen Raumstrukturen von A- und B-DNA beruhen in erster Linie auf verschiedenen Konformationen der Desoxyribose unter den jeweiligen Hydratationsbedingungen: In A-DNA liegt das C-3' der Desoxyribose über der Ebene des Furanrings (C₃'-endo), in B-DNA ist das Desoxyribose-Molekül in der C₂'-endo-Konformation (das C-2' liegt über der Ringebene [zur Raumstruktur von Zucker-Molekülen s. S. 230]). Im RNA-Molekül verhindert die OH-Gruppe an C₂' das Entstehen einer B-Form eines RNA-RNA- oder RNA-DNA-Doppelstrangs.

Z-Konformation der DNA. Im Watson-Crick-Modell bilden beide Stränge rechtsgewundene Schrauben. Es ist auch eine Form mit entgegengesetzter Schraubenrichtung möglich. Sie wird als Z-Konformation bezeichnet, weil hier das Zucker-Phosphat-Gerüst zick-zackförmig geknickt vorliegt (☞ 5.13b). Vieles weist darauf hin, dass in Eukaryonten-Chromosomen einzelne Abschnitte in Z-Konformation vorliegen können. Dies wird begünstigt durch Sequenzen, in denen Purin- und Pyrimidin-Basen abwechselnd aufeinander folgen. Wenn umgebende DNA durch ihre Überspiralisierung einen Zwang auf solche DNA ausübt, könnte es hier zur Ausbildung von Z-DNA-

☞ 5.3 Vergleich der verschiedenen DNA-Formen.

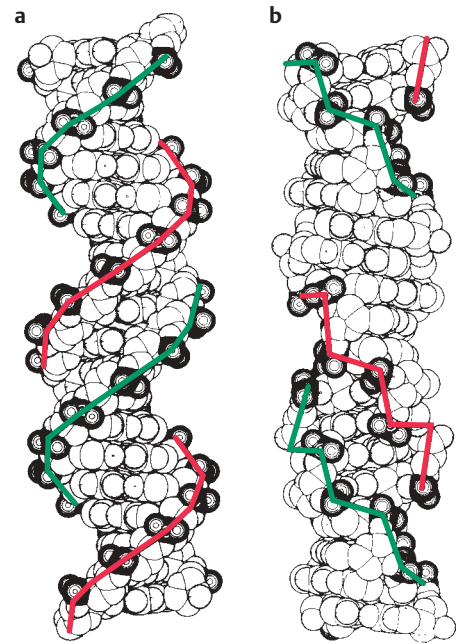
	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Windungsrichtung	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Helixdurchmesser	2,37 nm	2,55 nm	1,84 nm
Länge pro Windung (Ganghöhe)	3,54 nm	2,53 nm	4,56 nm
Basen pro Windung	10,4	11	12

Abschnitten kommen. Der Übergang von B-DNA zur Z-DNA erfolgt besonders leicht in GC-reichen Abschnitten; er lässt sich in vitro durch hohe Salzkonzentration erzielen.

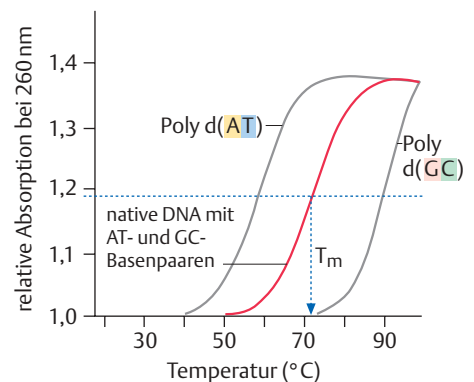
„Denaturierung der DNA“. Ähnlich wie bei der Erwärmung von Proteinen Nebenvalenzen gelöst werden und die native Konformation verloren geht (Denaturierung, s. S. 35), so bleibt auch die Struktur des Doppelstrangs nicht stabil. Erwärmt man die DNA auf etwa 70 bis 90 °C, so beobachtet man eine Aufspaltung des Doppelstrangs zu Einzelsträngen durch Lösung der Wasserstoff-Brückenbindungen. Dabei ändern sich die physikalischen Eigenschaften (u. a. Viskosität, Lichtabsorption, s. ☞ 5.14). Man hat dieses Aufbrechen der Helixstruktur mit dem Schmelzvorgang verglichen, bei dem das Kristallgitter zusammenbricht, und spricht in diesem Sinne vom „Schmelzpunkt“ der DNA. Er ist abhängig von der Basenzusammensetzung; eine GC-reiche DNA hat einen höheren Schmelzpunkt, da sich zwischen G und C drei Wasserstoff-Brücken ausbilden können.

Renaturierung. Unter geeigneten Bedingungen lassen sich denaturierte DNA-Abschnitte wieder zu Doppelsträngen zusammenfügen. Die Geschwindigkeit dieser Renaturierung ist umso größer, je mehr gleichartige Sequenzen in einem Nucleinsäure-Gemisch vorhanden sind. Man drückt die Geschwindigkeit der Reassoziationszeit durch ein Produkt aus DNA-Konzentration und Renaturierungszeit, den sogenannten C₀t-Wert aus. Die C₀t-Kurven haben eine große Rolle bei der Analyse der DNA auf repetitive Sequenzen gespielt (s. S. 111).

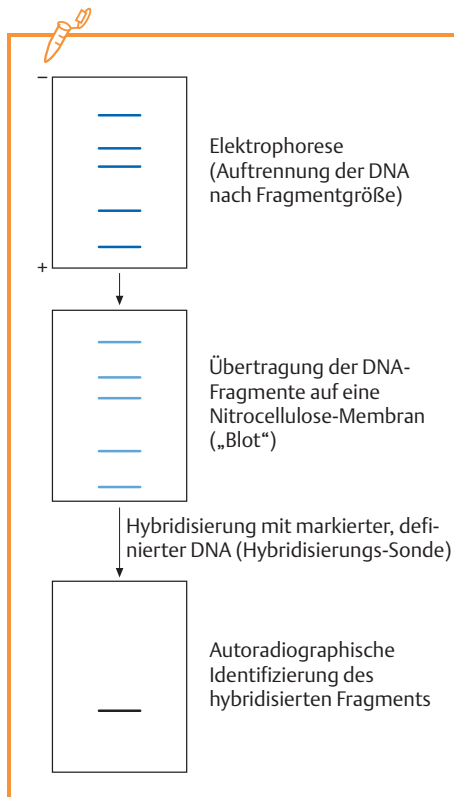
Hybridisierung. Nucleinsäuren, die über längere Strecken des Moleküls eine komplementäre Basensequenz besitzen, können sich zu



☞ 5.13 Kalottenmodell von B- und Z-DNA. a) B-DNA, b) Z-DNA. Die Zucker-Phosphat-Bindungen sind hervorgehoben und zeigen die Umkehrung der Schraubenwindung sowie ihren geknickten Verlauf in der Z-DNA (nach A. Rich).



☞ 5.14 DNA-Schmelzkurve. Die mittlere Schmelztemperatur (T_m , auch „Schmelzpunkt“ genannt) hängt von der Basenzusammensetzung ab. (Poly d[AT] und Poly d[GC] sind synthetische Polydesoxynucleotide, die ausschließlich GC- bzw. AT-Basenpaare aufweisen.)



Identifizierung von DNA-Abschnitten (Southern-Blot)

Eine einfache Form der Identifizierung von DNA-Abschnitten durch Hybridisierung wurde von E. M. Southern entwickelt. Hierzu spaltet man die zu untersuchende DNA an spezifischen Stellen (durch Restriktionsendonucleasen, s. u.) in Fragmente verschiedener Größen und trennt diese durch Elektrophorese in einem geeigneten Trägermaterial (Agarose, s. Kap. 17.6) nach ihrer Größe auf. Aus dieser Agarose kann man die DNA nach Denaturierung auf DNA-bindende Membranmaterialien (z. B. Nitrocellulose) übertragen. Wegen der Analogie zum Löschblatt (engl. *blotting paper*) wird die Methode als *Southern-Blot* bezeichnet. Nach der Fixierung der DNA auf der Nitrocellulose-Membran kann diese dann der vorgesehenen Hybridisierungssonde ausgesetzt werden. Die markierte Sonde wird nur dort binden, wo sie komplementäre DNA vorfindet, und kann z. B. durch Autoradiographie genau lokalisiert werden (☞ 5.15).

In gleicher Weise kann RNA elektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranfilter übertragen und durch eine geeignete Sonde aufgespürt werden. Diese Methode wird in Anlehnung an die *Southern*-Hybridisierung als *Northern*-Verfahren bezeichnet. Ganz analog bezeichnet man die Identifizierung membrangebundener, elektrophoretisch aufgetrennter Proteine mit Hilfe von Antikörpern als *Western-Blot* (s. S. 42)

☞ 5.15 **Prinzip des Southern-Blot** (Hybridisierungsanalyse nach elektrophoretischer Auftrennung von Nucleinsäuren).

Doppelschrauben zusammenlagern, die aus je einem Strang von jeder Nucleinsäure bestehen. Wenn die beiden Stränge aus verschiedenen Genomen stammen oder aus einem DNA- und einem RNA-Strang zusammengesetzt sind, bezeichnet man dies als *Hybrid-Bildung*. Sie kann sowohl zwischen Einzelsträngen zweier strukturell verwandter DNA-Moleküle (z. B. Gene für homologe Proteine aus verschiedenen Tierarten) als auch zwischen einem Molekül DNA und einem komplementären RNA-Molekül eintreten.

Das Prinzip der Hybridisierung kann zum *Nachweis einer bestimmten DNA oder RNA* in einem Nucleinsäure-Gemisch dienen. Hierzu wird eine einzelsträngige DNA oder RNA, welche zur Sequenz der gesuchten Nucleinsäure komplementär ist, in markierter Form (zum Beispiel durch Einbau radioaktiver Isotope) als Hybridisierungssonde verwendet. Zur Hybridisierungsanalyse muss die zu untersuchende DNA einzelsträngig angeboten werden. Dies wird durch Alkalibehandlung oder Erhitzen über die Denaturierungs-Temperatur erreicht. Die Einzelstrang-DNA wird dann bei geeigneter Temperatur (die unterhalb der Denaturierungs-Temperatur liegen muss) mit der markierten Sonden-Nucleinsäure zur Hybridisierung gebracht. Durch geeignete Trennmethode werden dann die Hybride von verbliebenen Einzelsträngen getrennt und markierte DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybride nachgewiesen (s. ☞ 5.15).

5.5 Analyse der DNA-Struktur

Wie bei den Polypeptid-Ketten, so ist auch bei DNA die Ermittlung ihrer Sequenz eine Voraussetzung zum Verständnis ihres räumlichen Aufbaus und ihrer Funktion. Angesichts der Dimensionen der DNA galt die Sequenzermittlung lange Zeit als unlösbare Aufgabe. Erst

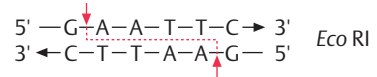
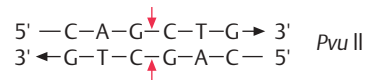
nach 1975 wurden effizientere Methoden zur Sequenzbestimmung der DNA entwickelt. Wie bei den Proteinen wird das Makromolekül zunächst in größere Bruchstücke zerlegt.

Spaltung durch Desoxyribonucleasen. Bei der enzymatischen Spaltung von Nucleinsäuren wird die Phosphorsäurediester-Bindung hydrolytisch gelöst. Wie bei den Proteinase (s. S. 200) unterscheidet man *Exonucleasen*, die vom Ende der Kette her Nucleotid freisetzen, und *Endonucleasen*, die innerhalb der Kette mehr oder weniger spezifisch spalten.

Viele Nucleasen (z. B. DNase I) greifen spezifisch Doppelstrang-DNA an, andere (z. B. Exo-DNase I und Endonuclease S₁) vermögen nur einzelsträngige DNA zu spalten. Die lange bekannten DNasen, die man etwa im Pankreas findet, spalten die hochmolekularen Nucleinsäuren in kleine Bruchstücke; es sind Verdauungsenzyme.

Die **Restriktionsendonucleasen** haben für die Strukturaufklärung der DNA eine große Bedeutung erlangt. Es sind bakterielle Enzyme, die sehr spezifisch für bestimmte Basensequenzen sind. Diese Sequenzen sind, wie 5.16 zeigt, meist zentralsymmetrisch; man nennt sie in einem solchen Fall Palindrom. Andere Erkennungsstellen weisen im Zentrum unsymmetrische Bereiche auf oder weichen völlig von dem Palindrom-Aufbau ab. Bisher wurden mehr als 500 verschiedene Restriktionsendonucleasen beschrieben. Sie werden mit Namensabkürzungen der Herkunftsbakterien benannt. Falls aus einer Spezies mehrere verschiedene Enzyme isoliert werden können, werden diese mit römischen Ziffern durchnummeriert (z. B. *Pvu* I und *Pvu* II aus *Proteus vulgaris*);

Spaltstellen-Kartierung. Voraussetzung für die Anwendung der Restriktionsendonucleasen für die DNA-Analyse ist ein geeignetes einheitliches DNA-Präparat, das nicht zu lang ist. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Gewinnung geeigneter DNA in ausreichender Menge ist die Klonierung in Bakteriophagen oder bakteriellen Plasmiden geworden (s. S. 173 ff.).



5.16 Die Spaltung der DNA durch Restriktionsendonucleasen führt häufig zu versetzten Enden. In dem gezeigten Beispiel resultieren überhängende 5'-Enden (z. B. bei Spaltung durch *Eco* RI). Andere Enzyme erzeugen stumpfe Enden (z. B. bei Spaltung durch *Pvu* II), wiederum andere führen zu überhängenden 3'-Enden.

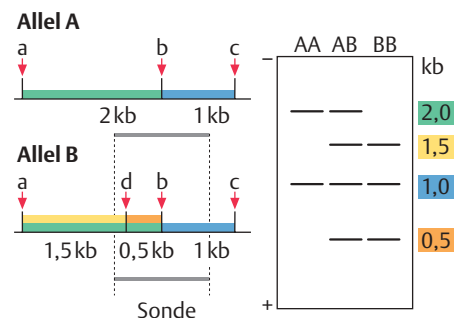
Palindrom bezeichnet ursprünglich Wörter, die von vorn und hinten gelesen dasselbe ergeben, wie Anna oder Reliefpfeiler.

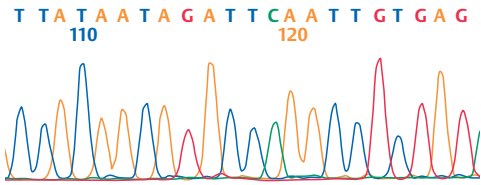


Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Die Größenanalyse von DNA-Fragmenten nach Spaltung mit Restriktionsenzymen (5.16) kann, zusammen mit der Southern-Blot-Hybridisierung, dazu dienen, Variationen in der Verteilung von Restriktionsschnittstellen im Genom verschiedener Individuen (oder in den beiden Allelen eines Individuums) nachzuweisen: Zunächst lässt man die DNA durch ein Restriktionsenzym schneiden. Anschließend sucht man mit Hilfe einer Hybridisierungsprobe nach einem bestimmten DNA-Abschnitt. Entsprechend der Anordnung der Schnittstellen in der Umgebung dieses DNA-Abschnitts zeigt die Sonde Fragmente unterschiedlicher Länge an (5.17). Falls eine Korrelation eines derartigen *Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus* (RFLP) mit einer genetisch bedingten Erkrankung besteht, ist die RFLP-Analyse von diagnostischer Bedeutung.

5.17 **Prinzip des RFLP-Nachweises.** In Allel A spaltet ein bestimmtes Restriktionsenzym an den Stellen a, b und c, so dass Fragmente von 2 kb und 1 kb entstehen. Beide Fragmente reagieren in der Southern-Blot-Hybridisierung (rechts im Bild) mit einer markierten Sonde, welche komplementäre Abschnitte zu beiden Fragmenten enthält. Wenn in Allel B eine weitere Spaltstelle (d) zwischen a und b hinzukommt, wird das 2-kb-Fragment in zwei Teilfragmente gespalten, die beide von der Sonde erfasst werden. Bei Vorliegen der Allele A und B sind alle 4 Fragmente nachweisbar.





◀5.18 DNA-Sequenzierung mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden. Jedes entsprechende DNA-Fragment ist an seinem Ende markiert und wird beim Verlassen des Elektrophorese-Gels basenspezifisch registriert.

Hat man eine geeignete DNA isoliert, dann kann man durch Spaltung mit Restriktionsendonucleasen Bruchstücke erhalten, die z. B. durch Gelelektrophorese nach Molekülgröße getrennt werden können. Durch überlappende Spaltung mit mehreren Nucleasen kann man die Spaltstücke einander zuordnen und schließlich eine Karte der Spaltstellen aufstellen.

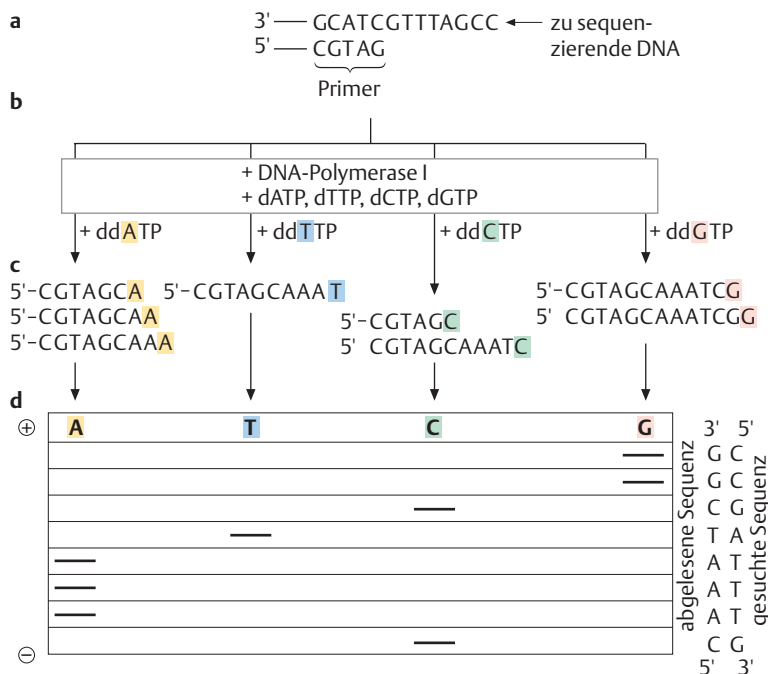
Sequenzierung der DNA. Für die Sequenzermittlung von DNA wird bevorzugt die Methode von Sanger benutzt (Didesoxymethode). Sie basiert darauf, anhand des zu sequenzierenden Stranges komplementäre Tochterstränge unter Verwendung radioaktiv markierter Desoxyribonucleotide in getrennten Ansätzen zu synthetisieren, wobei jedoch durch Zugabe von Nucleotid-Analoga, die zum Kettenabbruch führen, eine vollständige Synthese verhindert wird. Die auf diese Weise erzeugten unterschiedlich langen Fragmente können dann elektrophoretisch aufgetrennt werden, und anhand des Autoradiogramms kann die Sequenz abgelesen werden (s. ▶5.19).

Inzwischen wurden Verfahren entwickelt, bei denen mit farblich unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxynucleotiden die Synthese terminiert wird. Dadurch können die Synthesen gemeinsam durchgeführt werden. Die durch anschließende Elektrophorese getrennten Syntheseprodukte lassen sich dann anhand ihrer Fluoreszenz bei Anregung mit einem Argon-Laser identifizieren, wenn sie das Gel verlassen. Die Sequenz der Farben entspricht der Basensequenz (▶5.18).



Didesoxymethode zur DNA-Sequenzierung (Sanger)

Die Synthese wird mit DNA-Polymerase an der zu sequenzierenden, einzelsträngigen DNA durchgeführt (zur DNA-Synthese s. S. 120 ff.). Zum Kettenabbruch wird in getrennten Ansätzen neben den normalen 2'-Desoxyribonucleosidtriphosphaten (davon eines radioaktiv oder durch Fluoreszenz markiert) jeweils eines der vier Nucleotide als 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphat eingesetzt. Wird nun dieses Analogon in den wachsenden Strang eingebaut, kann die Kette wegen des Fehlens der 3'-OH-Gruppe am Zucker nicht mehr weiter wachsen. Die Konzentrationen an Desoxyribonucleosidtriphosphaten und ihren 2',3'-Analogen müssen so gewählt werden, dass nach dem Zufallsprinzip das gesamte Spektrum der jeweils möglichen Kettenlängen erreicht werden kann.



◀5.19 Sequenzierung nach Sanger.

a Die zu sequenzierende DNA wird mit einem *Primer* hybridisiert (kurzes DNA-Fragment, das komplementär zum Ende der zu sequenzierenden DNA ist und als Anfangsstück zur DNA-Synthese dient, s. S. 121).

b Die DNA wird auf vier Ansätze verteilt und jeweils DNA-Polymerase hinzugegeben sowie die vier Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), von denen eines radioaktiv markiert ist. Zusätzlich wird jedem Ansatz ein 2',3'-Didesoxynucleotid hinzugegeben (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP).

c Die Didesoxynucleotide führen in den vier Ansätzen an unterschiedlichen Stellen zum Kettenabbruch. Gezeigt sind nur die neusynthetisierten Ketten.

d Durch Elektrophorese werden die Syntheseprodukte aufgetrennt, nach Autoradiographie (oder durch Fluoreszenzmessung, s. ▶5.18) kann die Sequenz abgelesen werden. Die gesuchte Sequenz ist zur abgelesenen Sequenz komplementär.


Bedeutung der DNA-Sequenzen. Die große Bedeutung, die der DNA-Sequenzierung beigemessen wird, hat viele Gründe. Wie schon erwähnt, steckt in der DNA auch die genetische Information und damit die Kenntnis über die Primärstruktur der Proteine. Die DNA-Sequenzierung erleichtert also die Bestimmung der Primärstruktur von Proteinen und, davon ausgehend, die Erforschung ihrer Funktionsweise. Sie ermöglicht die Erkennung von Mutationen (s. u.) und kann damit pathobiochemische Mechanismen erklären. Die DNA-Sequenzen geben aber nicht nur Aufschluss über proteincodierende Abschnitte, sondern auch über solche Abschnitte, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind und als Angriffsort vielfältiger Signale wirken. Wir werden auf solche Sequenzen in späteren Abschnitten eingehen.

Nucleotid-Sequenz der RNA. Zwar wurden Pionierarbeiten zur Sequenzermittlung von Nucleinsäuren an RNA durchgeführt (zuerst an tRNA für Alanin und tRNA für Serin), inzwischen ist die aufwändige Sequenzierung von RNA-Molekülen allerdings von geringerer Bedeutung: Durch die Entwicklung der Techniken zur Genklonierung (s. S. 173 ff.) und zur DNA-Sequenzierung kann die RNA-Sequenz aus dem entsprechenden Gen (oder der entsprechenden cDNA, s. S. 175) abgelesen werden.


5.6 Chromosomenstruktur

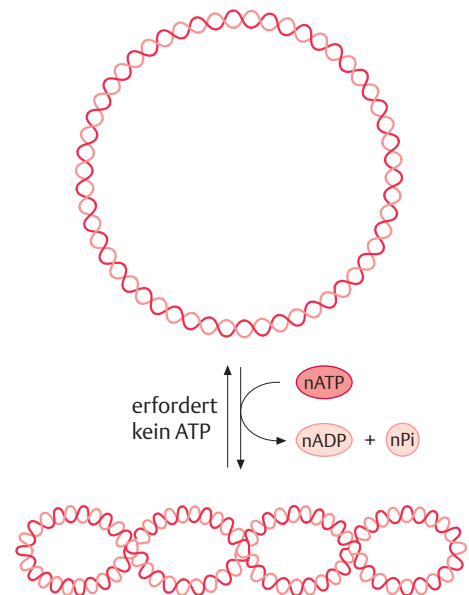
Prokaryonten-Chromosom. Die Bakterien haben meist nur ein Chromosom, welches als sogenanntes *Nucleoid* einen Teil des Innenraums der Bakterienzelle einnimmt. Dabei ist die DNA zum Teil mit basischen Proteinen verknüpft, die in ihrer Zusammensetzung eine entfernte Verwandtschaft zu chromosomalen Proteinen der Eukaryonten aufweisen. Die gesamte Erbinformation ist in einer einzigen Nucleinsäure-Helix untergebracht, welche beim Darmbakterium *E. coli* aus etwa 4 Millionen Basenpaaren aufgebaut und zu einem Ring geschlossen ist. Auch die kleineren genetischen Einheiten der Plasmide und der Viren sind meist ringförmig.


In Eukaryontenzellen besitzen *Mitochondrien* und *Chloroplasten* ringförmige DNA-Moleküle. Diese tragen Gene für einen Teil der Proteine dieser Organellen sowie Gene für mitochondriale rRNA und tRNA.

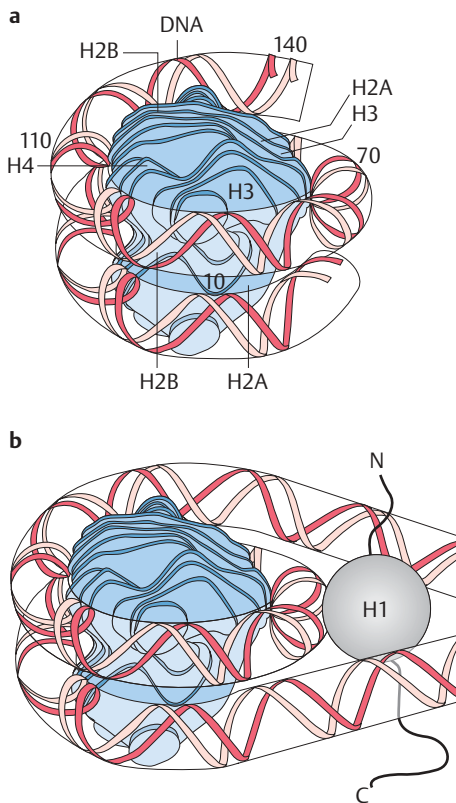
Ringförmige DNA kann, wie  5.20 zeigt, zu einer **Superhelix** verdrillt werden, wenn einer der beiden DNA-Stränge gespalten, um den anderen herumgeführt und wieder neu verknüpft wird. Umgekehrt kann superhelikale DNA zu entspannter DNA relaxiert werden. Hierzu bedarf es bestimmter Enzyme, die als **DNA-Topoisomerasen** klassifiziert werden. Enzyme, die vorübergehend nur einen der beiden DNA-Stränge spalten, werden Topoisomerase I genannt, während Topoisomerase vom Typ II beide Stränge spaltet. Die bakterielle Topoisomerase II wird auch als *Gyrase* bezeichnet. Sie verdrillt das Molekül unter Spannung. Die Energie hierzu kommt aus der Spaltung von ATP. Da Topoisomerase II an der DNA-Replikation beteiligt ist, können spezifische Hemmstoffe der bakteriellen Topoisomerase II (*Gyrase-Hemmer*) als Antibiotika eingesetzt werden. Inhibitoren der Topoisomerasen I und II von Eukaryonten werden als Cytostatika verwendet.

Eukaryonten-Chromosom. Das Wort Chromosom bezeichnet ursprünglich die schleifenförmigen, stark färbbaren Strukturen, die im Verlauf der mitotischen Kernteilung sichtbar werden. Jedes Chromosom enthält ein Molekül doppelsträngiger DNA, ist also eine genetische Einheit. Die DNA würde in gestreckter Form einige Zentimeter lang sein; durch basische Proteine (Histone) und andere Kernproteine (Nicht-Histone, s. u.) wird sie so verpackt, dass schließlich die mikro-

 **Sequenzierung von ganzen Genomen.** Der Fortschritt der Klonierungstechniken (s. S. 173 ff.) und der Sequenzierungsmethoden ermöglicht im Prinzip die Aufklärung der gesamten genetischen Information einzelner prokaryonten oder eukaryonten Organismen. Damit sind neben den Strukturen genfreier DNA-Abschnitte, die bei Eukaryonten den weit überwiegenden Anteil der DNA ausmachen, auch die Sequenzen aller Gene des jeweiligen Organismus verfügbar. Aus den Sequenzen der DNA-Abschnitte, welche die Strukturen von Proteinen bestimmen, können damit die Sequenzen sämtlicher potenziell verfügbarer Proteine abgeleitet werden; man fasst diese in Analogie zum Genom unter dem Begriff *Proteom* zusammen. Nach verschiedenen Virus- und Bakterien-Genomen wurde als erstes Eukaryonten-Genom die gesamte DNA-Sequenz der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* aufgeklärt. Die Sequenz des humanen Genoms wurde 2001 publiziert.



 **5.20 Bildung einer Superhelix durch eine DNA-Topoisomerase II (DNA-Gyrase).** Zum Verdrillen der zirkulären DNA müssen Phosphodiester-Bindungen gelöst und nach Rotation wieder geknüpft werden; dazu ist ATP erforderlich. Für die umgekehrte Reaktion (Relaxation) benötigt das Enzym kein ATP.



☞ **5.21 Modell eines Nucleosomen-Core-Partikels**, welcher aus einem Histon-Oktamer und DNA (146 Nucleotidpaare) besteht (a). In Anwesenheit von Histon H1 (b) wird die DNA vollständig ein zweites Mal um das Oktamer herumgeführt (166 Nucleotidpaare) und am Eintritts- und Austrittsort versiegelt. Diese Bindung wird durch die zentrale globuläre Domäne des H1-Moleküls vermittelt. Die exakte H1-Position in diesem Bereich ist noch strittig. (Bild a nach Kornberg RD, Klug A. The Nucleosome. Sci.Am. 1981.)

🔍 **Histon-Oktamere** der Core-Partikel werden durch Wechselwirkungen der zentralen, globulären Domänen der Core-Histone (H2A, H2B, H3 und H4) gebildet (s. ☞ 6.29, S. 238). Die N-terminalen Abschnitte der Core-Histone (je nach Histonart ca. 20 bis 40 Aminosäuren lang) sind nicht in die kompakte Oktamer-Struktur eingebunden (in ☞ 5.21 nicht gezeigt). Sie sind besonders reich an basischen Aminosäuren und gehen mit DNA ionische Wechselwirkungen ein. Histon-Modifikationen (u. a. Acetylierung, Methylierung) finden in erster Linie an diesen N-terminalen Domänen statt und leisten einen wichtigen Beitrag zur Regulation der Genexpression (s. S. 138). Hieran ist auch die Modifikation durch Ubiquitin beteiligt, sie steht hier nicht im Zusammenhang mit dem Proteinabbau.

skopisch sichtbaren Chromosomen entstehen. Das Massenverhältnis DNA zu Protein beträgt ungefähr 1:1. Im Interphase-Kern ist die Struktur der Chromosomen stark aufgelockert; sie erfüllen als **Chromatin** mehr oder weniger gleichmäßig den Kernraum, behalten aber ihre Identität. Chromatinbereiche, die dichter gepackt sind und bei der histologischen Analyse intensiver gefärbt sind, werden im Gegensatz zum lockeren *Euchromatin* als *Heterochromatin* bezeichnet.

Chromatin-Struktur. Im Chromatin liegt die DNA überwiegend als Komplex mit Histonen (s. u.) vor. Es gibt fünf verschiedene Histon-Klassen, die mit H1, H2A, H2B, H3 und H4 bezeichnet werden; ihre Sequenz ist für mehrere Spezies bekannt. DNA und Histone sind zu Nucleosomen organisiert, die im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden können. Sie bestehen neben einem H1-Molekül aus einem Oktamer der Histone H2A, H2B, H3 und H4, die je zweimal vertreten sind. Um dieses Histon-Paket ist die DNA in $1\frac{3}{4}$ Windungen herumgewickelt (☞ 5.21). Man bezeichnet den Nucleoprotein-Komplex aus Histon-Oktamer und 146 Basenpaaren DNA als Core-Partikel; ein Stück DNA von ca. 20 bis 80 Basenpaaren dient als Verbindungsstück (Linker) zur nächsten Core-Struktur.

Durch die Bindung von Histon H1 an diesen Linker wird die DNA mit weiteren ca. 20 Basenpaaren nun vollständig um das Histon-Oktamer herumgeführt (*Chromatosom*: Histon-Oktamer + 166 Basenpaare DNA + H1). Der verbleibende Rest der Linker-DNA stellt die Verbindung zum nächsten Chromatosom her.

Im Chromatin sind die Perlschnüre aus Nucleosomen nochmals zu einer Überstruktur organisiert (☞ 5.22). Der Durchmesser dieser Faser höherer Ordnung beträgt 30 nm. Neben dieser sehr regelmäßigen Struktur wurden auch kugelige Nucleosomenaggregate in der 30-nm-Faser beschrieben.

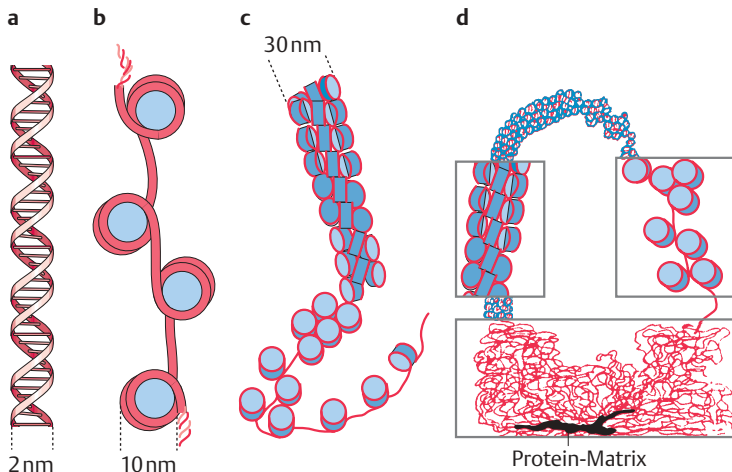
In einer nächsthöheren Stufe der Organisation sind größere Chromatin-Abschnitte (30 bis 100 kb) durch Wechselwirkung mit Proteinen des Zellkerns zu schleifenförmigen Domänen organisiert. Diese Schleifenanordnung könnte von funktioneller Bedeutung sein, indem sie eine abschnittsweise Beschränkung von Aktivierungs- oder Inaktivierungsschritten am Chromatin ermöglicht.

Histone. Histone sind kleine, basische Proteine, die sich in Größe und Primärstruktur unterscheiden. Die Aminosäure-Sequenzen der einzelnen Histon-Klassen haben sich im Verlauf der Evolution außerordentlich konservativ verhalten. Das Extrembeispiel, das Histon H4, das aus 102 Aminosäuren aufgebaut ist, weist bei den zuerst untersuchten Sequenzen aus Erbsenkeimlingen und Kalbsthymus nur den Austausch von zwei Aminosäuren auf. Auch die übrigen Histone sind in ihren Primärstrukturen weitgehend konserviert, allerdings liegen sie (besonders H1) auch innerhalb einzelner Zelltypen in mehreren leicht variierten Subtypen vor.

Histone können an einigen definierten Aminosäure-Seitenketten modifiziert werden. So können spezifische Lysin-Reste acetyliert, andere methyliert werden. Serin und Threonin an bestimmten Stellen einzelner Histone können phosphoryliert werden. Eine Modifikation von H2A und H2B kann durch *Ubiquitin* erfolgen (s. S. 201).

Dieses Peptid von 76 Aminosäuren Länge kann mit seiner C-terminalen Carboxy-Gruppe peptidartig an einen spezifischen Lysin-Rest im jeweiligen Histon angeknüpft werden. Eine andere Modifizierung der Histone (in erster Linie H1 und H2B) ist die ADP-Ribosylierung, die auch von anderen Proteinen bekannt ist (z. B. die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen durch Cholera-Toxin, s. S. 481). Insbesondere die Acetylierung wurde inzwischen als wichtiger Teilschritt der Genregulation erkannt.

Nicht-Histon-Proteine. Außer den Histonen sind noch andere Proteine mit der DNA vergesellschaftet. Man fasst sie unter dem Begriff der *Nicht-Histon-Proteine* zusammen. Aus deren Vielfalt ist eine Gruppe



ubiquitär vorkommender Proteine wegen ihres elektrophoretischen Laufverhaltens als HMG-Proteine (high mobility group) zusammengefasst worden. Prinzipiell muss man zu den Nicht-Histon-Proteinen alle im Chromatin mit der DNA, den Histonen oder der neugebildeten RNA assoziierten Proteine rechnen, die in einer Chromatin-Präparation enthalten sein können. Dazu zählen dann auch DNA- und RNA-Polymerasen, Regulationsfaktoren, die die Transkription und die Prozessierung der RNA (Kap. 6.2) kontrollieren, Gerüstproteine, an denen Chromatin-Domänen fixiert sind, und viele andere Proteine, die die Heterogenität der Nicht-Histon-Gruppe bestimmen.

Riesenchromosomen. Normalerweise enthalten Zellkerne die Menge DNA, die dem zweifachen haploiden Chromosomensatz (d. h. $2n$) entspricht. Ist die DNA-Menge größer als $2n$ z. B. $4n$ oder höher, so spricht man von Polyplodie.

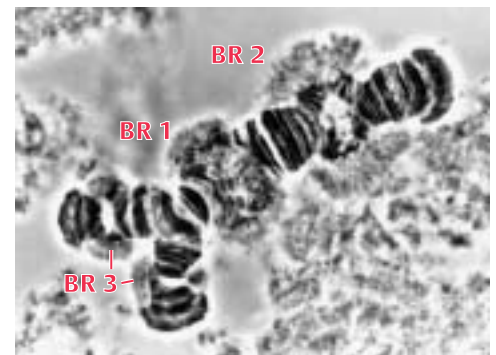
In den Speicheldrüsen mancher Insekten (auch bei *Drosophila*) ist der Grad der Polyplodie sehr hoch, er erreicht Werte von 2^{10} – $2^{12} n$. Diese sogenannte *Polytänisierung* kommt dadurch zustande, dass nach der DNA-Replikation die Zellen nicht in eine Mitose eintreten. Die vielfach replizierten Chromatiden (die dem Einzelchromosom im normalen Zellkern entsprechen) sind zu Bündeln geordnet und der Länge nach parallel aneinander gelagert. Man kann in diesen Riesenchromosomen Querscheiben erkennen, die besonders reich an DNA sind, und Interbanden-Abschnitte, die weniger DNA enthalten. Auch in den Riesenchromosomen liegt die DNA in verknäuelter und verpackter Form vor. Orte mit hoher Transkriptionsaktivität an den Riesenchromosomen sind im Lichtmikroskop erkennbar als *Puffs* oder als *Balbani-Ringe* (☞ 5.23); wir kommen darauf bei der Besprechung der Transkription zurück (s. S. 137).

Genamplifikation. In einigen speziellen Fällen wird noch ein weiteres Prinzip angewandt, um genetisches Material für bestimmte Aufgaben zu vervielfachen. So findet man in den Oozyten mancher Amphibien ribosomale Gene in mehreren tausend Kopien im Zellkern, aber außerhalb der Chromosomen. Sie werden offenbar extrachromosomal repliziert.

Eine Amplifikation wurde auch bei Säugerzellen beobachtet. *In-vitro*-kultivierte Tumorzellen reagierten auf die Zugabe eines Folsäure-Antagonisten (s. S. 117) mit einer Amplifikation des Dihydrofolat-Reduktase-Gens.

Repetitive Sequenzen der Eukaryonten-DNA. Die Struktur-Gene, die bestimmte Aminosäure-Sequenzen codieren, sind normalerweise nur

☞ **5.22 Die Ebenen der Chromatinstruktur.** Die DNA (a) bildet mit Histon-Oktameren die Core-Partikel der Nucleosomen (b) aus, welche durch Linker-DNA miteinander verknüpft werden. H1-Histone vervollständigen Core-Nucleosom und Linker-DNA zum vollständigen Nucleosom und bewirken die Organisation der perschnurartigen Nucleosomenketten zu Strukturen höherer Ordnung (c), die auch als 30-nm-Fasern bezeichnet werden. Hier sind die H1-Histone der einzelnen Nucleosomen zum Inneren der spiralg aufgebauten 30-nm-Faser hin orientiert. Diese Chromatinfasern sind schleifenartig an Proteine der Kernmatrix gebunden (d) und bilden dadurch Chromatindomänen aus. Die DNA solcher Domänen kann nach Entfernung der Histone in Form langer, kontinuierlicher Schleifen, die am Gerüst der Matrixproteine gebunden sind, nachgewiesen werden (im unteren Teil von d schematisch dargestellt). Ein solcher Gerüst-Protein-Komplex wird in Metaphase-Chromosomen gefunden. Während der Interphase sind die Gerüstproteine nicht aggregiert. Im oberen Teil des Bildes ist zu erkennen, dass die Chromatindomänen den regelmäßigen Aufbau der 30-nm-Faser aufweisen oder aufgelockert vorliegen können. (Abb. c modifiziert nach Thoma, Koller, Klug, J. Cell Bio. 1979;83:403. Abb. d modifiziert nach Doenecke, Naturwiss. Rundschau 1983; 36:432.)



☞ **5.23 Riesenchromosom von *Chironomus pallidivittatus*.** Die hier gezeigten Puffs (BR1–BR3) werden auch als Balbani-Ringe bezeichnet (aus: Grossbach U. in: Results and Problems in Cell Differentiation. Vol. 8. Biochemical Differentiation in Insect Glands. Heidelberg: Springer; 1979).



🔍 **5.24 Transkription ribosomaler Gene in Oocyten des Krallenfroschs *Xenopus laevis*.** Man erkennt die fortschreitende Verlängerung der RNA-Moleküle an den rRNA-Genen. Jede der hier gezeigten Transkriptionseinheiten entspricht einem Gen für ein rRNA-Vorläufer-Molekül (s. S. 126). Die Ableserichtung der dicht gedrängten RNA-Polymerasen geht von der jeweiligen Pfeilspitze aus. Zwischen den rRNA-Genen liegen nicht transkribierte Abschnitte (aus: Trendelenburg MF et al. in: Histochemistry and Cell Biology. Heidelberg: Springer; 1996).

🔍 **SINE.** Im menschlichen Genom gibt es über $1 \cdot 10^6$ Abschnitte, die zur Alu-Genfamilie gehören. Diese DNA-Abschnitte haben Sequenzähnlichkeit zur 7SL-RNA der Signal-Erkennungspartikel (s. S. 148) und sind von kurzen Sequenzabschnitten flankiert, die zwischen einzelnen Alu-Elementen verschieden sind. Sie machen circa 10% des humanen Genoms aus und werden auch als SINE (short interspersed nuclear elements) bezeichnet. Zu den SINE- und LINE-Abschnitten s. auch Seite 168.

🔍 **DNA-Fingerabdruck.** Unter den nicht-codierenden Abschnitten des Genoms kommen häufig wiederholte, kurze Sequenzabschnitte vor (sog. Minisatelliten), deren Verteilung und Wiederholungsfrequenz für das jeweilige Genom spezifisch ist. Eine markierte Sonde, die solche Minisatelliten-Abschnitte erkennt, kann im Southern-Blot (s. S. 106) einer DNA nach Spaltung mit einem Restriktionsenzym ein für das jeweilige Individuum spezifisches Muster hybridisierender Banden anzeigen. Die DNA von Nachkommen zeigt ein Hybridisierungsmuster, welches entweder der väterlichen oder mütterlichen Fragmentverteilung entspricht.

in einer einzigen Kopie im haploiden Genom enthalten. Zur Klasse der repetitiven Sequenzen gehören die rRNA-Gene, die in der Nähe des Nucleolus-Organisators lokalisiert sind. Man stellt sich vor, dass die Anhäufung der rRNA-Gene an dieser Stelle dazu dient, bei Bedarf große Mengen der ribosomalen RNA bilden zu können, denn die Transkription kann an vielen Stellen gleichzeitig stattfinden, wie in 🔍 5.24 zu erkennen ist.

Repetitive DNA-Abschnitte waren ursprünglich durch die Untersuchung der Renaturierungskinetik von DNA-Fragmenten definiert worden, die man durch mechanische Scherkräfte erhalten hatte. Mit der Einführung der Restriktionsendonucleasen und der DNA-Sequenzierungsmethoden konnten mehrfach im Genom vorkommende Abschnitte näher charakterisiert werden, die zum Teil in der Nähe von Genen vorkommen. So wurde bei Säugern eine Familie von untereinander sehr ähnlichen Sequenzen beschrieben, die sehr häufig Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym Alu I enthalten. Neben dieser als *Alu I-Familie* bezeichneten Gruppe von DNA-Sequenzen gibt es andere, welche durch bevorzugte Schnitte mit anderen Enzymen gekennzeichnet sind (z.B. die *Kpn I-Familie* des Menschen). Sowohl die Alu-I- als auch die Kpn-I-Elemente gehören zu den eingeschobenen (interspersed) Sequenzen, die nach ihrer Länge als SINE oder LINE (short bzw. long interspersed nuclear elements) bezeichnet werden (s. Randspalte und S. 168).

DNA-Abschnitte mit sehr häufig wiederholten Nucleotid-Folgen unterscheiden sich aufgrund ihrer monotonen Basenfolge oft in ihrer Dichte von der Hauptmenge der DNA und können deshalb durch Dichtegradienten-Zentrifugation abgetrennt werden. Man sieht neben der Hauptbande einige kleine Satelliten-Banden und bezeichnet deshalb diese hochrepetitive DNA auch als *Satelliten-DNA*.

5.7 Pathobiochemie

Störungen im Stoffwechsel der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine, der Nucleotide und der Purin- und Pyrimidinbasen, können wegen der großen biologischen Bedeutung dieser Stoffklasse sehr verschiedene Krankheiten verursachen.

Die häufigste Krankheitsursache sind *Genmutationen* mit der Folge einer veränderten Struktur oder Funktion eines Proteins, z.B. eines Enzyms oder eines Transportproteins. Diese durch Genmutationen verursachten Krankheiten werden in den Kapiteln der entsprechenden Stoffklassen und Stoffwechselwege besprochen.

🔍 5.4 Erkrankungen, die auf Störungen im Stoffwechsel der Nucleinsäuren beruhen.

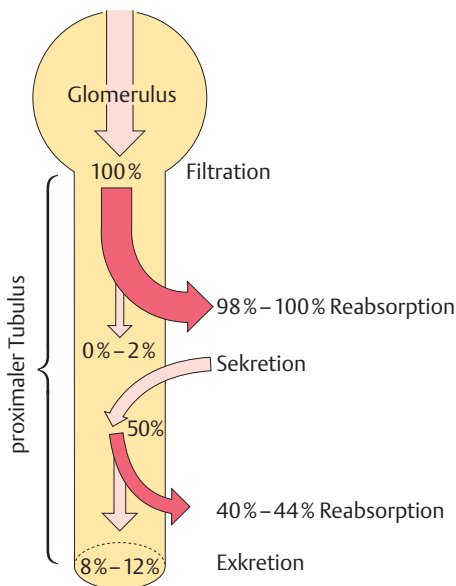
Molekulare Ursache	Erkrankung
Störungen des Purinstoffwechsels mit Hyperurikämie	
gestörte Uratausscheidung (multiple Gendefekte)	klassische Gicht
HGPRT-Mangel	Lesch-Nyhan-Syndrom, Kelley-Seegmiller-Syndrom
PRPP-Hyperaktivität	Kelley-Seegmiller-Syndrom
Störungen des Purinstoffwechsels ohne Hyperurikämie	
APRT-Mangel	2,8-Dihydroxyadenin-Nephrolithiasis
Xanthin-Oxidase-Mangel	Xanthinurie, Xanthin-Nephrolithiasis
ADA-Mangel und PNP-Mangel	Lymphopenie, zellulärer Immundefekt
AMP-Desaminase-Mangel	Myopathie
Störungen des Pyrimidinstoffwechsels	
UMP-Synthetase-Mangel	hereditäre Orotacidurie

Eine zweite Gruppe von Störungen betrifft *Synthese und Abbau der Nucleoside*, sowie Bildung und Ausscheidung des Endprodukts Harnsäure im Stoffwechsel der Nucleinsäuren. Innerhalb dieser Gruppe kann man zwischen Störungen mit dem Leitsymptom einer erhöhten Harnsäurekonzentration im Blut (Hyperurikämie) und solchen, bei denen die Harnsäurekonzentration normal oder vermindert ist, unterscheiden. Eine Übersicht über diese Krankheitsgruppe gibt **5.4**. Neben diesen Störungen des Nucleinsäurenmetabolismus als Krankheitsursache liegt die medizinische Bedeutung dieses Stoffwechsels auch in der *gezielten Veränderung im Stoffwechsel der Nucleinsäuren durch Pharmaka*. Diese Pharmaka werden besonders bei der Chemotherapie von Tumoren eingesetzt.

Störungen des Purinstoffwechsels mit Hyperurikämie

Gicht. Die „klassische“ Gicht, die beim Erwachsenen, vorzugsweise bei Männern, auftritt, ist die häufigste Störung des Purinstoffwechsels mit Hyperurikämie. Man unterscheidet eine primäre und sekundäre Gicht. Die primäre Gicht tritt ohne Vorkrankheiten auf; ihre Ursache ist eine Störung der Uratausscheidung durch die Niere und nicht, wie früher für die klassische Gicht des Erwachsenen angenommen, eine gesteigerte *de-novo*-Purinsynthese. Die sekundäre Gicht ist Folge anderer Krankheiten, z. B. einer Niereninsuffizienz mit verminderter renaler Uratausscheidung oder von Krankheiten mit gesteigertem Zellumsatz und gesteigerter Purinproduktion, z. B. Tumoren und Leukämien.

Beim Gesunden wird in der Niere das im Glomerulus abfiltrierte Urat im proximalen Tubulus nahezu vollständig rückresorbiert, jedoch in weiter distal gelegenen Abschnitten des proximalen Tubulus erneut sezerniert und wieder rückresorbiert (**5.25**). In der Bilanz werden 90 bis 93 % des glomerulär filtrierten Urats bei der Passage durch den Tubulus resorbiert. Die Urat-Clearance beim Gesunden ist dementsprechend sehr klein. Beim Kranken mit primärer Gicht ist die Uratausscheidung im Urin in Beziehung zum Uratspiegel vermindert und die Urat-Clearance ist stark eingeschränkt: Bei gleicher Uratkonzentration im Plasma scheiden Gicht-Patienten ca. 40 % weniger



5.25 Bidirektionaler Transport von Urat im proximalen Tubulus der Niere. Bei Gicht ist die Ausscheidung von Urat, wahrscheinlich durch verminderte Sekretion, eingeschränkt.

Die **renale Clearance** einer Substanz X ist definiert als das Blutplasmavolumen (ml), das pro Zeiteinheit (min) durch die Niere von X befreit („geklärt“) wird. Sie wird berechnet nach der Formel

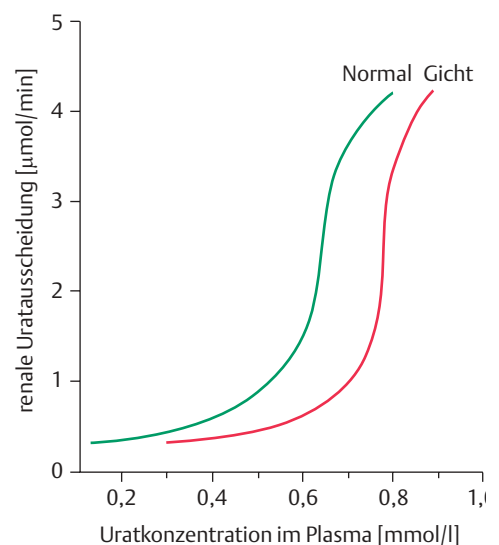
$$C_X = \frac{V_U \cdot U_X}{P_X}$$

C_X = Clearance der Substanz X ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

V_U = Urinvolumen ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

U_X = Konzentration von X im Urin ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

P_X = Konzentration von X im Blutplasma ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)



5.26 Beziehung zwischen Uratkonzentration im Blutplasma und Uratausscheidung im Urin bei Gesunden und Gichtkranken.

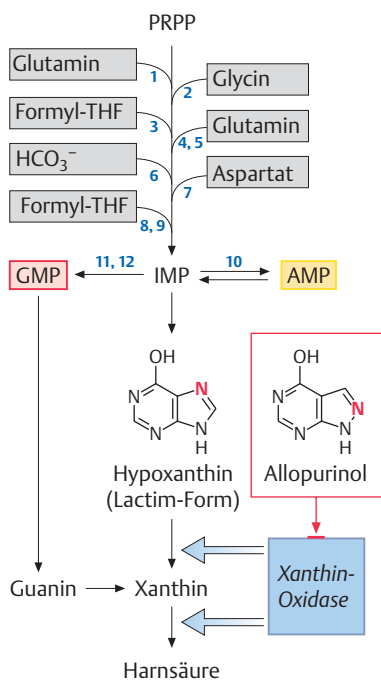


☞5.27 Gichttophus bei chronischer Gicht.

Urat aus als Gesunde; die Plasmakonzentration bei Gicht-Kranken muss ca. 2 mg/dl höher sein als bei Gesunden, um die gleiche renale Uratausscheidung zu erreichen (☞5.26). Die Art des renalen Defektes ist ungeklärt. Er kann in einer gesteigerten Resorption, einer verminderten Sekretion oder einer Kombination von beiden Transportveränderungen begründet sein. Sowohl Resorption als auch Sekretion sind aktive, energieabhängige Transportvorgänge. Die meisten, derzeit bekannten Fakten sprechen eher für eine verminderte Sekretion als für eine gesteigerte Absorption als Ursache der Gicht. Der Defekt in der Niere ist die Folge multipler Genmutationen, wobei einige autosomal dominant, andere X-chromosomal vererbt werden.

Das Krankheitsbild der klassischen Gicht kann sich als akuter Gichtanfall oder als chronische Gicht manifestieren. Beim akuten Anfall führt die Ablagerung von Uratkristallen in einem Gelenk (Knorpel) und den umgebenden Weichteilen (Gelenkkapsel, Sehnen) zu sehr heftigen Schmerzen und Entzündungsreaktionen, da Granulocyten einwandern, Uratkristalle phagozytieren und als Reaktion hierauf proinflammatorische Eikosanoide und Cytokine freisetzen. Bei der chronischen Gicht steht die Zerstörung des Gelenkknorpels durch Uratablagerungen im Vordergrund. Degenerative Gelenkveränderungen mit Bewegungseinschränkungen und Schmerzen sind die Folge. In gelenknahen Weichteilen und im Knorpel, z. B. an der Ohrmuschel, sind die Uratablagerungen als gelbliche Knoten (Gichttophi) sichtbar (☞5.27). In der Niere können sich bei chronischer Gicht Uratsteine bilden. Uratablagerungen im Nierenparenchym führen zu Funktionseinschränkungen der Niere, die in eine Niereninsuffizienz münden können.

Zur Therapie des akuten Gichtanfalls wird seit der Antike Colchicin erfolgreich eingesetzt. Das Alkaloid hemmt wahrscheinlich über das mikrotubuläre System die Einwanderung der Granulocyten und dadurch die Schmerzattacken. Bei der Therapie der chronischen Gicht hat sich Allopurinol sehr bewährt. Dieses Struktur analog von Hypoxanthin ist ein Hemmstoff der Xanthin-Oxidase (☞5.28). Anstelle von Harnsäure werden Xanthin und Hypoxanthin ausgeschieden, die im Vergleich zu Harnsäure besser wasserlöslich sind, so dass sich keine Mikrokristalle im Gewebe, keine Gichttophi und keine Nierensteine bilden. Ferner werden bei der chronischen Gicht Pharmaka eingesetzt, die die Uratausscheidung durch die Niere steigern.

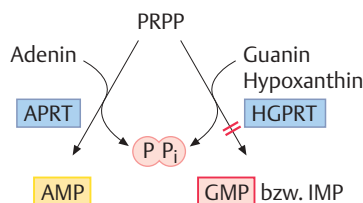


Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mangel (HGPRT-Mangel).

Die durch dieses Enzym katalysierte Reaktion ist in ☞5.7 (S. 102) dargestellt. Sie dient der Wiederverwendung der Purinbasen Hypoxanthin und Guanin unter Bildung von Inosin- bzw. Guanosinmonophosphat (Salvage-Pathway, S. 102). Bei verminderter Enzymaktivität (☞5.29) werden die Purinbasen, die nicht wieder zur Resynthese von Nucleinsäuren verwendet werden können, zu Harnsäure abgebaut, deren Plasmakonzentration ansteigt. Da bei HGPRT-Mangel auch Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) vermindert verbraucht wird, steht es für die Neusynthese von Nucleinsäuren vermehrt zur Verfügung; darüber hinaus aktiviert PRPP die Glutamin-PRPP-Amidotransferase, das Schrittmacherezym der Purinsynthese (S. 100).

Das für die HGPRT codierende Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Mehr als 100 verschiedene Mutationen sind bekannt, die unterschiedliche Reduktionen der Enzymaktivität zur Folge haben. Bei vollständigem Ausfall entsteht das *Lesch-Nyhan-Syndrom*, bei dem die Symptome einer chronischen Gicht mit neurologischen Symptomen (gestörte Motorik durch Spastik, Choreoathetose) und mit einer Tendenz zur Selbstverstümmelung kombiniert sind. Der Zusammenhang der neurologischen Symptome mit dem Enzymdefekt ist ungeklärt. Wenn eine Restaktivität des Enzyms von mindestens 10 % erhalten ist, resultiert das *Kelley-Seegmiller-Syndrom* mit einer schon

☞5.28 Synthese und Abbau von Purin-Nucleotiden (Details in ☞5.5 u. ☞5.6, S. 101). Die Nummern entsprechen denen in ☞5.5.



☞5.29 Störung der HGPRT beim Lesch-Nyhan-Syndrom (HGPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, vgl. S. 102).

beim Jugendlichen auftretenden Hyperurikämie und Gicht, jedoch ohne die neurologischen Ausfälle des Lesch-Nyhan-Syndroms.

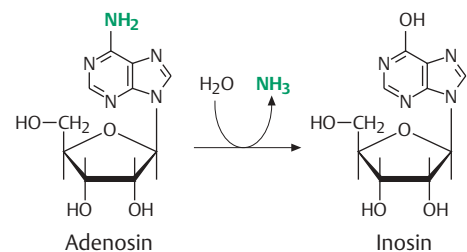
Gesteigerte Aktivität der Phosphoribosylpyrophosphat(PRPP)-Synthetase. Von diesem seltenen Enzymdefekt mit der Folge einer Purinüberproduktion, Hyperurikämie und Gicht sind vier Varianten bekannt: 1. ein katalytischer Defekt mit Erhöhung von V_{\max} des Enzyms, 2. ein regulatorischer Defekt mit vermindertem Ansprechen auf Inhibitoren oder mit einer erhöhten Affinität zu anorganischem Phosphat, 3. die Kombination von 1 und 2, und 4. eine erhöhte Affinität zum Substrat Ribose-5-phosphat. Durch die gesteigerte Bildung von PRPP wird die Glutamin-PRPP-Amidotransferase (S. 102) aktiviert, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Purinsynthese. Der Erbgang des Defektes ist X-chromosomal. Die Symptomatik entspricht dem Kelley-Seegmiller-Syndrom (s. o.).

Störungen des Purinstoffwechsels ohne Hyperurikämie

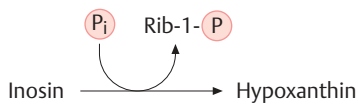
Adenin-Phosphoribosyl-Transferase-Mangel: Nephrolithiasis durch 2,8-Dihydroxyadenin-Steine. Bei Fehlen des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRTase), das die Bildung von Adenosinmonophosphat aus Adenin katalysiert (s. S. 102), wird vermehrt anfallendes Adenin durch die Xanthin-Oxidase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert. Diese schwer wasserlösliche Substanz bildet Nierensteine. Die Folgen sind Nierenkoliken und Infektionen der ableitenden Harnwege, häufig mit Ausmündung in Niereninsuffizienz. Auch bei diesem Defekt ist Allopurinol therapeutisch wirksam.

Xanthin-Oxidase-Mangel: Xanthinurie und Xanthinlithiasis. Die Xanthin-Oxidase katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure (☞ 5.6, S. 102). Die Enzymopathie wird autosomal rezessiv vererbt. Bei den Homozygoten mit Xanthin-Oxidase-Mangel ist die Harnsäurekonzentration im Blut erniedrigt, die renale Ausscheidung von Xanthin und Hypoxanthin erhöht. Beide Metaboliten im Abbauweg der Purine sind besser wasserlöslich als das Endprodukt Harnsäure. Bei hohen Konzentrationen im Urin können sich jedoch Xanthinsteine in den ableitenden Harnwegen entwickeln. In einigen Fällen mit schwerer Xanthinurie wurde auch eine Myopathie beobachtet.

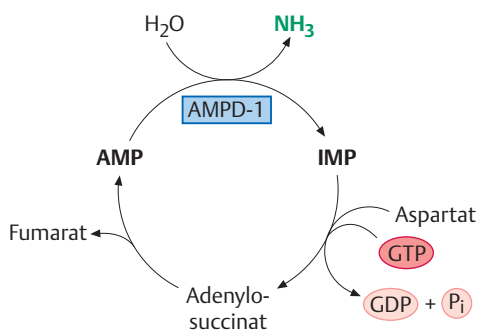
Adenosin-Desaminase-Mangel und Purinnucleosid-Phosphorylase-Mangel: Angeborene Immundefekte. Die Adenosin-Desaminase (ADA) kommt in allen Geweben vor. Die höchsten Konzentrationen findet man im lymphatischen Gewebe, besonders im Thymus. Das Enzym katalysiert die Desaminierung von Adenosin zu Inosin und von Desoxyadenosin zu Desoxyinosin (☞ 5.30). Der durch eine Genmutation verursachte Mangel an ADA führt zu einer Hemmung der Proliferation von B- und T-Lymphocyten und zur Lymphopenie. Die Folge ist eine Störung der zellulären Immunreaktion. Der Zusammenhang zwischen dem Enzymdefekt und seinen klinischen Folgen ist nicht eindeutig geklärt. Man nimmt an, dass aus dem Enzymdefekt eine verstärkte Resynthese von dAMP (durch Nucleosid-Kinase) und schließlich von dATP resultiert. dATP ist ein Hemmstoff der Ribonucleotid-Reduktase (S. 100), so dass eine Störung der DNA-Synthese und der DNA-Replikation verursacht wird. Lymphocyten, deren Funktion an eine hohe Proliferationsrate gebunden ist, könnten von einer solchen Störung besonders betroffen sein. Andere Erklärungen gehen davon aus, dass durch vermehrt gebildetes Desoxyadenosin die Bildung von S-Adenosyl-methionin gehemmt und damit seine Funktion als Methylgruppen-Donor in vielen biologischen Reaktionen beeinträchtigt wird. Ferner wird eine Hemmung der Pyrimidinsynthese durch Adenosylnucleotide diskutiert. Bei dieser Krankheit



☞ 5.30 Adenosin-Desaminase-Reaktion (gilt analog auch für 2'-Desoxyadenosin).



☞ **5.31 Purin-Nucleosid-Phosphorylase-Reaktion** am Beispiel des Inosins (gilt analog auch für Guanosin und die entsprechenden Desoxynucleoside).



☞ **5.32 Purinnucleotid-Zyklus.** Formeln s. ☞ 5.5.

wurde erstmals 1990 eine *Gentherapie* durch Übertragung der cDNA für das Enzym ADA durchgeführt.

Der durch eine Genmutation verursachte Mangel an Purinnucleosid-Phosphorylase (PNP) ist sehr viel seltener als der ADA-Mangel. Das Enzym katalysiert die Desphosphorylierung der Nucleoside mit Bildung der Basen Hypoxanthin und Guanin (☞ 5.31). Seine Funktionseinschränkung führt zu einer Senkung der Harnsäuresynthese und zu einer gesteigerten Wiederverwertung der Nucleoside. Die klinische Symptomatik ist die gleiche wie bei ADA-Mangel. Da als Folge des Defektes eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von dGTP gefunden wurde, wird als Erklärung für den Zusammenhang zwischen Enzymdefekt und Replikationshemmung der Lymphocyten eine verminderte Aktivität der Ribonucleotid-Reduktase, verursacht durch dGTP, angenommen.

AMP-Desaminase-Mangel: Myopathie. Adenosinmonophosphat-Desaminase-1 (AMP-Desaminase-1, AMPD-1) katalysiert die Desaminierung von AMP zu IMP und kommt in hoher Konzentration im Skelettmuskel vor. Das Enzym wird daher auch als Myoadenylat-Desaminase bezeichnet. Seine Funktion besteht darin, aus AMP Ammoniak freizusetzen (s. S. 102, 115). Das dabei resultierende IMP kann mithilfe von Aspartat wieder in AMP zurückverwandelt werden (Purinnucleotid-Zyklus, ☞ 5.32). Bei jedem Durchlauf durch diesen Zyklus wird je ein Molekül Aspartat und GTP verbraucht und GDP, Fumarat und NH₃ freigesetzt. Durch das Fehlen der AMP-Desaminase-Aktivität wird AMP nicht aus dem Gleichgewicht der Adenylat-Kinase-Reaktion (S. 712) entfernt, so dass diese Möglichkeit der ATP-Regeneration im Muskel gestört ist. Andere Theorien gehen von einer stimulatorischen Wirkung von NH₃ auf die Glykolyse im Muskel und einer Stimulierung des Glykogenabbaus durch IMP aus. Außerdem können durch den Purinnucleotid-Zyklus im Muskel aus Aspartat Fumarat und Malat gewonnen und in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden. Der Energiemangel bei Ausfall der AMPD-1 könnte also auch auf dem Fehlen dieser Metabolite beruhen.

Als Folge des Enzymdefektes mit Blockierung des Purinnucleotid-Zyklus kann die Skelettmuskulatur ihre Energieproduktion nicht an den erhöhten Bedarf bei Muskularbeit anpassen. Bereits nach geringer Belastung kommt es zur Ermüdung der Muskulatur, bei fortgesetzter Belastung treten Schmerzen und Krämpfe auf. Bei vielen Homozygoten bleibt jedoch der Enzymdefekt klinisch latent.

Störungen des Pyrimidinstoffwechsels

UMP-Synthetase-Defekt: Hereditäre Orotacidurie. Das Enzym UMP-Synthetase bewirkt die Umwandlung von Orotat zu Uridin-5'-Monophosphat (s. ☞ 5.3, S. 99). Es handelt sich um ein bifunktionelles Enzym, in dem die Aktivität einer Orotat-Phosphoribosyltransferase (Reaktion 5 in ☞ 5.3) und einer Oritidin-5'-monophosphat-Decarboxylase (Reaktion 6) vereinigt sind. Als Folge des seltenen Enzymdefektes treten bei den Neugeborenen und Kindern Wachstums- und Entwicklungsstörungen auf. Auch entwickelt sich eine hypochrome Anämie. Abzugrenzen ist die Orotacidurie, die bei einer Störung des Harnstoffzyklus durch eingeschränkte Funktion der Ornithin-Transcarbamoylase auftritt, indem intramitochondrial akkumuliertes Carbamoylphosphat ins Cytoplasma gelangt und zur Pyrimidinsynthese genutzt wird.

Pharmaka mit Wirkung auf Struktur und Funktion der Nucleinsäuren (Cytostatika). Sie spielen bei der Chemotherapie von Tumoren eine wichtige Rolle, da sie die Replikation der DNA oder die Bildung der RNA und damit die Vermehrung der Tumorzellen hemmen. Ihr Nachteil ist, dass auch andere rasch proliferierende Gewebe, z. B. die Zellen in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes

☛ 5.5 Cytostatika mit Wirkung auf Struktur und Funktion der Nucleinsäuren.

Alkylierende Substanzen	Cyclophosphamid, Cisplatin
Antimetaboliten	Fosäuremetabolit Methotrexat Purinanalog Mercaptopurin Pyrimidinanalog 5-Fluorouracil
Alkaloide	Dactinomycin Daunomycin Bleomycin
Antibiotika	Podophyllotoxine
Hydroxyharnstoff	

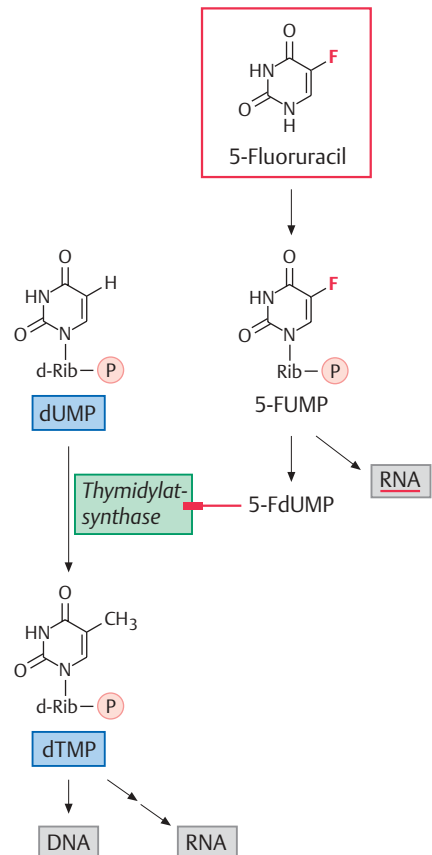
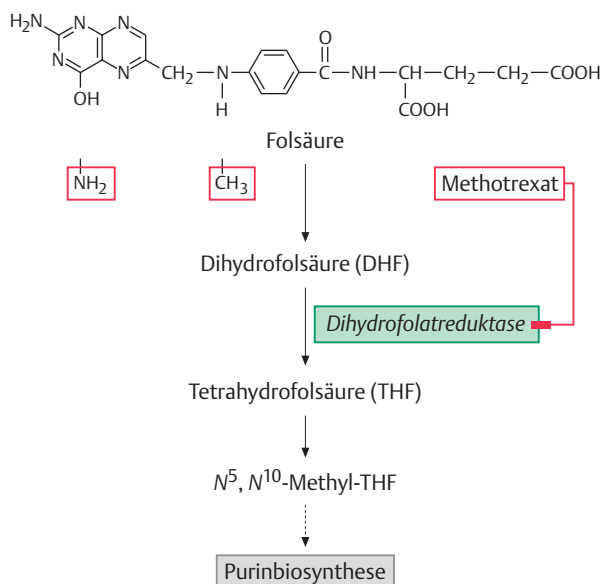
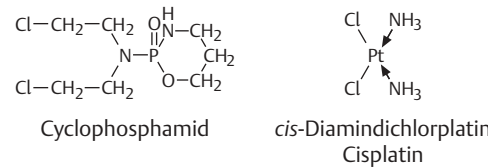
und die Zellen der Haarwurzel, von dieser Wirkung betroffen sind. Ein weiteres Problem ist die Entwicklung einer Resistenz der Tumorzellen gegen bestimmte Cytostatika. Nach dem Wirkungsmechanismus können Cytostatika in folgende Gruppen eingeteilt werden (T 5.5):

Alkylierende und analog wirkende Substanzen. Es handelt sich um Substanzen, die mit verschiedenen Zellbestandteilen, besonders Nucleinsäuren und Proteinen, eine stabile Verbindung eingehen können. So bewirken z. B. *Cyclophosphamid* und *Cisplatin* Verknüpfungen zwischen benachbarten DNA-Strängen, zwischen DNA und Proteinen und vor allem zwischen Guaninresten innerhalb eines DNA-Strangs. Durch die auf diesem Weg entstehenden Cross-Links wird die DNA-Replikation gehemmt. Alkylierende Substanzen sind vor allem in der S-Phase des Zellzyklus wirksam.

Antimetaboliten sind Derivate physiologischer Substrate und Cosubstrate der Purin- und Pyrimidinsynthese, die zu Enzymen dieser Synthesewege eine sehr viel höhere Affinität besitzen als die physiologischen Substrate. Sie hemmen dadurch die Nucleinsäuresynthese und sind deshalb vor allem in der S-Phase des Zellzyklus wirksam.

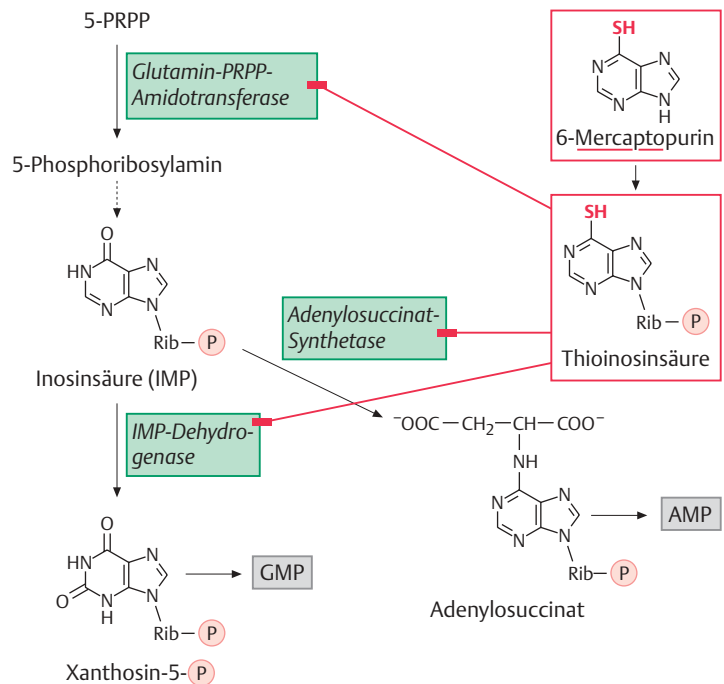
Beispiel für ein *Folsäurederivat* als Antimetabolit ist *Methotrexat*, das zur Dihydrofolat-Reduktase eine 10^5 -fach höhere Affinität besitzt als das normale Substrat Dihydrofolsäure (5.33). Es resultiert eine verminderte Bildung von Tetrahydrofolsäure, die für die Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen erforderlich ist (S. 99 und 101, 5.3 und 5.5).

Ein *Pyrimidinanalog*, das häufig als Antimetabolit eingesetzt wird, ist *5-Fluoruracil*. Es wird intrazellulär durch Umwandlung in 5-FdUMP aktiviert und hemmt in dieser Form die Thymidylat-Synthase (5.34, vgl. Reaktion 8 in 5.3). Seine Affinität zum Enzym ist 250–4000-fach höher als die des normalen Substrates dUMP. 5-FUMP wird ferner in die RNA eingebaut. Deshalb wird sowohl die DNA- als auch die RNA-Synthase durch 5-Fluoruracil gehemmt.



5.33 Im **Folsäureantagonist Methotrexat** ist die OH-Gruppe durch NH_2 , H durch CH_3 substituiert. Der Antagonist hemmt die Dihydrofolat-Reduktase, die sowohl für die Purin- und Pyrimidinsynthese essenziell ist.

5.34 Das **Pyrimidinanalog 5-Fluoruracil** wird als „falsches“ Nucleotid 5-FUMP in die RNA eingebaut, als 5-FDesoxy-Ump hemmt es die Thymidylat-Synthase.



☞ **5.35 Das Purinderivat 6-Mercaptopurin** hemmt als Nucleotid Enzyme der Purinsynthese.

Als *Purinanalogue* wird *Mercaptopurin*, ein Purin mit SH-Gruppe eingesetzt (☞ 5.35). Es wird in der Zelle in Thioinosinsäure umgewandelt, die u. a. als Hemmstoff der Glutamin-5-PRPP-Amidotransferase wirkt, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der *de-novo*-Purinsynthese katalysiert (vgl. ☞ 5.5, Reaktion 1).

Alkaloide. Podophyllotoxin ist aus Flussblattgewächsen extrahierbar und wird in Form der halbsynthetischen Glykosidderivate *Etoposid* und *Teniposid* therapeutisch angewandt. Sie wirken gezielt auf die Topoisomerase II und bewirken DNA-Strangbrüche.

Antibiotika. Aufgrund ihrer cytostatischen Wirkung werden einige Antibiotika bei der Tumorthherapie eingesetzt. *Dactinomycin* aus der Gruppe der Actinomycine (Formel s. Seite 42) wird zwischen Guanin-Cytosin Basenpaare in die DNA eingelagert. Dadurch kann die RNA-Polymerase nicht wirksam werden. *Daunomycin* aus der Gruppe der Anthracycline wird durch das Cytochrom P450-Monooxygenase-System (S. 191) zum Semichinonradikal reduziert, das Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA verursachen kann. *Bleomycin*, ein basisches Glykoprotein, bildet mit Fe^{2+} und Cu^{2+} Chelate. Die Protein-Metall-Komplexe werden durch eine Cytochrom P450-Reduktase aktiviert, wobei eine mischfunktionelle Oxidase mit Bildung von Sauerstoffradikalen entsteht.

Hydroxyharnstoff. Diese Substanz ist in keine der genannten Gruppen einzuordnen. Die cytostatische Wirkung beruht auf einer Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase (S. 100). Es resultiert eine Hemmung der DNA-Synthese. Die Substanz bewirkt eine Arretierung des Zellzyklus beim Übergang von der G1 in die S-Phase (s. S. 376). Sie wird deshalb zur Synchronisierung von Zellen verwendet.

