

# 8 Struktur und Funktion des Interphasekerns und der Interphasechromosomen

## ÜBERSICHT

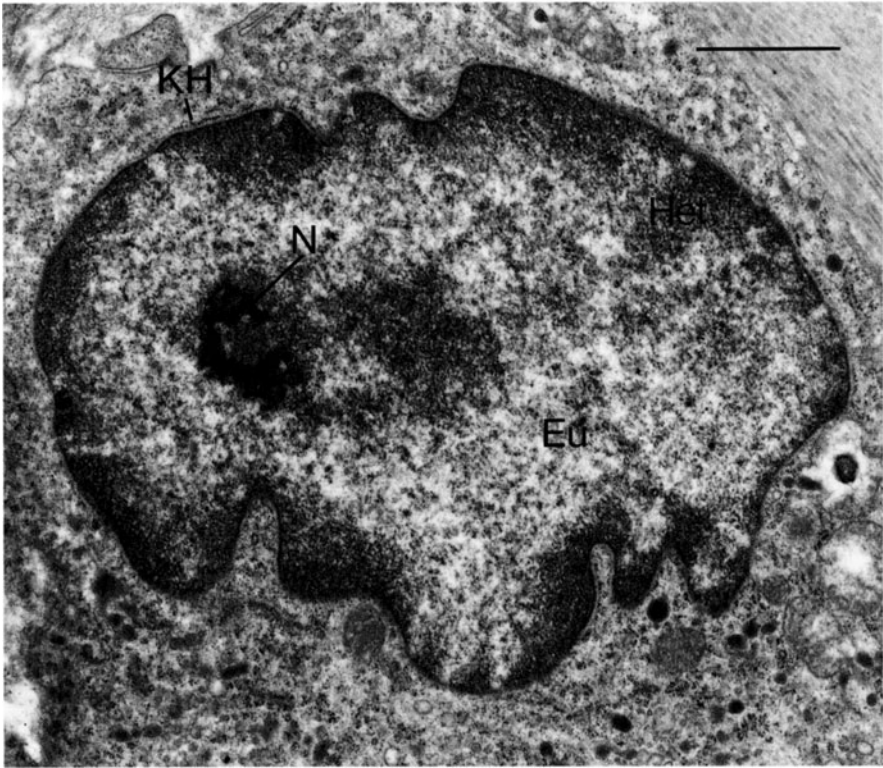
In der Interphase sind die Chromosomen in einem Zellkern vereinigt, der von einer Kernhülle umschlossen wird. Wir unterscheiden die Eukaryonten u. a. nach diesem Merkmal von den Prokaryonten. Der Einschluß der DNA in ein eigenes Kompartiment war ein bedeutendes Ereignis in der Evolution. Der Gewinn für die Zelle läßt sich mit der besseren Möglichkeit zur Organisation größerer DNA-Mengen und mit der höheren Leistungsfähigkeit spezialisierter Zellkompartimente erklären.

Die Kernhülle muß nach jeder Mitose neu gebildet werden. Sie grenzt das Chromatin vom Plasma ab und reguliert den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten (Kap. 8.1). Im Interphasekern entfaltet die DNA der Chromosomen ihre wichtigsten Funktionen: Replikation und Transkription. Die Chromosomen sind allerdings gewöhnlich nicht individuell erkennbar. Man muß ihre Lage durch molekulare Sonden oder indirekt aus der Anordnung in der Mitose erschließen (Kap. 8.2). Die Aktivitäten sind daher nur in Ausnahmefällen, wie etwa bei den Nukleolen (Kap. 8.3) oder den Polytänchromosomen (s. Kap. 11.5), einzelnen Chromosomen direkt zuzuordnen. Die Replikation der DNA und die Neubildung der Schwesterchromatiden (Kap. 8.4) dient bereits der Vorbereitung der nächsten Mitose.

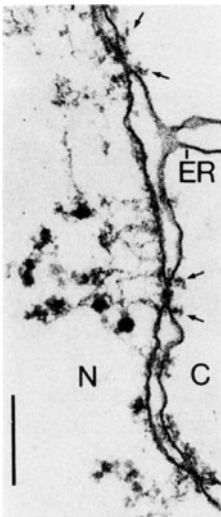
## 8.1 Die Struktur des Interphasekerns

### *Kernhülle*

Im Elektronenmikroskop erkennt man die Kernhülle, die zwei Reaktionsräume voneinander trennt (Abb. 8.1). Sie grenzt das **Karyoplasma** (auch **Nukleoplasma** genannt) mit den Chromosomen vom **Cytoplasma** ab und besteht aus der **äußeren Kernmembran**, der **inneren Kernmembran** und der **Lamina**, einer dünnen Schicht, die der Innenseite der inneren Kernmembran anliegt und die Verbindung zum Chromatin herstellt. Die Kernhülle besitzt **Kernporen**, die dem Materialaustausch zwischen Karyoplasma und Cytoplasma dienen. Äußere und innere Membran gehen an den Kernporen ineinander über (Abb. 8.2). Das Lumen zwischen beiden Membranen, der **perinukleäre Raum**,



**Abb. 8.1.** Interphasekern aus dem Bindegewebe der menschlichen Trachea. Eu: Euchromatin, Het: Heterochromatin, KH: Kernhülle, N: Nukleolus. Ultradünnschnitt, EM-Aufnahme, Maßstab 1  $\mu\text{m}$ . (U. Schramm, Lübeck)



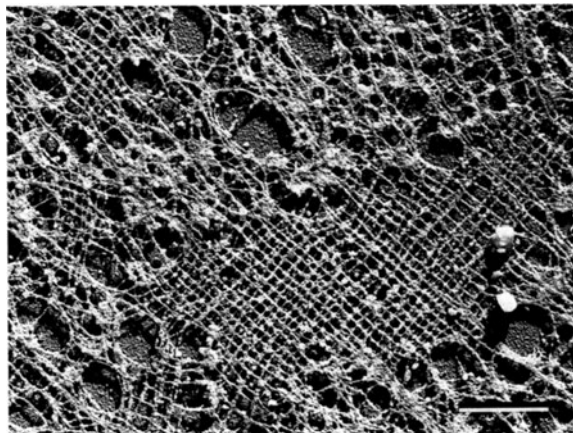
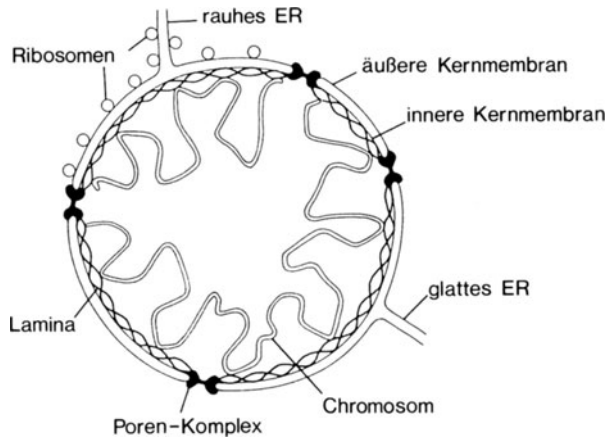
**Abb. 8.2.** Querschnitt durch die isolierte Kernmembran einer Oocyte des Salamanders *Pleurodeles waltli*. Die innere Kernmembran (auf der Kernseite: N) und die äußere Kernmembran (auf der Cytoplasmaseite: C) sind an den Kernporen miteinander verbunden. Pfeile weisen auf Ringkomponenten des Porenkomplexes. Die äußere Kernmembran geht in das endoplasmatische Retikulum (ER) über. Maßstab: 0,2  $\mu\text{m}$ . (Franke et al. 1981)

hat Kontinuität mit den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Die äußere Membran kann sogar mit Ribosomen besetzt sein.

Der inneren Kernmembran liegt die Lamina an (Abb. 8.3). In manchen Zellen ist sie als eine 30–100 nm dicke Schicht zwischen Chromatin und Kernmembran in Ultradünnschnitten im Elektronenmikroskop sichtbar. In vielen Zelltypen ist sie aber dünner und kann dann nur immunologisch nachgewiesen werden.

Die Lamina besteht ganz oder überwiegend aus 1–4 verschiedenen Proteinen, den **Laminen**, mit relativen Molmassen zwischen 60 000 und 75 000. Sie haben Sequenzverwandtschaft mit den cytoplasmatischen intermediären Filamenten. In der Tat besteht die Lamina aus einem Maschenwerk intermediärer Filamente (Abb. 8.4). Von den drei immunologisch verwandten Laminen A, B und C, die in Leberzellkernen und kultivierten Säugetierzellen vorkommen, hat Lamin B die größte Affinität zur Kernmembran, stellt daher vermutlich *in vivo* den Kontakt zur Kernmembran her.

**Abb. 8.3.** Schematische Darstellung der Kernhülle. Sie besteht aus der inneren und der äußeren Kernmembran und der Lamina. Innere und äußere Kernmembran sind an den Porenkomplexen miteinander verbunden. Die äußere Kernmembran hat Kontinuität mit dem rauhen und dem glatten endoplasmatischen Retikulum. Die Chromosomen haben Kontakt mit der Lamina. (Nach Gerace 1986)



**Abb. 8.4.** Die Kernlamina in der Aufsicht. Isolierte Lamina einer *Xenopus*oocyte wurde mit Metalldampf schrägschattet. An gut erhaltenen Stellen erkennt man ein Maschenwerk von etwa rechtwinklig sich kreuzenden 10 nm-Filamenten. EM-Aufnahme, Maßstab 0,5 µm. (Aus Aebi et al. 1986)

Kerne, die mit 2 M NaCl und dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 behandelt werden, verlieren neben Histonen und vielen Nicht-Histonproteinen ihre Kernmembran. Die Lamina bleibt bei dieser Behandlung stabil. Auch wenn dazu noch die DNA durch DNase-Behandlung extrahiert wird, behält die Lamina oft die Form und Größe des ursprünglichen Kerns. Das läßt vermuten, daß die Stabilisierung der Kernhülle und der Kernform eine biologische Funktion der Lamina ist. Eine weitere Funktion der Lamina ist wahrscheinlich eine mechanische Verbindung der Chromosomen mit der Kernhülle. Die Lamina hat nämlich sowohl Kontakt zur Kernmembran als auch – vermutlich über ein weiteres Protein, Perichromin – zum Chromatin. Dieser Funktion kommt eine entscheidende Rolle beim Wiederaufbau der Kernhülle nach der Mitose zu.

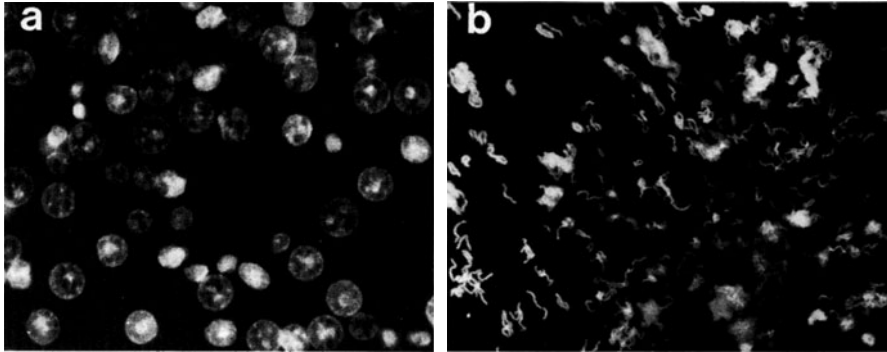
### ***Auflösung und Neubildung der Kernhülle***

Bei den höheren Eukaryonten wird die Kernhülle während der Mitose abgebaut. Die Mitose ist offen – im Gegensatz zur geschlossenen Mitose vieler niederer Eukaryonten. Die Kernmembran zerfällt dabei in Vesikel, Lamin B bleibt mit den Vesikeln assoziiert, die Laminaproteine A und C dissoziieren und verteilen sich im Plasma, während die Chromosomen kondensieren. In der Telophase werden diese Vorgänge umgekehrt; die Kernhülle wird wieder hergestellt.

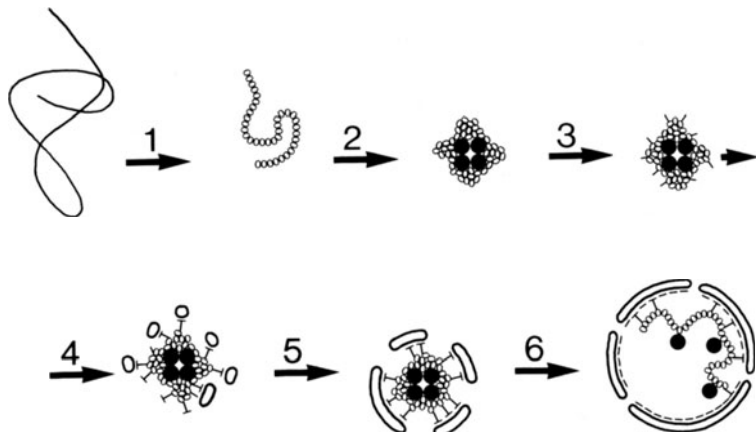
Abbau der Kernmembran, Dissoziation der Lamine und Kondensation der Chromosomen werden bei Wirbeltieren durch den „maturation promoting factor“ (MPF) ausgelöst. Diese Vorgänge können auch *in vitro* in einem zellfreien System durch MPF induziert werden (Abb. 8.5). Dissoziation und Polymerisation der Lamine gehen mit einer Veränderung im Grad der Phosphorylierung einher. Während der Mitose sind Lamine 4–7mal so hoch phosphoryliert wie während der Interphase.

Der Wiederaufbau der Kernhülle geschieht um das Chromatin herum. Liegen die Chromosomen in der Telophase weit auseinander, so umgeben sich Gruppen von ihnen oder sogar einzelne Chromosomen mit einer eigenen Hülle. Bei vielen Tiergruppen geschieht das ganz regelmäßig während der ersten Furchungsteilungen. Die so entstandenen Teilkerns werden **Karyomere** genannt. Eine ähnliche Erscheinung tritt als cytologischer Unfall z. B. nach Bestrahlung auf: einzelne Chromosomen oder Chromosomenarme liegen weit ab von der Hauptmasse der Chromosomen und bilden dann eigene Kerne, sog. **Mikronuklei**. Diese Eigenschaft wird für einen Mutagenitätstest ausgenutzt, den Mikronukleustest, bei dem nach einer Behandlung mit einem Mutagen der Anteil der mikronukleushaltigen Zellen ausgezählt wird.

Die Zelle bildet eine Kernhülle auch um artfremdes Chromatin. Injiziert man nackte DNA des Bakteriophagen Lambda in *Xenopus*oocyten, so wird die DNA zu Chromatin kondensiert und mit einer vollständigen Kernhülle aus Lamina und Membranen umgeben. Man kann daraus schließen, daß die Wiederausbildung der Kernmembran gegen Ende der Mitose ein Vorgang ist, an dem die chromosomale DNA völlig passiv beteiligt ist. Das Cytoplasma der



**Abb. 8.5 a, b.** Zerfall der Kernhülle und Chromosomenkondensation in einem zellfreien System, ausgelöst durch MPF. Isolierte Rattenleberkerne wurden dazu in einem mitotischen Extrakt aus *Xenopus*eiern mit einem ATP-regenerierenden System aus ATP, Kreatinphosphat und Kreatinkinase inkubiert. **a** Intakte Zellkerne zu Beginn der Inkubation. **b** 3 h nach Beginn ist die Kernhülle aufgelöst, und die Chromosomen sind in unterschiedlichem Maße kondensiert. Da Kerne der G<sub>0</sub>-Phase verwendet wurden, bestehen die Chromosomen nur aus einer Chromatide. Fluoreszenzaufnahmen nach Färbung mit Bisbenzimid. (Newport u. Spann 1987)



**Abb. 8.6.** Kernbildung um nackte DNA in einem *Xenopus*oocytensextrakt. Das Modell faßt beobachtete und postulierte Schritte zusammen. Schritt 1: Verpackung in Nucleosomen. Schritt 2: Chromatinkondensation, auch die Bindung von Scaffoldproteinen und die Bildung der Schleifendomänen könnte in diesem Schritt stattfinden. Schritt 3: Das Chromatin erlangt die Fähigkeit, Lamine zu binden. Schritt 4: Lamine und Membranvesikel binden. Schritt 5: Die Membranvesikel verschmelzen zur Doppelmembranhülle. Schritt 6: Wachstum des Kerns mit Dekondensation des Chromatins. (Nach Newport 1987)

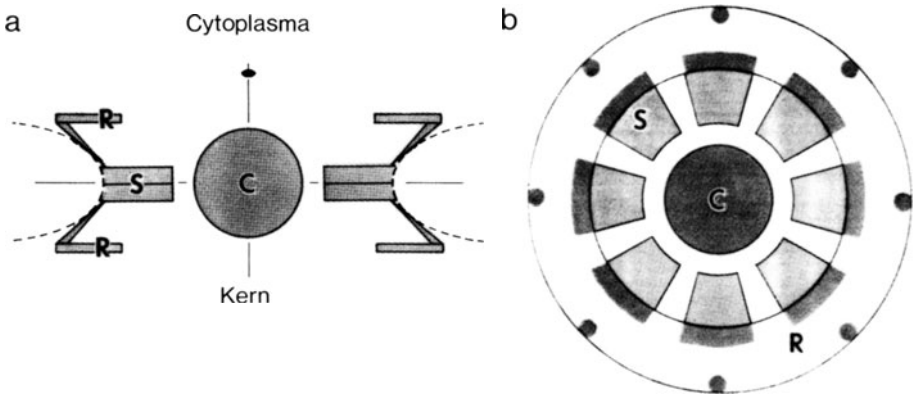
*Xenopus*oocyten hat – abgesehen von der DNA – einen so reichen Vorrat an den erforderlichen Komponenten des Kerns gespeichert, daß zu diesem Experiment nicht einmal intakte Zellen notwendig sind. Die Kernbildung um nackte DNA läuft auch in zellfreien Systemen ab, die aus Extrakten von Oocyten gewonnen werden (Abb. 8.6).

### Kernporen

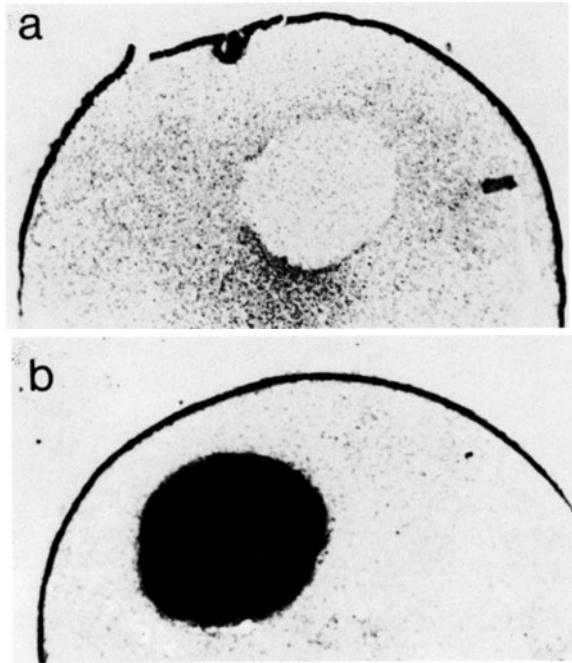
Der Stoffaustausch zwischen Kern und Cytoplasma muß den Weg über die Kernporen nehmen. Sie sind die Durchlässe durch die doppelte Kernmembran. Auch die Lamina ist bei den Poren unterbrochen. Der Stoffaustausch wird dadurch erleichtert, daß das wandständige, hochkondensierte Heterochromatin an diesen Stellen Durchgänge geringerer Dichte freiläßt (s. Abb. 8.1).

Kernporen sind nicht einfach Löcher in der Kernhülle, an deren Rändern innere und äußere Kernmembran kontinuierlich ineinander übergehen, es sind vielmehr aus mehreren Bestandteilen sehr regelmäßig aufgebaute Porenkomplexe mit einem äußeren Durchmesser von 120 nm und einer 8strahligen Symmetrie (Abb. 8.7). Die Öffnung in der Kernmembran ist rund und hat einen Durchmesser von 90 nm. Sie wird von 8 breiten Speichen verengt. Manchmal ist ein zentraler Pfropfen von ca. 35 nm Durchmesser vorhanden. Es ist aber nicht sicher, ob er einen regulären Bestandteil des Porenkomplexes darstellt oder nur eine Partikel ist, die gerade durchgeschleust oder zurückgehalten wird. Über und unter der Öffnung ist ein Ring mit einem Außendurchmesser von 120 nm aus je 8 globulären Untereinheiten mit den Speichen verbunden. Manchmal sind auch fädige Verlängerungen der Untereinheiten erkennbar (s. Abb. 8.2).

Die Anzahl der Kernporen variiert stark. Sie liegt zwischen etwa 3 Poren/ $\mu\text{m}^2$  Kernoberfläche in metabolisch inaktiven Zellen wie den kernhaltigen roten Blutkörperchen des Huhns oder den Säugetierlymphozyten und über 60 Poren/ $\mu\text{m}^2$  in den hochaktiven Amphibienoozyten oder der Grünalge *Ace-tabularia*. Leber-, Nieren- und Gehirnzellen besitzen etwa 10–20 Poren/ $\mu\text{m}^2$ . Eine hohe Dichte von Kernporen findet man auch in den „annulate lamellae“, die als Stapel von überschüssigem Kernmembranmaterial angesehen werden und sowohl im Cytoplasma als auch im Karyoplasma angetroffen werden.



**Abb. 8.7 a, b.** Schematische Darstellung eines Porenkomplexes **a** im Querschnitt und **b** in der Projektion der Aufsicht. R: Ring, S: Speichen, C: zentraler Pfropfen. (Nach Unwin u. Milligan 1982)



**Abb. 8.8 a, b.** Verhalten von mikroinjizierten Proteinen. **a**  $^{125}\text{I}$ -Tubulin und **b** eine  $^{35}\text{S}$ -markierte Karyoplasmaproteinfraktion wurden in das Cytoplasma von *Xenopus*oocyten injiziert. Die Autoradiogramme (Box 8.1) zeigen, daß Tubulin vom Kern ausgeschlossen, die Karyoplasmaproteinfraktion aktiv in den Kern aufgenommen wird. (Aus Robertis 1983)

### **Stoffaustausch zwischen Kern und Plasma**

Stoffe mit genügend kleinem Durchmesser diffundieren durch den Porenkomplex. Ihre Konzentration im Kern und Cytoplasma gleicht sich daher aus, sofern sie nicht in einem der beiden Kompartimente gebunden werden. Der Diffusionskanal im Porenkomplex hat einen effektiven Durchmesser von etwa 10 nm, wie aus der Wanderung von injizierten Dextran- und Goldpartikeln ermittelt wurde. Größere Partikel werden ausgeschlossen, kleinere können passieren. Die Porenkomplexe wirken insofern als Molekularsieb.

Der Durchtritt von größeren Partikeln ist prinzipiell möglich, wird aber durch den Porenkomplex kontrolliert. Das betrifft sowohl den Transport von RNAs aus dem Kern als auch den von Proteinen in den Kern. In das Cytoplasma injizierte Proteine sind daher nach kurzer Zeit entweder nur im Plasma oder im Kern oder in beiden Kompartimenten anzutreffen (Abb. 8.8). Zu den Proteinen, die im Kern angereichert werden, den sog. **karyophilen Proteinen**, gehören z. B. das Nukleoplasmin von *Xenopus* und das T-Antigen des SV 40 (simian virus 40).

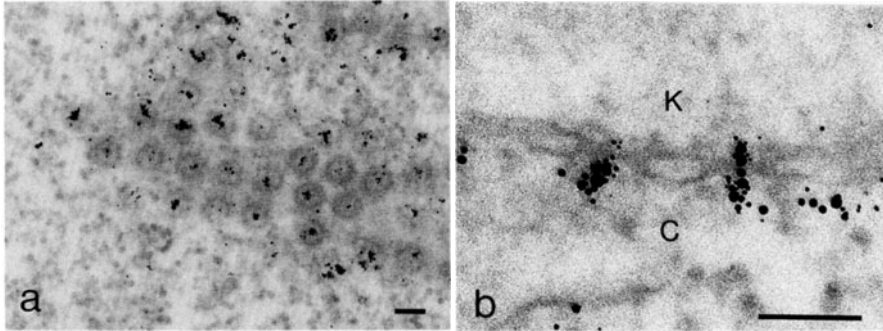
Nukleoplasmin kommt reichlich in den Kernen von *Xenopus*oocyten vor. Der Transport von Nukleoplasmin wurde *in vitro* in einem System von *Xenopus*-oocytenextrakten und hinzugefügten Kernen studiert. Die Aufnahme in den Kern ist ATP-abhängig, temperaturabhängig und effizienter als durch bloße Diffusion erklärbar. Sie erfüllt damit alle Bedingungen für einen aktiven Transport. Beschichtet man Goldpartikel bis zu einer Größe von 17 nm

### **Box 8.1 Mikroautoradiographie**

Der Einbau radioaktiver Substanzen in Zellen oder Chromosomen läßt sich durch Autoradiographie mikroskopischer Präparate verfolgen. Dazu werden nach Angebot  $^3\text{H}$ -markierter Vorstufen cytologische Präparate hergestellt und die nicht eingebauten radioaktiven Vorstufen ausgewaschen. Die Präparate werden mit einer Fotoemulsion überzogen, und nach genügender Expositionszeit folgt eine fotografische Entwicklung, die ein Silberkornbild in der Emulsionsschicht erzeugt. Im Mikroskop kann man aus der Verteilung der Silberkörner und den darunterliegenden angefärbten Zellen die radioaktiv gewordenen Zellkomponenten ermitteln.

(Beispiele: Abb. 8.8, 8.28)





**Abb. 8.9 a, b.** Transport von nukleoplasminbeschichteten Goldpartikeln durch die Kernporen. **a** Alle im Tangentialschnitt getroffenen Kernporen zeigen Goldpartikel, die durch die Mitte der Poren treten. Die *Xenopus*oocyte wurde eine Stunde nach Injektion der Partikel fixiert. **b** Querschnitt durch die Kernmembran bei stärkerer Vergrößerung. Das Bild gibt eine Situation 15 min nach Injektion der Goldpartikel wieder. K: Kern, C: Cytoplasma. Maßstab 0,1  $\mu\text{m}$ . (Aus Feldherr et al. 1984)

Durchmesser mit Nukleoplasmin, so werden selbst sie aktiv durch die Poren geschleust (Abb. 8.9).

Für den Transport in den Kern ist bei Proteinen eine Signalsequenz verantwortlich. Im T-Antigen von SV 40 ist es eine Sequenz aus sieben Aminosäuren: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Immunologisch damit verwandte Sequenzen sind auch in einigen weiteren im Kern angereicherten Proteinen zu finden. Koppelt man gentechnisch diese Signalsequenz an normalerweise nicht in den Kern aufgenommene Proteine, wie menschliches Serumalbumin oder Rinderserumalbumin, so werden sie aktiv in den Kern aufgenommen.

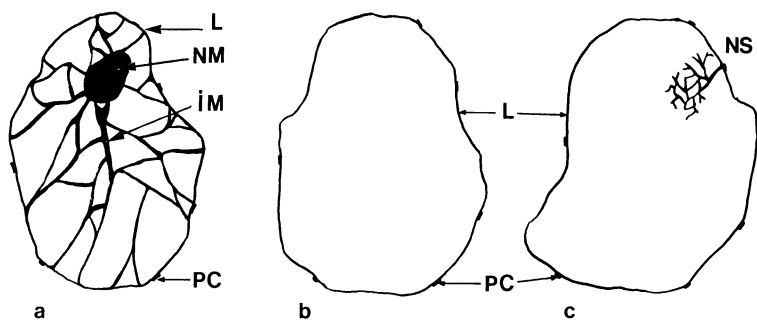
### ***Chromatinorganisation und Kernmatrix***

Interphasekerne zeigen im Licht- und Elektronenmikroskop ziemlich regelmäßig drei Komponenten:

- Euchromatin,
- Heterochromatin und
- einen oder mehrere Nukleolen (s. Abb. 8.1).

Das **Euchromatin** ist meist recht homogen. Es kann aber auch insgesamt eine schollige oder grobfädige Struktur haben. **Heterochromatin** liegt bevorzugt der Lamina an oder ist mit dem Nukleolus assoziiert. Der Nukleolus besteht zu einem geringen Teil aus Chromatin, überwiegend ist er aus Ribonukleoproteinen zusammengesetzt (s. Kap. 8.3).

Löst man das Chromatin aus isolierten, mit Hilfe eines Detergenz membranfrei gemachten Kernen, dann bleibt eine Reststruktur übrig, die **Kernmatrix**, „nuclear cage“ oder „nuclear scaffold“ genannt wird. Sie setzt sich aus der Lamina, den Porenkomplexen und je nach Behandlung einem Nukleolusrestkörper und einem internen Netzwerk zusammen (Abb. 8.10). Das interne



**Abb. 8.10 a–c.** Kernskelette in Ultradünnschnitten nach verschiedenen Isolationsprozeduren, **a** aus Lamina (L), Porenkomplexen (PC), nukleolärer Matrix (NM) und innerer Matrix (iM), **b** aus Lamina und Porenkomplexen, **c** aus Lamina, Porenkomplexen und einem Nukleolus (NS) bestehend. (Aus Hubert u. Bourgeois 1986)

Netzwerk besteht aus Fibrillen, denen RNPs angelagert sind. Die Darstellung eines internen Netzwerkes ist von den Isolationsbedingungen abhängig. Daher ist es umstritten, ob es durch Präzipitation entsteht und ein Präparationsartefakt ist oder ob es auch *in vivo* vorkommt. Dem unterschiedlichen Erscheinungsbild der Kernmatrix im Elektronenmikroskop entspricht eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Matrixpräparationen (s. Tabelle 6.2).

Lysiert man Zellen in einem nicht-ionischen Detergenz und extrahiert die Histone z. B. mit 2 M NaCl, so erhält man Matrixpräparationen mit intakter DNA, sog. **Nukleoide**. Die DNA ist darin in Form von Schleifen organisiert, deren Enden an die Matrix gebunden sind. Das Verhalten dieser Schleifen zeigt, daß sie negativ superhelikal aufgewunden und topologisch fixiert sind. Gibt man nämlich Ethidiumbromid in niedriger Konzentration zur Nukleoidpräparation, so entfaltet sich ein Hof von DNA-Schleifen um die Matrix, wie sich im Fluoreszenzmikroskop erkennen läßt. Ethidiumbromid kompensiert durch Interkalation die negative Superhelizität der DNA (vgl. Kap. 4). Erhöht man die Ethidiumbromidkonzentration immer weiter, so verkleinert sich der DNA-Hof wieder. Die zusätzlich interkalierenden Ethidiumbromidmoleküle verdrillen die DNA-Schleifen superhelikal in der Gegenrichtung. Setzt man dagegen durch vorsichtige DNaseI-Behandlung Einstrangbrüche, dann entfaltet sich der DNA-Hof auch ohne Ethidiumbromidinterkalation, und er ist durch hohe Ethidiumbromidkonzentrationen nicht mehr zu reduzieren. Einzelsträngige DNA ist nämlich topologisch nicht fixiert: sie kann frei um ihre eigene Achse rotieren.

Die Größe dieser Schleifen stimmt in etwa mit der Größe der DNA-Schleifen von mitotischen Chromosomen und der Schleifendomänen von Chromatinpräparationen überein. Das spricht dafür, daß es sich in allen drei Fällen um die gleiche Struktur handelt und die Schleifenorganisation der Mitosechromosomen während der Interphase beibehalten wird. Die kartierten MARs und SARs („matrix attachment regions“ und „scaffold attachment regions“, s. Kap. 6) der chromosomalen DNA binden *in vitro* an isolierte Kernmatrices. Sie binden allerdings nur an solche Präparationen der Kernmatrix, deren

inneres Maschenwerk erhalten geblieben ist. Die biochemisch definierten und unter der Bezeichnung Matrix zusammengefaßten Anheftungspunkte der Schleifendomänen sind daher wahrscheinlich mit dem im Elektronenmikroskop erkennbaren inneren Maschenwerk verbunden.

Da die Enden der DNA-Schleifen an der Matrix fixiert sind, ist die Matrix für die Organisation und Superhelizität der Schleifendomänen verantwortlich. Die dafür notwendige Topoisomerase II ist ein Bestandteil des inneren Maschenwerks von Kernmatrixpräparationen (s. Tabelle 6.2). Neben der Schleifenorganisation wird die Kernmatrix mit weiteren wichtigen biologischen Funktionen in Verbindung gebracht. Vermutlich ist der Replikationsvorgang an die Matrix gebunden. Sowohl während des regulären Replikationszyklus als auch bei Reparatursynthesen der DNA findet man nämlich frisch synthetisierte DNA mit der isolierten Matrix assoziiert. Es wird ferner für wahrscheinlich gehalten, daß auch die Transkriptionsaktivität mit der Matrix assoziiert ist. Die Ungewißheit in beiden Fällen hängt damit zusammen, daß der Zusammenhang durch Präzipitation bei der Isolation der Matrix vorgetäuscht sein kann.

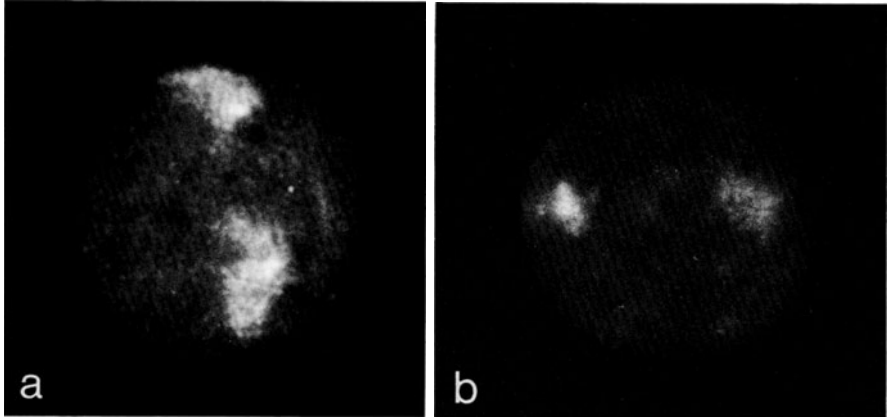
## 8.2 Anordnung der Chromosomen im Interphasekern

### *Chromosomenterritorien*

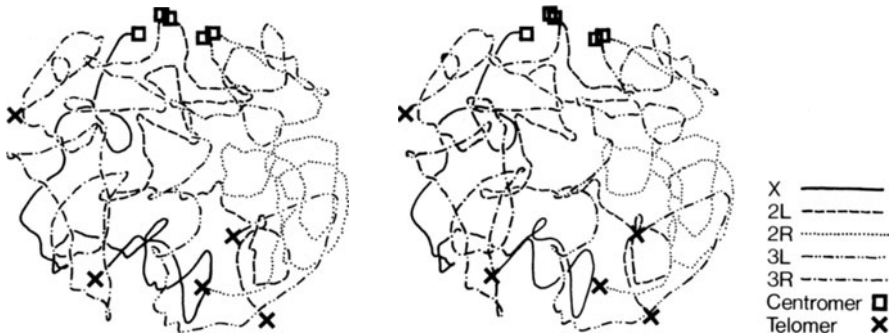
Von den heterochromatischen Chromosomen und Chromosomenabschnitten abgesehen, erscheinen die Chromosomen im Interphasekern der meisten Gewebe und Organismen wie aufgelöst. Man könnte deswegen annehmen, daß die DNA jedes Chromosoms ziemlich gleichmäßig über den Kern verteilt ist. Träfe das zu, dann müßte ein UV-Strahl durch den Kern die meisten oder alle Chromosomen treffen. Das ist jedoch nicht der Fall. Getroffene Segmente der Chromosomen lassen sich z. B. durch  $^3\text{H}$ -Thymidin-Angebot für die fällige Reparatursynthese und durch Autoradiographie in der folgenden Mitose lokalisieren. Nur wenige Chromosomen zeigen nach Bestrahlung mit einem UV-Strahl von 1–2  $\mu\text{m}$  Durchmesser Anzeichen von Strahlenläsionen.

Man kann ein Chromosom im Interphasekern durch In-situ-Hybridisation mit chromosomenspezifischen DNA-Proben lokalisieren. Markiert man gleichzeitig alle Abschnitte des Chromosoms mit einer chromosomenspezifischen Bibliothek von DNA-Sequenzen, so wird sichtbar, daß sich das Chromosom in der Interphase nicht durch den ganzen Kern erstreckt sondern ein relativ enges, gut begrenztes Areal hat (Abb. 8.11).

Die Chromosomen nehmen demnach Territorien ein, die sich nur wenig oder gar nicht durchdringen. 3D-Rekonstruktionen von Drosophila-Polytänchromosomen in intakten Speicheldrüsenkernen bestätigen diesen Sachverhalt. Der räumliche Verlauf der Polytänchromosomen ist in den Rekonstruktionen vollständig zu verfolgen. Man erkennt, daß die Arme verschiedener Chromosomen weder durcheinander laufen, noch umeinander geschlungen sind (Abb. 8.12). Eine vollständige räumliche Trennung der Chromosomenterritorien



**Abb. 8.11 a, b.** Territorien der menschlichen Chromosomen 7 (a) und 8 (b) in Interphasekernen. Die Chromosomen wurden mit einer Bibliothek markierter chromosomenspezifischer DNA-Fragmente in situ hybridisiert und durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. (Aus Lichter et al. 1988)



**Abb. 8.12.** Stereopaar einer dreidimensionalen Rekonstruktion der Polytänchromosomen in einem Speicheldrüsenkern von *Drosophila melanogaster*. Die beiden Figuren können mit einem Stereobetrachter oder durch Schielen zu einem dreidimensionalen Bild vereinigt werden. Auf diese Weise läßt sich jeder Chromosomenarm vom Centromer bis zum Telomer räumlich verfolgen. Die Struktur wurde aus optischen Schnitten fluoreszenzgefärbter Speicheldrüsenkerne mit Computerunterstützung rekonstruiert. (Nach Hochstrasser et al. 1986)

ritorien ist andererseits schwer vorstellbar, da spontane und induzierte Translokationsereignisse ein Mindestmaß an Kontakten zwischen nicht-homologen Chromosomen voraussetzen.

### ***Kontakte der Chromosomen mit der Kernhülle***

In normalen Interphasekernen ist nicht sicher auszumachen, welche Abschnitte der Interphasechromosomen Kontakt mit der Kernhülle haben. Auf-

fällig ist nur die Konzentration des Heterochromatins an der Kernhülle (s. Abb. 8.1), so daß man davon ausgehen kann, daß zumindest die größeren heterochromatischen Segmente der Chromosomen – mit Ausnahme des NOR-assoziierten Heterochromatins – regelmäßig die Kernhülle berühren.

Das geht auch aus den oben beschriebenen 3D-Rekonstruktionen der Speicheldrüsenkerne von *Drosophila* hervor, in denen die Interphasechromosomen als Polytänchromosomen (s. Kap. 11.5) sichtbar sind (s. S. 308). Nur 15 definierte Abschnitte wurden mit statistischer Regelmäßigkeit in Kontakt mit der Kernhülle angetroffen, 14 davon stimmen mit der Lage von interkalaren heterochromatischen Segmenten überein.

In der frühen meiotischen Prophase, vom Leptotän bis zum Pachytän, sind regelmäßig die Telomere in der Kernhülle verankert. Für die sehr spezialisierten Polytänchromosomen von *Drosophila* trifft das offensichtlich nicht zu: regelmäßig sind einige Telomere von der Kernhülle entfernt anzutreffen (vgl. Abb. 8.12). Es ist deswegen zumindest unsicher, ob in normalen Interphasekernen neben heterochromatischen Segmenten auch Telomere regelmäßig mit der Kernhülle Kontakt haben.

### ***Rabl-Orientierung der Chromosomen***

C. Rabl hatte 1885 beobachtet, daß Chromosomen in der Prophase der Mitose dieselbe Ausrichtung wie in der Telophase der vorausgegangenen Mitose haben. Die Centromere sind nach einer Seite, die Telomere der freien Chromosomenarme zur Gegenseite ausgerichtet. Rabl schloß daraus, daß die Chromosomen auch während der Interphase diese Orientierung beibehalten. Mehrere neuere Befunde sprechen dafür, daß die **Rabl-Orientierung** der Chromosomen in Interphasekernen weit verbreitet ist, wenn nicht gar allgemein vorkommt.

So zeigen Muntjakchromosomen der G<sub>2</sub>-Phase ebenso wie solche der G<sub>1</sub>-Phase Rabl-Orientierung, wenn sie durch Zellfusion mit teilungsbereiten anderen Zellen vorzeitig zur Kondensation gezwungen werden (PCC, s. Kap. 8.4.2). Selbst Chromosomen aus Lymphozyten der G<sub>0</sub>-Phase behalten die polarisierte Ausrichtung bei, obwohl die Zellen über Jahre in dieser Phase verharren.

### ***Räumliche Beziehungen der Chromosomen zueinander***

Immer wieder wurde erwogen, ob Chromosomen festgelegte Positionen in Interphasekernen einnehmen. Eine feste Chromosomenposition ist allerdings bisher nur von der Spermio-genese der Amphibien bekannt geworden: Ein auffälliger heterochromatischer Chromatinblock ist immer an der Kernhülle in Akrosomnähe zu finden.

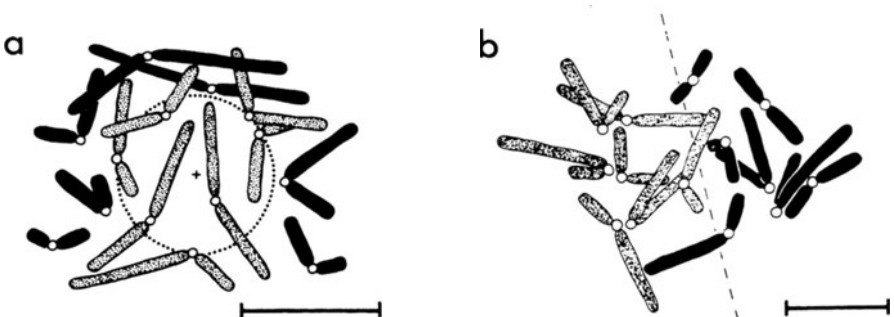
Dagegen wird bis heute die Frage kontrovers beantwortet, ob die Chromosomen im Interphasekern relativ zueinander bevorzugte Anordnungen einneh-

men. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Paarung homologer Chromosomen, die Assoziation definierter nicht-homologer Chromosomen und die räumliche Beziehung der beiden haploiden Sätze zueinander.

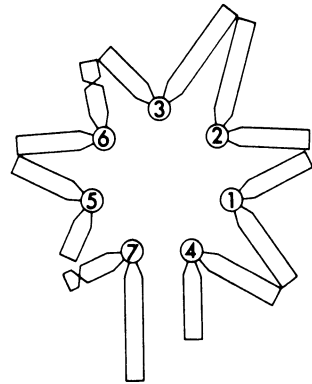
Bei den Dipteren sind die homologen Chromosomen regelmäßig in der Interphase gepaart. In den Polytänchromosomen ist die Paarung sogar so perfekt, daß die Homologen zusammen wie ein Chromosom erscheinen (s. S. 308). Aber auch die Anordnung der Mitosechromosomen in den diploiden Zellen von Dipteren ist auffällig: die homologen Chromosomen liegen in der mitotischen Metaphase immer in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander (s. S. 308). In den meisten Säugetierzellen sind andererseits die Chromosomen sicher nicht regelmäßig somatisch gepaart. Das wurde durch In-situ-Hybridisation mit Proben für spezifische Chromosomen nachgewiesen. Homologe Chromosomen liegen in Interphasekernen unregelmäßig weit voneinander entfernt (s. Abb. 8.11).

In Ermangelung direkter Untersuchungsmöglichkeiten bei den meisten Arten wurden die Lagebeziehungen der Chromosomen in der Metaphase als Indiz für ihre Lagebeziehungen in der Interphase ausgewertet. Elektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktionen von Ultradünnschnittserien durch Metaphasen erlauben die exakte Beschreibung der relativen Lage, in günstigen Fällen auch das Identifizieren der Chromosomen aus dem Volumenverhältnis der Arme. Mit diesem analytischen Hilfsmittel wurden Regeln für die **Anordnung der Chromosomen** bei einer Reihe von Grasarten gefunden:

- Homologe Chromosomen sind nicht assoziiert.
- Die beiden haploiden Chromosomensätze sind räumlich separiert, entweder nebeneinander oder in konzentrischer Anordnung umeinander (Abb. 8.13).
- Innerhalb der haploiden Sätze sind die Chromosomen bevorzugt so angeordnet, daß gleich lange Arme heterologer Chromosomen einander benachbart sind (Abb. 8.14).



**Abb. 8.13a, b.** Separation der elterlichen Genome. **a** Konzentrische Anordnung der elterlichen Genome in einem *Hordeum vulgare* × *Secale africanum*-Bastard; das haploide *H. vulgare*-Genom ist punktiert dargestellt. **b** *Hordeum vulgare*; die beiden haploiden Genome liegen nebeneinander, die Linie trennt vollständige Genome voneinander. Polansichten von Metaphaseplatten, die aus Ultradünnschnittserien rekonstruiert werden. Maßstab 5 µm. (Aus Bennett 1984)



**Abb. 8.14.** Häufigste Anordnung der Metaphasechromosomen in der unzerstörten Spindel. Ein haploider Satz ( $n=7$ ) der Gersten. Die Längendifferenzen nebeneinanderliegender Chromosomen-Arme sind bei dieser Anordnung minimiert. (Aus Bennett 1982)

Die biologische Bedeutung dieser regelmäßigen Anordnung ist unbekannt. Erwogen werden mechanische Vorteile bei der Mitose und eine koordinierte Funktion regelmäßig benachbarter Genorte heterologer Chromosomen im Interphasekern.

### 8.3 Nukleolen

Die Orte der Ribosomenbiogenese, die Nukleolen, sind neben Heterochromatin die auffälligsten Strukturen eines Interphasekerns im Lichtmikroskop. Ihre vorherrschenden Bestandteile sind RNA und Protein. In autoradiographischen Studien der  $^3\text{H}$ -Uridin-Inkorporation machen sich Nukleolen als Orte mit der höchsten Transkriptionsaktivität im Kern bemerkbar.

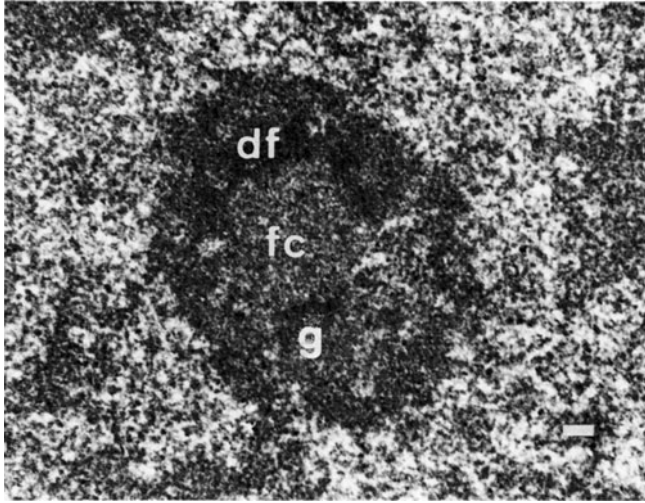
Im Elektronenmikroskop kann man typischerweise drei Bestandteile des Nukleolus unterscheiden:

- die granuläre Komponente, die aus 15–20 nm großen Partikeln besteht,
- die dichte fibrilläre Komponente mit 4–10 nm dicken Fäden und
- die fibrillären Zentren, die 5 nm dicke Fäden neben nukleosomalen Fäden und supranukleosomalen Strukturen enthält (Abb. 8.15).

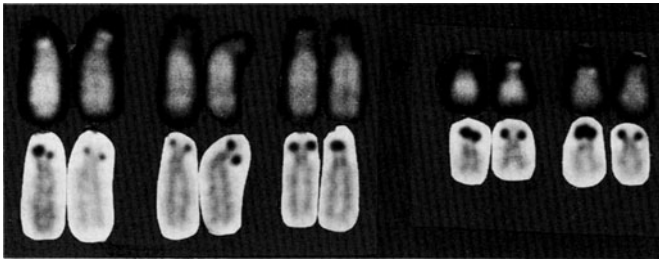
Ziemlich regelmäßig ist der Nukleolus mit Heterochromatin assoziiert, das in das Kernlumen hineinragt. Eine weitere Struktur wird erst sichtbar, wenn Matrixpräparationen hergestellt werden: ein Gerüst, das als **nukleoläre Matrix** Teil der Kernmatrix ist (s. Abb. 8.10).

#### *NORs und Nukleolenbildung*

Die Nukleolen werden in jeder Mitose aufgelöst und anschließend wieder neu gebildet. Nukleolen formen sich an speziellen Chromosomenorten, den **Nukleolenbildungsorten** (NORs, „nucleolus organizing regions“). Je nach Spezies findet man einen oder wenige NORs pro haploidem Chromosomensatz. In



**Abb. 8.15.** Nukleolus eines menschlichen Lymphocyten. fc: fibrilläres Zentrum; df: dichte fibrilläre Komponente; g: granuläre Komponente. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts, kontrastiert mit Uranylazetat-Bleizitrat, Maßstab 0,1  $\mu\text{m}$ . (Aus Schwarzacher u. Wachtler 1983)

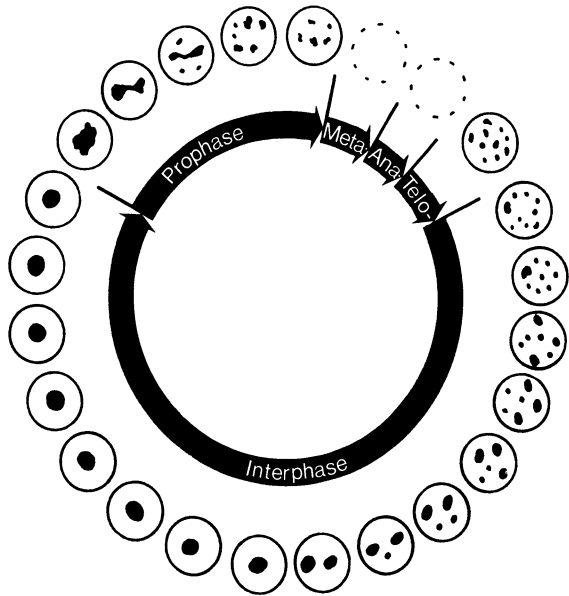


**Abb. 8.16.** NORs in menschlichen Chromosomen. Die großen akrozentrischen Chromosomen 13, 14 und 15 und die kleinen akrozentrischen Chromosomen 21 und 22 haben NORs, wie die AgNOR-Färbung zeigt (untere Reihe). Sekundäre Konstriktionen sind in einigen Fällen in der Q-Bandenfärbung (obere Reihe) zu erkennen. (Aus Mikelsaar u. Schwarzacher 1978)

vielen Fällen markieren sekundäre Konstriktionen die Lage der NORs in den Mitosechromosomen. Beim Menschen tragen die akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 NORs. Diese Chromosomen haben in der Region des NOR eine sekundäre Konstriktion, die ein kleines endständiges Chromosomenstück, einen sog. Satelliten, vom Rest des Chromosoms abtrennt (Abb. 8.16).

Für den Nachweis der NORs in den Chromosomen wurde eine Silberimprägnationstechnik, die **Ag-NOR-Färbung**, entwickelt. Sie beruht darauf, daß einzelne Nukleolusproteine wie das Nukleolin präferentiell mit  $\text{AgNO}_3$  reagieren und daß Reste dieser Nukleolusproteine an den NORs in der Mitose haften





**Abb. 8.17.** Zyklische Veränderung der Nukleoli im Mitosezyklus menschlicher embryonaler Nierenzellen. (Nach Anastassova-Kristeva 1977)

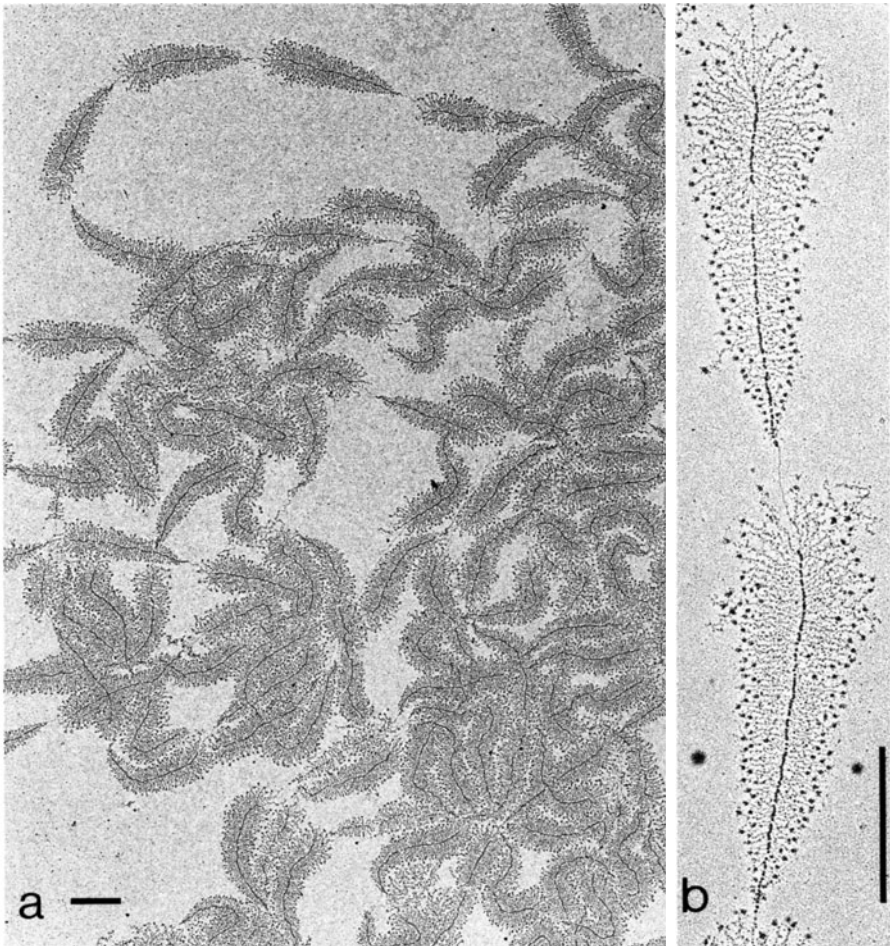
bleiben. Alle zehn NORs des Menschen enthalten ribosomale DNA (rDNA), die Zahl der Ag-NOR-positiven NORs variiert aber von 4–10 zwischen verschiedenen Individuen. Da die Ag-NOR-Technik nur solche NORs markiert, die in der vorangegangenen Interphase aktiv waren, weist das auf eine individuelle Variabilität der NOR-Aktivität hin.

Jeder aktive NOR kann einen Nukleolus organisieren. Die maximale Zahl der Nukleolen entspricht der Zahl der aktiven NORs in der Zelle. Meist findet man aber weniger. Die Zahl der Nukleolen geht in der Interphase des Zellzyklus durch Verschmelzen zurück (Abb. 8.17).

### **Ribosomenbiogenese**

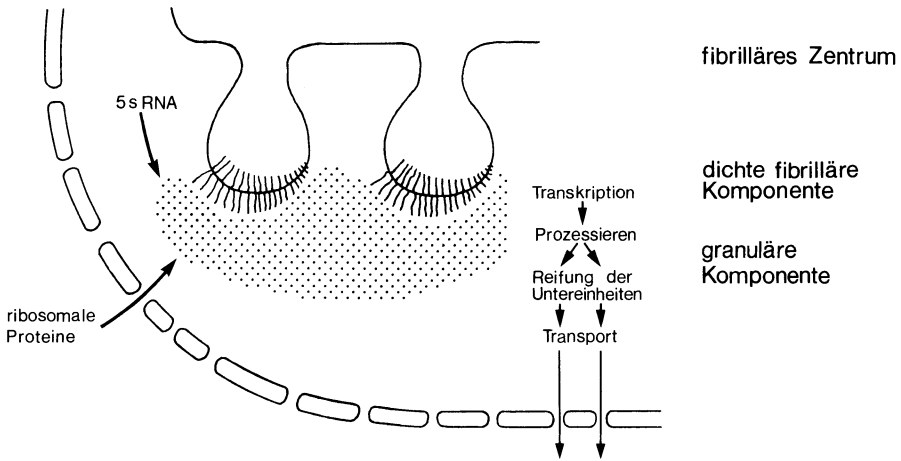
NORs enthalten Tandem-Repeats von rDNA, der genetischen Information für ribosomale RNAs. In elektronenmikroskopischen Spreitungspräparaten erscheinen die aktiven rDNA-Einheiten eines NOR als tandemartige Wiederholungen von Transkriptionseinheiten mit nicht-transkribierten Spacern (Abb. 8.18). Die Transkriptionseinheiten sind dicht besetzt mit RNP-Fibrillen, deren Länge vom Transkriptionsstart aus gradientenartig zunimmt. Sie verleihen den Transkriptionseinheiten das Aussehen von Tannenbäumen. Die dicht nebeneinanderliegenden Partikel an der Basis der RNP-Fibrillen sind RNA-Polymerase I-Moleküle, die für die Transkription der rDNA verantwortlich sind.

Mit  $^3\text{H}$ -Uridin-Pulsmarkierung erweist sich die dichte fibrilläre Komponente als Ort der Transkription der rDNA, während die fibrillären Zentren Chromatin ohne erkennbare Aktivität enthalten (Abb. 8.19). Abgeschrieben wird zunächst eine 45S RNA, die dann in mehreren Schritten zu den drei



**Abb. 8.18 a, b.** Tandem-Repeats aktiver ribosomaler Transkriptionseinheiten aus dem Nukleolus einer Oocyte des Molchs *Pleurodeles*. EM-Aufnahmen eines Spreitungspräparates, Maßstab 1  $\mu\text{m}$ . **a** Übersichtsbild; **b** zwei Transkriptionseinheiten: naszierende RNP-Fäden gehen dicht gedrängt von der DNA-Achse aus. Die Partikel an der Basis der RNP-Fäden werden als PolymeraseI-Molekül angesehen. (Aus Scheer 1987)

rRNAs, 28S, 18S und 5.8S, prozessiert wird (s. Kap. 5.2.2). 5S rRNA wird an einem anderen Chromosomenort von der RNA-Polymerase III transkribiert und gelangt von dort in den Nukleolus. Die ribosomalen Proteine werden im Plasma synthetisiert und in den Kern importiert. Im Nukleolus werden die rRNAs prozessiert und mit den Proteinen vereinigt. Die granuläre Komponente der Nukleolen ist die Zone, in der die Vorstufen zur großen und kleinen ribosomalen Untereinheit reifen (vgl. Abb. 4.20). Die Untereinheiten werden schließlich aus dem Kern ausgeschleust und im Plasma zu funktionstüchtigen Einheiten aktiviert.



**Abb. 8.19.** Schematische Darstellung der Funktion des Nucleolus bei der Ribosomenbiogenese. (Nach Sommerville 1986)

### ***Nucleoläre Dominanz***

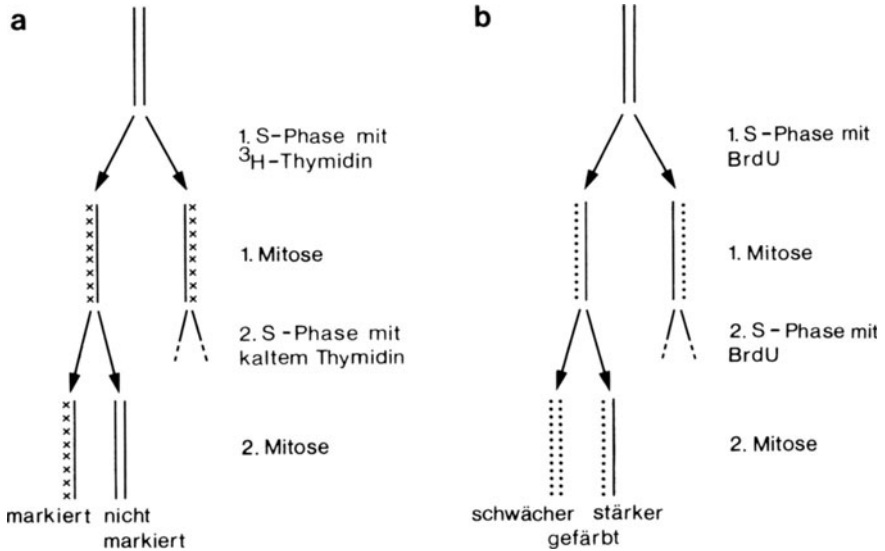
In Artbastarden zwischen den Krallenfröschen *Xenopus laevis* und *Xenopus borealis* wurde beobachtet, daß nur die NORs einer Art, in diesem Fall die von *X. laevis*, aktiv sind. Das Phänomen wird **nucleoläre Dominanz** genannt. Gleichartige Beobachtungen wurden in Artkreuzungen von *Drosophila* und von verschiedenen Pflanzenarten gemacht. Auch bei somatischen Zellhybriden zwischen Maus und Mensch werden nur die NORs einer Species exprimiert. Je nach den verwendeten Ausgangszelllinien sind entweder die menschlichen NORs oder die Maus-NORs unterdrückt. Die ribosomalen Gene der unterdrückten NORs werden nicht transkribiert. Für die nucleoläre Dominanz sind wahrscheinlich speciespezifische Transkriptionsfaktoren und bzw. oder die unterschiedliche Ausstattung der rDNA mit Enhancern verantwortlich.

## **8.4 Verdopplung der Chromosomen**

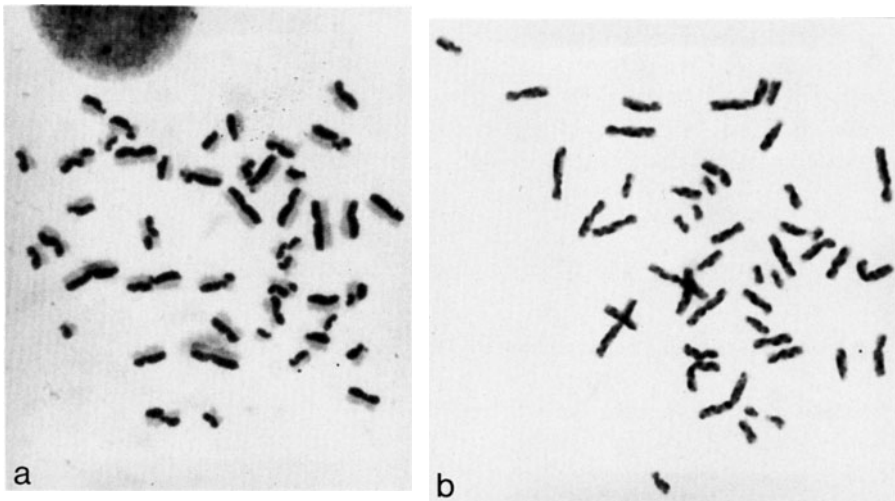
### **8.4.1 Replikation der chromosomalen DNA**

#### ***Semikonservative Replikation***

In klassischen Experimenten mit  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau hat J.H. Taylor 1957 gezeigt, daß die DNA eines Chromosoms semikonservativ repliziert wird. Nach der S-Phase mit  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau sind in der ersten Mitose beide Chromatiden eines Chromosoms markiert. In der nächsten S-Phase wird nur kaltes (nicht markiertes) Thymidin angeboten. In der darauffolgenden Mitose unterscheiden sich die beiden Chromatiden. Eine Chromatide ist markiert, die



**Abb. 8.20 a, b.** Semikonservative Replikation der Chromosomen: die eine Schwesterchromatide eines Chromosoms enthält nach zwei Replikationszyklen einen alten und einen neuen DNA-Einzelstrang, die andere zwei neue DNA-Einzelstränge. **a** Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thyminid und Nachweis durch Autoradiographie. **b** Markierung mit BrdU und Nachweis mit dem Fluoreszenzfarbstoff H33258 oder mit dem Fluoreszenz-plus-Giemsa-Verfahren. Die Markierung verursacht eine schwächere Anfärbung



**Abb. 8.21 a, b.** Semikonservative Replikation der Chromosomen und Schwesterstrangaustausch. Differentielle Darstellung der Schwesterchromatiden nach zwei Runden BrdU-Inkorporation und Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbung. **a** Metaphase eines gesunden Menschen mit wenig Schwesterstrangaustausch; **b** erhöhter Schwesterstrangaustausch (Harlekinmuster) bei einem Patienten mit Bloom-Syndrom. (T. Schroeder-Kurth, Heidelberg)

andere ist unmarkiert (Abb. 8.20 a). Die Chromatiden enthalten offenbar je eine DNA-Doppelhelix, deren Einzelstränge bei der Replikation als Matrizen für die Synthese neuer Einzelstränge dienen und vollständig auf die beiden Tochterchromatiden verteilt werden. Heute werden solche Untersuchungen in der Regel mit BrdU-Einbau anstelle von  $^3\text{H}$ -Thymidin durchgeführt. Das Verfahren kommt ohne Autoradiographie aus und hat daher den Vorteil eines größeren Auflösungsvermögens (Abb. 8.20 b, 8.21).

Hin und wieder springt die Markierung zum Schwesterstrang über, aber in jeder Position ist nur ein Strang markiert. Der Markierungswechsel zeigt einen **Schwesterstrangaustausch** (SCE, „sister chromatid exchange“) an, der im Interphasekern stattgefunden hat (s. Kap. 8.4.2).

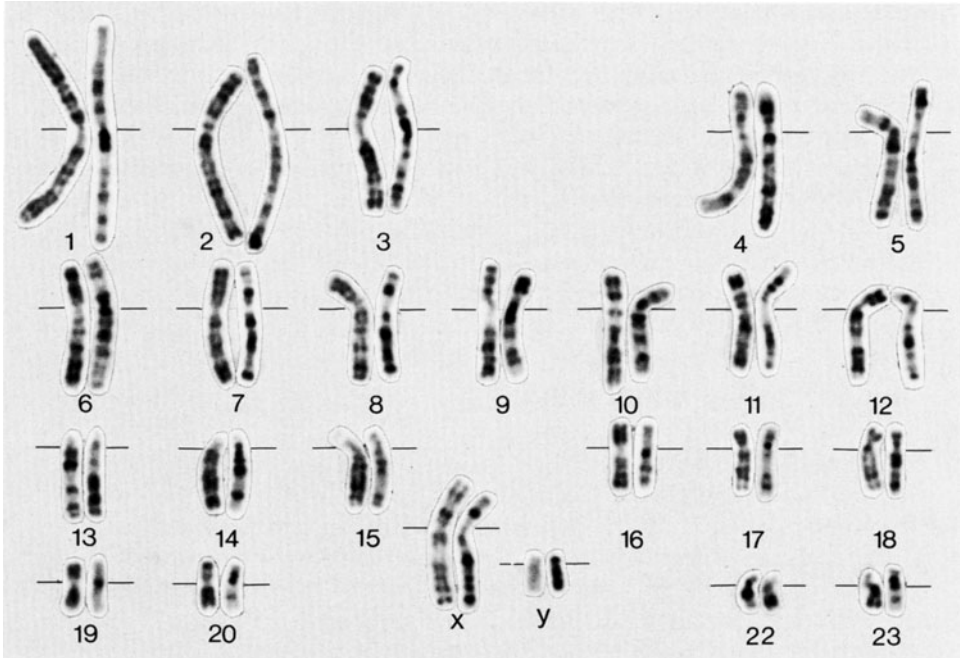
### ***Früh- und spätreplizierende Komponenten***

Die Replikation eines Chromosoms findet weder in allen Segmenten gleichzeitig statt, noch läuft eine einzige Replikationswelle über das Chromosom. Inkorporationsstudien mit  $^3\text{H}$ -Thymidin oder BrdU zu verschiedenen Zeiten der S-Phase zeigen vielmehr, daß die Replikation blockweise oder bandenweise synchronisiert ist. Man kann die Banden grob in frühe und späte Banden einteilen, je nachdem, ob sie in der frühen oder späten S-Phase replizieren. Säugetierchromosomen sind besonders eingehend untersucht worden. Die in den Säugetierchromosomen vorhandenen R-Banden replizieren früh, G- und C-Banden replizieren spät in der S-Phase (Abb. 8.22).

Die asynchrone und meistens späte Replikation der C-Banden ist charakteristisch für Heterochromatin. Das gilt aber nicht nur für das konstitutive Heterochromatin sondern auch für fakultatives Heterochromatin. In vielen Tiergruppen mit XY- oder X0-Geschlechtsbestimmung wie z. B. Säugetieren und Heuschrecken wird das X-Chromosom in der Spermatogenese heterochromatisch. Der Übergang vom euchromatischen in den fakultativ heterochromatischen Zustand fällt mit dem Übergang von früher zu später Replikation zusammen. Ähnlich verhält sich auch das X-Chromatin in den somatischen Zellen der weiblichen Säugetiere. Von den beiden X-Chromosomen ist das eine euchromatisch und das andere heterochromatisch. Das euchromatische X repliziert zusammen mit den autosomalen R- und G-Banden, während das inaktive und fakultativ heterochromatische X überwiegend spät repliziert (s. S. 294), obwohl sein R- und G-Bandenmuster unverändert ist. Die späte Replikation beim fakultativen Heterochromatin wird demnach zumindest nicht direkt von der Sequenz der replizierenden DNA diktiert, sondern hängt mit einer Modifikation der DNA oder mit der veränderten Chromatinorganisation zusammen.

### ***Replikons***

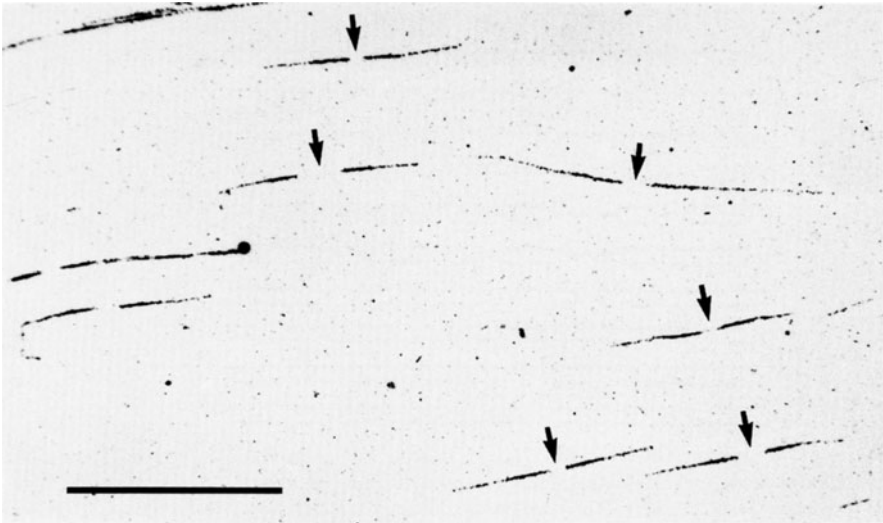
Man kann nach kurzzeitigem  $^3\text{H}$ -Thymidinangebot Faser-Autoradiographien einzelner replizierender DNA-Fäden anfertigen. In solchen Faser-Autoradio-



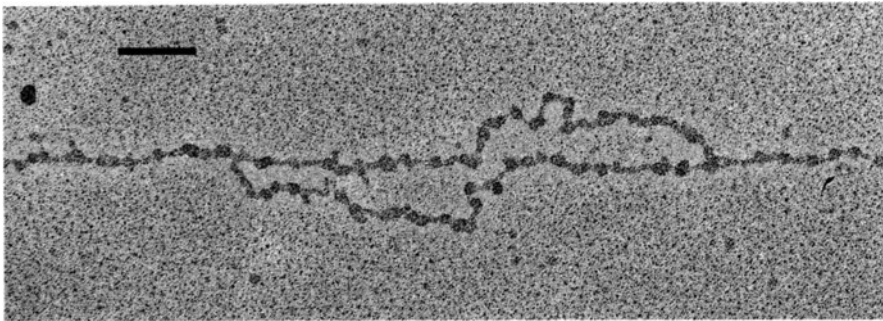
**Abb. 8.22.** Replikationsbanden in den Chromosomen des Menschen. In jedem Chromosomenpaar dieser Zusammenstellung zeigt das linke das Muster früh replizierender, das rechte das Muster spät replizierender Banden als dunkle Banden. Die Muster sind komplementär zueinander. Das linke Muster entspricht einem R-Bandenmuster, das rechte einem G-Bandenmuster. Die Replikationsbanden wurden durch BrdU-Angebot in der frühen S-Phase oder späten S-Phase und Nachweis mit der FPG-Technik sichtbar gemacht. Die DNA der dunklen Banden hat daher im BrdU-freien Abschnitt der S-Phase repliziert. (W. Vogel, Ulm)

graphien erkennt man an dem Silberkornbild die replizierenden Abschnitte (Abb. 8.23). In günstigen Fällen findet man mehrere synchron replizierende Abschnitte auf einem Faden: die DNA eines Eukaryontenchromosoms besteht aus vielen Replikationseinheiten, sogen. **Replikons**. Von Startpunkten, den **Replikationsorigins**, ausgehend breitet sich die Replikation in beide Richtungen, bidirektional, aus, wie man aus den Faser-Autoradiographien ablesen kann (Abb. 8.23). Dadurch bilden sich **Replikationsblasen** („bubbles“ oder „eyes“) mit zwei Replikationsgabeln, die sich in entgegengesetzte Richtungen fortbewegen (Abb. 8.24). Mit fortschreitender Replikation vergrößern sich daher die Blasen. Die Replikationsrunde ist beendet, wenn alle Nachbarblasen miteinander verschmolzen sind (Abb. 8.25).

Im Gegensatz zu Prokaryonten wird bei Eukaryonten jedes Replikon nur einmal in jedem Zellzyklus repliziert. Das zeigt sich in Zellfusionsexperimenten. Zellen der G1-Phase lassen sich durch Zellfusion mit S-Phase-Zellen zur Replikation induzieren. G2-Phase-Zellen sind nicht induzierbar. Eine erneute Initiation der Replikation ist blockiert.

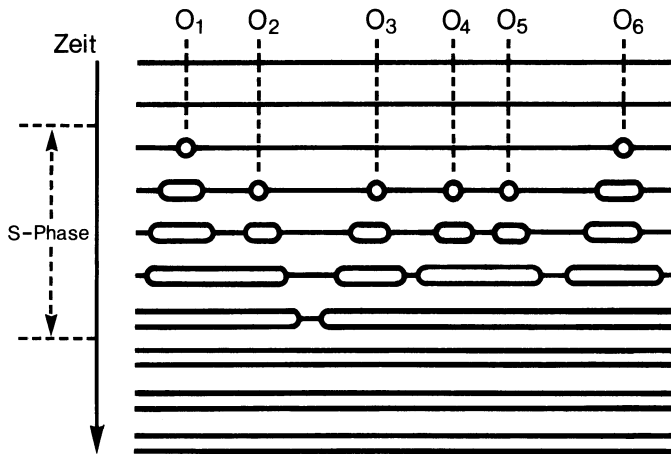


**Abb. 8.23.** Faser-Autoradiographie replizierender DNA aus einer menschlichen Fibroblastenzelle. Die Pfeile zeigen auf die Initiationpunkte. Den Zellen wurde 30 min lang eine hohe und weitere 150 min eine geringere  $^3\text{H}$ -Thymidin-Konzentration angeboten. Anschließend wurden die Zellen lysiert und von den Präparaten Autoradiographien angefertigt. Synthese während der ‚heißen‘ Bedingungen ergibt dichte, während der ‚warmen‘ Bedingungen unterbrochene Silberkornspuren. (Aus Yurov u. Liapunova 1977)



**Abb. 8.24.** Replikationsblase mit Nukleosomen aus dem Blastoderm von *Drosophila*. Maßstab 100 nm. (Aus McKnight u. Miller 1977)

Die Replikation wird bei Eukaryonten von den Polymerasen  $\alpha$  und  $\delta$  katalysiert, die mit mehreren anderen Proteinen in komplexen Replikationsmaschinen, den **Replisomen**, zusammenarbeiten (s. Kap. 4.1.6). In *Xenopus*eiern, einem Modellsystem für Replikation, replizieren sie beliebige injizierte DNA-Sequenzen ohne besondere Anforderungen an die Sequenz der Replikationsorigins. Das könnte allerdings eine Besonderheit dieser Zellen sein. Bei Prokaryonten, Viren und Hefe sind nämlich Replikationsorigins mit definierten



**Abb. 8.25.** Replikation eines DNA-Stranges mit mehreren Replikons. Die Replikation beginnt gleichzeitig oder zu verschiedenen Zeiten an den Replikationsorigins O<sub>1</sub>–O<sub>6</sub>. Die Replikationsblasen breiten sich aus, bis sie mit den benachbarten Blasen verschmelzen. (Verändert nach Blumenthal et al. 1974)

DNA-Sequenzen assoziiert. Bei der Hefe *Saccharomyces* sind solche Sequenzen als ARS-Elemente („autonomously replicating sequences“) beschrieben worden (Abb. 7.20). Nach einer Modellvorstellung bindet ein Initiatorprotein an diese Sequenz. In seiner unmittelbaren Nachbarschaft findet sich eine andere Sequenz, die sich mit besonders geringem Energieaufwand entwinden lässt, ein „DNA unwindig element“ (DUE), das als Eintrittsstelle des Replisoms dient.

### **Replikongröße und Replikationsgeschwindigkeit**

Die Replikationsgeschwindigkeit und die Größe der Replikons lassen sich aus der Faser-Autoradiographie ermitteln. Die Größe der einzelnen Replikons schwankt. Die meisten liegen zwischen etwa 50 und 300 kb Länge. Die Geschwindigkeiten für die Fortbewegung der Replikationsgabeln liegen zwischen 0,3 und 3,3 kb min<sup>-1</sup> (Tabelle 8.1). Initiationszeitpunkte und Replikongrößen sind im Genom nicht zufällig verteilt. Benachbarte Replikons haben eine ähnliche Größe und werden koordiniert initiiert. Die Replikationsbanden der Chromosomen werden dementsprechend als Blöcke ähnlich großer und synchron replizierender Replikons angesehen.

Die Größe der Replikons ist allerdings nicht für alle Zelltypen einer Species streng festgelegt. Beim Teichmolch *Triturus vulgaris* sind die Replikons in der langen prämeiotischen S-Phase durchschnittlich dreimal so lang wie in den sich rasch teilenden embryonalen Zellen. Bei *Drosophila* wurden in einer Zelllinie in der Zellkultur Replikons von durchschnittlich 13 µm Länge gefunden, während die embryonalen Blastodermzellen im Schnitt Replikons von nur 3–4 µm



**Tabelle 8.1.** Replikongröße und Replikationsgeschwindigkeit. Längen wurden in kb umgerechnet:  $1 \mu\text{m} = 3 \text{ kb}$ . (Daten aus Blumenthal et al. 1974; Callan 1974; Hand 1975; Yurov u. Liapunova 1977; Francis u. Bennett 1982)

	Dauer der S-Phase	Durchschnittliche Replikongröße	Geschwindigkeit der Replikationsgabel
Roggen, Wurzelmeristen, 23 °C	–	60–75 kb	$0,6 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
<i>Drosophila melanogaster</i> , Furchungskerne	3,4 min	3,4 kb	$2,6 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
<i>Drosophila melanogaster</i> , Zellkultur, 20 °C	10 h	28 und 57 kb	$2,6 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
<i>Triturus vulgaris</i> , Neurula, 18 °C	4 h	120 kb	$0,3 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
<i>Triturus vulgaris</i> Spermatocyten, 18 °C	200 h	$\geq 300 \text{ kb}$	$0,6 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
Maus, L929-Zellen	?	90–750 kb	$0,5\text{--}3,3 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$
Chinesischer Hamster, fibroblastenähnliche Zelllinie	6–7 h	240 kb – 1,2 Mb	$2,4 \text{ kb} \cdot \text{min}^{-1}$

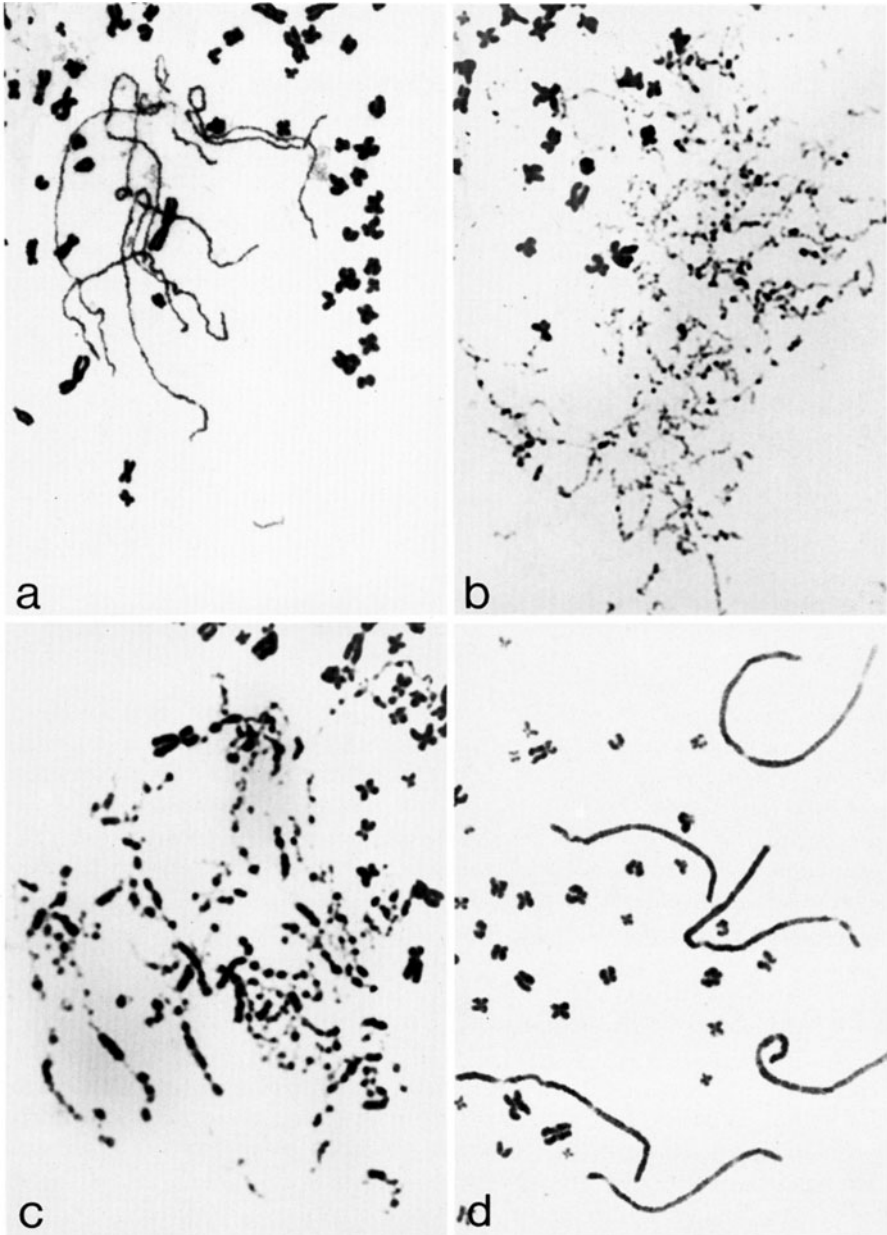
Länge enthalten (Tabelle 8.1). In manchen Zellen werden also Replikationsorigins eröffnet, die in anderen inaktiv sind. Blastodermzellen von *Drosophila* müssen sich alle 9–10 min teilen. Die Eröffnung zusätzlicher Replikationsorigins ist daher in diesem Fall als Anpassung an die Teilungsgeschwindigkeit zu verstehen. Offenbar sind in der DNA mehr potentielle Replikationsorigins vorhanden als in der Regel genutzt werden. Auch von der Bäckerhefe ist bekannt, daß normalerweise nur wenige der kartierten ARS-Elemente von natürlichen Chromosomen in der Replikation aktiv werden.

#### 8.4.2 Neubildung der Chromatiden

Die beiden Tochterdoppelhelices werden unmittelbar nach der Replikation in Chromatin verpackt (s. Abb. 8.24). Sie organisieren sich in zwei Schwesterchromatiden, die im Zellzyklus erst sichtbar werden, wenn sich die Chromosomen beim Eintritt in die nächste Mitose kondensieren.

#### PCCs

Man kann jedoch die Chromatiden aus verschiedenen Interphaseabschnitten durch Fusion der Interphasezelle mit einer mitotischen Zelle zur vorzeitigen Kondensation zwingen und dadurch sichtbar machen. Solche vorzeitig kondensierten Chromosomen, PCCs („prematurely condensed chromosomes“), sind gerade wegen ihrer vorzeitigen Kondensation keine echten Interphasechromosomen, aber sie geben Momentaufnahmen vom Zustand der Chroma-



**Abb. 8.26 a–d.** PCCs im Zellzyklus. Muntjakfibroblasten wurden in verschiedenen Phasen des Zellzyklus mit mitosebreiten HeLa-Zellen fusioniert und die Chromosomen so zur vorzeitigen Kondensation gezwungen. Die wenigen großen Muntjakchromosomen ( $2n=7$ ), vgl. Abb. 2.18) lassen sich gut von den zahlreichen immer gleich stark kondensierten kleinen menschlichen Chromosomen unterscheiden. **a** G1-Phase. Die Muntjakchromosomen sind gleichmäßig dünn, sie bestehen nur aus einer Chromatide. **b** Frühe S-Phase. Die Muntjakchromosomen erscheinen wie aufgelöst. **c** Späte S-Phase. Die Muntjakchromosomen bestehen bereits streckenweise aus zwei Chromatiden und erscheinen an diesen Stellen dick. **d** G2-Phase. Die Muntjakchromosomen bestehen aus zwei vollständigen Chromatiden. (Aus Sperling 1982)

tiden wieder. Man kann mit Hilfe der PCC-Technik die Neubildung der Chromatiden verfolgen.

PCCs der G1-Phase bestehen aus einer Chromatide (Abb. 8.26 a). Sie werden mit fortschreitender G1-Phase immer länger. Unmittelbar vor Eintritt in die S-Phase sind individuelle Chromosomen nicht mehr unterscheidbar. Das Maximum an Dekondensation erreichen PCCs in der frühen S-Phase. In der S-Phase erscheinen die PCCs wie pulverisiert: kondensierte Abschnitte wechseln mit dekondensierten ab. Viele Stellen sind so stark dekondensiert, daß sie im Lichtmikroskop als Lücken in den Chromosomenfäden erscheinen (Abb. 8.26 b).  $^3\text{H}$ -Thymidininkorporation und Autoradiographie weisen diese Lücken als diejenigen Chromosomenabschnitte aus, die gerade repliziert werden. Im Rasterelektronenmikroskop erkennt man, daß es Abschnitte mit geringer Dichte sind, die Kontinuität der Chromosomen in Wirklichkeit also nicht unterbrochen ist. In der mittleren S-Phase sind viele Abschnitte bereits kondensiert und in einigen Fällen als doppelt zu erkennen. Sie enthalten DNA, die ihre Replikation beendet hat. Der Anteil dieser Abschnitte nimmt im Verlaufe der S-Phase zu (Abb. 8.26 c). G2-Phase-PCCs besitzen wie Prophasechromosomen zwei vollständige Chromatiden ziemlich gleichmäßiger Dichte (Abb. 8.26 d). Sie sind somit für die Mitose vorbereitet.

### *Schwesterstrangaustausch*

In Replikationsstudien wurden regelmäßig Fälle von Schwesterstrangaustausch (SCE, „sister chromatid exchange“) entdeckt. Bei einem SCE werden die Tochter-DNA-Doppelhelices zwischen den Tochterchromatiden ausgetauscht (s. Abb. 8.21). Die SCE-Rate wird durch viele mutagene und carcinogene Agentien wie z. B. UV-Strahlen oder Mitomycin C gesteigert. Auch in DNA-Reparaturdefekten Zellen, z. B. von Patienten mit Bloom-Syndrom, ist die SCE-Rate stark erhöht (s. Abb. 8.21 b).

Die Erhöhung der SCE-Rate wird als sehr empfindlicher Test für mutagene Agentien benutzt. Die SCE-Rate wird nämlich schon bei einer um den Faktor 10–100 geringeren Konzentration von mutagenen Agentien bewirkt, als sie sonst zur Auslösung von Mutationen erforderlich ist. Deswegen bestand auch der Verdacht, daß die mutagene Wirkung von BrdU oder  $^3\text{H}$ -Thymidin, die für den Nachweis notwendig sind, eine Spontanrate vortäuscht, demnach SCEs spontan überhaupt nicht vorkommen. Tatsächlich wirkt sich die Erhöhung der BrdU- oder  $^3\text{H}$ -Thymidindosen in einer Erhöhung der SCE-Rate aus. Bei Verwendung immer geringerer Dosen stellt sich aber eine SCE-Rate ein, die bei noch weiterer Verringerung nicht unterschritten wird. SCEs gibt es offenbar auch ohne äußere mutagene Einflüsse.

Der Mechanismus ist nicht bekannt. Im Gegensatz zur Auslösung anderer Chromosomenaberrationen führen nur DNA-Schäden zu SCEs während der S-Phase. Ursache für ein SCE ist daher ein Ereignis entweder direkt an der Replikationsgabel oder unmittelbar nach der Replikation. Röntgenstrahlen,

die Doppelstrangbrüche und Chromosomenmutationen induzieren, erhöhen die SCE-Rate nur unwesentlich.

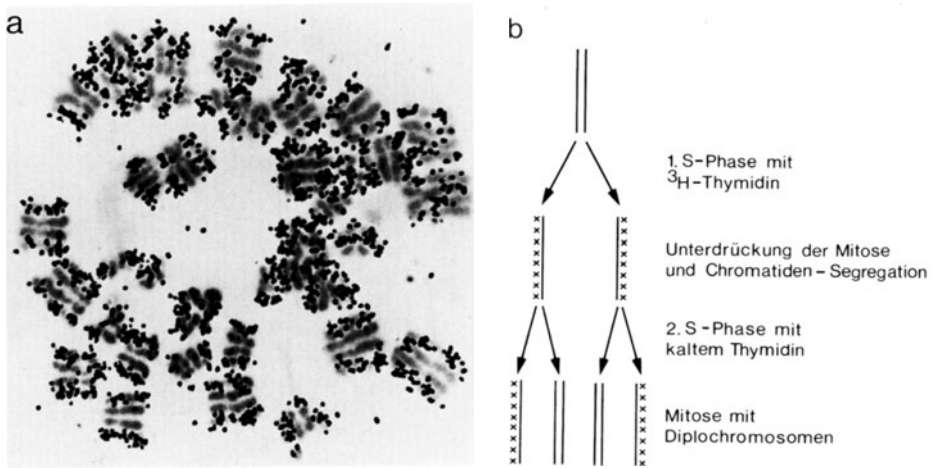
### *Anordnung der Chromatiden*

Die Mitose kann nach einer S-Phase im Zellzyklus spontan ausfallen oder experimentell unterdrückt werden. Bei einer solchen sog. **Endoreduplikation** werden die Chromatiden nicht voneinander getrennt. In der Mitose, die auf die nächste Replikationsrunde folgt, entstehen daher **Diplochromosomen**. Sie bestehen aus vier statt aus zwei zusammenhängenden Chromatiden. Verkleben oder Verketteten der Chromatinschleifen hält die Chromatiden zusammen (Abb. 8.27).

Induziert man in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Thymidin eine Endoreduplikation und untersucht nach der zweiten Replikationsrunde – mit kaltem Thymidin – die entstandenen Diplochromosomen, dann zeigen die vier Chromatiden eine charakteristische Anordnung. Regelmäßig sind die beiden äußeren Chromatiden markiert, während die inneren unmarkiert bleiben (Abb. 8.28). Die DNA-Einzelstränge der Ursprungschromatide sind demnach in die beiden inneren Chromatiden gelangt. Die beiden DNA-Einzelstränge, die in der ersten Runde neugebildet wurden, wurden auf die äußeren Chromatiden verteilt. Der Vorgang der Chromatidenreorganisation läuft im Interphasekern also räumlich geordnet ab.



**Abb. 8.27.** Diplochromosom aus einer HeLa-Zelle. Die Centromere sind deutlich getrennt, die Chromatiden sind an den Chromosomenarmen miteinander verbunden. EM-Aufnahme eines Totalpräparates, Maßstab 1  $\mu\text{m}$ . (Aus Goyanes u. Schwartzman 1981)



**Abb. 8.28 a, b.** Anordnung der Chromatiden in Diplochromosomen. **a** Diplochromosomen einer Fibroblastenzelllinie des Menschen; die äußeren Chromatiden sind in der Autoradiographie markiert. (Schnedl 1967) **b** Anlage des Experiments und Erklärung des Markierungsmusters

## Literatur zu Kapitel 8

- Avivi L, Feldman M (1980) Arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of plants. *Hum Genet* 55:281–295
- Babu KA, Verma RS (1985) Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Intern Rev Cyt* 94:151–176
- Bennet MD (1984) Towards a general model for spatial law and order in nuclear and karyotypic architecture. *Chromosomes Today* 8:190–202
- Cremer T, Baumann H, Nakanishi K, Cremer C (1984) Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-UV-microbeam experiments. *Chromosomes Today* 8:203–212
- Franke WW (1987) Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* 48:3–4
- Gasser SM, Laemmli UK (1987) A glimpse at chromosomal order. *TIG* 3:16–22
- Gerace L, Burke B (1988) Functional organization of the nuclear envelope. *Ann Rev Cell Biol* 4:335–374
- Gollin SM, Wray W, Hanks SK, Hittelman WN, Rao PN (1984) The ultrastructural organization of prematurely condensed chromosomes. *J Cell Sci Suppl* 1:203–221
- Hadjilov AA (1984) *The nucleolus and ribosome biogenesis*. Springer-Verlag, Wien New York
- Hand R (1978) Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell* 15:317–325
- Hochstrasser M, Mathog D, Gruenbaum Y, Saumweber H, Sedat JW (1986) Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 102:112–123
- Huber J, Bourgeois CA (1986) The nuclear skeleton and the spatial arrangement of chromosomes in the interphase nucleus of vertebrate somatic cells. *Hum Genet* 74:1–15
- Izaurralde E, Mirkovitch J, Laemmli UK (1988) Interaction of DNA with nuclear scaffolds in vitro. *J Mol Biol* 200:111–125

- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80:224–234
- Nelson WG, Pienta KJ, Barrack ER, Coffey DS (1986) The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Ann Rev Biophys Chem* 15:457–475
- Newport JW, Forbes DJ (1987) The nucleus: structure, function, and dynamics. *Ann Rev Biochem* 56:535–565
- Newport J, Spann T (1987) Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48:219–230
- Reeder RH (1985) Mechanisms of nucleolar dominance in animals and plants. *J Cell Biol* 101:2013–2016
- Reimer G, Raska T, Tan EM, Scheer U (1987) Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Arch B* 54:131–143
- Sandberg AA (ed) (1982) Sister chromatid exchange. Alan R. Liss, New York
- Scheer U, Dabauvalle M, Merkert H, Benavente R (1988) The nuclear envelope and the organization of the pore complexes. *Cell Biol Intern Reports* 12:669–689
- Schubert J, Rieger R (1981) Sister chromatid exchanges and heterochromatin. *Hum Genet* 57:119–130
- Schwemmler S, Mehnert K, Vogel W (1989) How does inactivation change timing of replication in the human X chromosome? *Hum Genet* 83:26–32
- Sommerville J (1986) Nucleolar structure and ribosome biogenesis. *Trends in Biochem Sciences* 11:438–442
- Sperling K (1982) Cell cycle and chromosome cycle: morphological and functional aspects. In: Rao PN, Johnson RT, Sperling K (eds) *Premature chromosome condensation*. Academic Press, New York, pp 43–78
- Taylor JH (1987) Replication of DNA in eukaryotic chromosomes. In: Hennig W (ed) *Structure and function of eukaryotic chromosomes*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 173–191
- Umek RM, Linskens MHK, Kowalski D, Hubermann JA (1989) New beginnings in studies of eukaryotic DNA replication origins. *Biochim Biophys Acta* 1007:1–14
- Vogel W, Autenrieth M, Mehnert K (1989) Analysis of chromosome replication by a BrdU antibody technique. *Chromosoma* 98:335–341
- Wolff S (ed) (1982) *Sister chromatid exchange*. John Wiley & Sons, New York