
1.1 Grundlagen der molekularen Zellbiologie

MICHAEL BADER

1.1.1. Vom Kern zur Matrix – Aufbau der eukaryotischen Zelle

1.1.1.1 Übersicht

Die Zelle ist die kleinste Organisationseinheit des Lebens. Einfache Lebewesen bestehen aus einer oder mehreren gleichartigen Zellen. Höher entwickelte Organismen setzen sich aus einer Vielzahl von Zellen zusammen, die arbeitsteilig zusammenarbeiten und dadurch neuartige, einzelnen Zellen nicht immanente Funktionen erfüllen.

Alle Zellen haben einen gemeinsamen Grundaufbau. Sie sind von einer Membran umschlossen, die es ihnen ermöglicht, ein chemisch von der Außenwelt völlig unabhängiges Innenmilieu zu erhalten, die aber dennoch offen genug ist, um den notwendigen Stoffaustausch mit der Umwelt zu gestatten. Jede Zelle enthält die Information, aufgeteilt in Gene, die zu ihrer Duplikation notwendig ist, in Form von Desoxyribonukleinsäure (englische Abkürzung: DNA) und alle Faktoren, die nötig sind, diese Gene zu exprimieren, d.h. in Funktion umzusetzen. Die dabei auftretenden grundlegenden Mechanismen des Lebens sind in allen Zellen nahezu identisch. Es gibt allerdings auch wesentliche Unterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen. So sind eukaryotische Zellen bedeutend größer und besitzen im Innern durch Membranen umschlossene Räume, sog. Kompartimente, deren Inhalt sich in Zusammensetzung und Funktion von der sie umgebenden Intrazellularflüssigkeit, dem Zytosol, grundlegend unterscheiden kann (Abb. 1.1.1). Im ersten Teil dieses Kapitels werden diese Strukturkomponenten der Zelle, soweit sie in tierischen Organismen vorkommen, eingehender beschrieben. Zellkompartimente, die nur in pflanzlichen Zellen auftreten, wie Chloroplasten und Vakuolen, sowie der Aufbau der prokaryotischen Zelle bleiben im Rahmen dieses Kapitels unberücksichtigt.

1.1.1.2 Membranen und Rezeptoren

Biologische Membranen bilden die Außenhaut jeder Zelle. Bei eukaryotischen Zellen trennen sie zusätzlich innere Kompartimente vom Zytosol ab. Ihr Aufbau ist im wesentlichen in allen lebenden Organismen identisch. Sie bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine eingelagert sind (Abb. 1.1.2). Das prozentuale Verhältnis Lipid zu Protein ist bei Membranen verschiedener Lokalisation extrem unterschiedlich und kann $<1:4$ oder $>3:1$ betragen. Der Lipidanteil der Membran besteht aus Phospholipiden (Abb. 1.1.3). Diese besitzen einen polaren, hydrophilen Kopf, an den zwei oder vier hydrophobe Fettsäureschwänze gekoppelt sind. Zusätzlich sind an viele Phospholipid- und Proteinmoleküle in der Membran kurzkettige Oligosaccharidreste kovalent gebunden. Die bipolaren Eigenschaften der Phospholipide nötigen sie in wässriger Lösung zur Bildung von Doppelschichten, bei denen sich die hydrophoben Fettsäureschwänze gegenüberstehen und durch die hydrophilen Köpfe von der wässrigen Phase abgeschirmt werden. Dadurch bilden diese Phospholipiddoppelschichten hydrophobe Barrieren, die, wenn sie dreidimensional geschlossen sind, ein wässriges Innen- von einem wässrigen Außenmilieu trennen. In die Membran eingelagert sind Proteinmoleküle, wobei hydrophobe Aminosäurereste die Membran durchspannen und hydrophile Reste innen oder außen aus ihr herausragen. Bei 37°C besitzen Biomembranen eine extrem niedrige Viskosität und damit beinahe die Eigenschaften einer Flüssigkeit. Dadurch ist eine schnelle, zweidimensionale Diffusion von Lipidmolekülen, aber auch von eingelagerten Proteinen innerhalb der Membran möglich.

Der Durchtritt durch die Phospholipiddoppelschichtmembran ist nur kleinen hydrophoben Molekülen, wie z.B. Steroiden, durch Diffusion möglich. Für hydrophile Moleküle stellt sie ein beinahe unüberwindbares Hindernis dar. Da eine lebende Zelle jedoch auf einen regen Stoffaustausch mit ih-

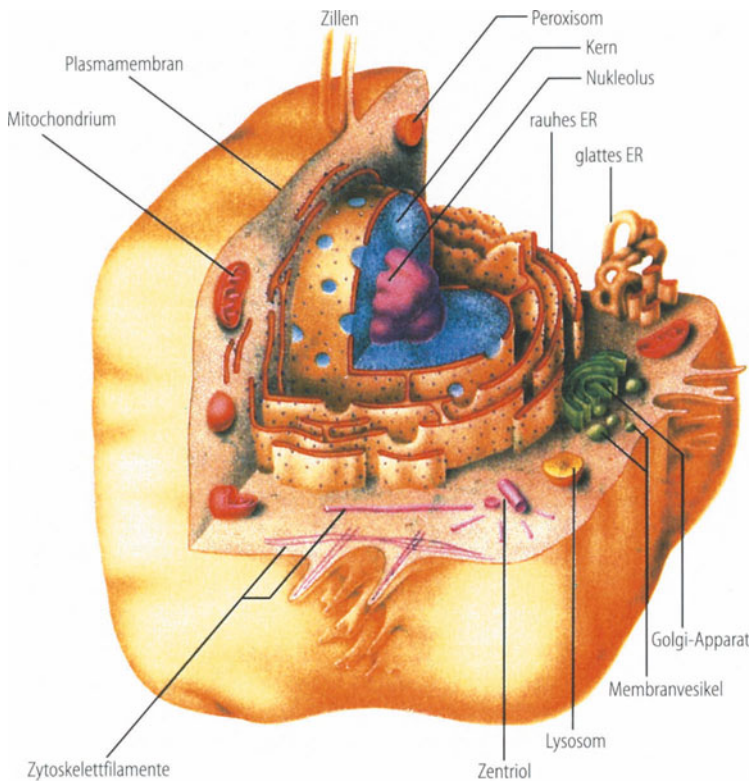


Abb. 1.1.1. Struktur tierischer Zellen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 145

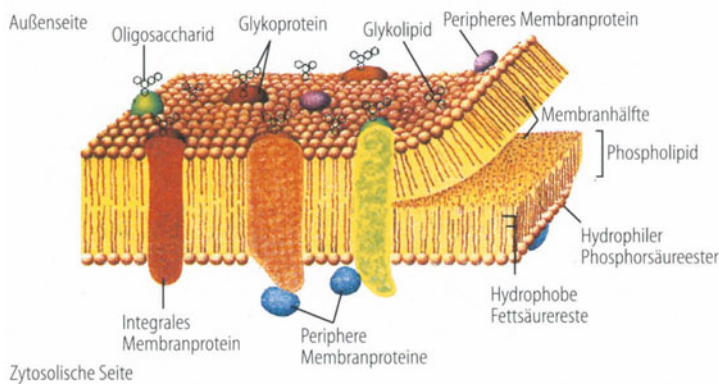


Abb. 1.1.2. Struktur biologischer Membranen. Biologische Membranen bestehen aus einer Doppelschicht von Phospholipiden in die integrale und periphere Membranproteine eingelagert sind, die an der Außenseite oft glykosyliert sind, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 596

rer Umgebung und mit den Innenmilieus ihrer Organellen angewiesen ist und die ausgetauschten Stoffe meist hydrophiler Natur sind, enthalten biologische Membranen Proteine, die als Transporter oder Kanäle dienen (Abb. 1.1.4). Durch Regulation der Aktivität dieser Proteine kann die Zelle den Stoffaustausch gezielt steuern. Membranproteine dienen jedoch nicht nur dem Stoffaustausch, sondern auch der Übertragung von Informationen über die Außenwelt in das Innere der Zelle. Membranständige Rezeptorproteine binden von außen kommende Agonisten, die in mehrzelligen Organismen von anderen Zellen freigesetzt wurden und

als Hormone wirken, oder aus der Außenwelt stammende Substanzen, wie Geruchsstoffe und Photonen (Abb. 1.1.5). Die Bindung führt zur einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die intrazellular zu einer Veränderung der Aktivität desselben Proteins, aber auch anderer interagierender Proteine führen kann. So öffnet z.B. der Azetylcholinrezeptor nach Bindung des Liganden einen intrinsischen Ionenkanal, Rezeptortyrosin- und Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen dimerisieren nach Anlagerung des Hormons und werden dadurch aktiv, und in einigen Rezeptormolekülen werden durch Ligandenbindung Tyrosinphospha-

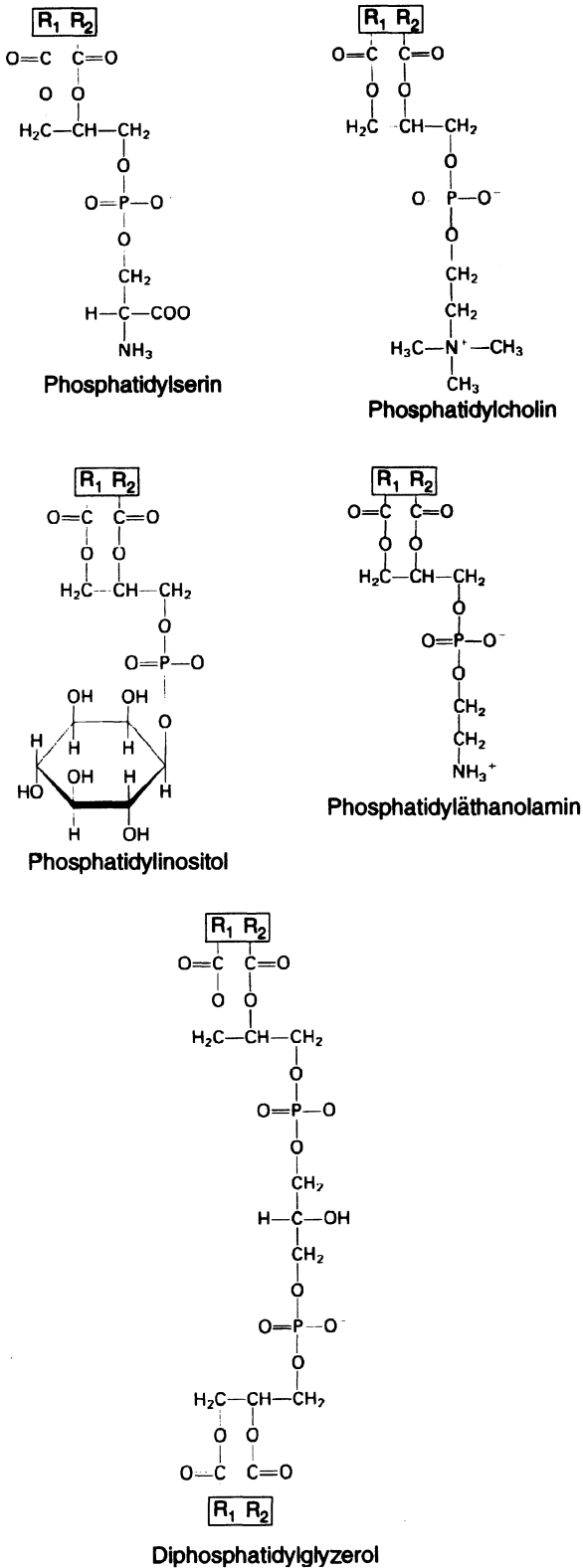


Abb. 1.1.3. Chemischer Aufbau einiger Phospholipide. Phospholipide bestehen aus einem polaren Molekül, an das 2 oder 4 Fettsäurereste (R) gebunden sind, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 597

tase- oder Guanylatzyklaseaktivität angeschaltet, wobei letztere GTP zum Second messenger cGMP zirkularisiert. Durch andere Rezeptorklassen aktivierte Proteine umfassen ebenfalls Tyrosinkinasen, aber auch G-Proteine. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (α , β , γ) und sind im inaktiven Zustand mit GDP beladen. Nach Aktivierung durch den Rezeptor einer Klasse, deren Merkmal eine 7mal die Membran durchspannende Polypeptidkette ist, wird GDP durch GTP ausgetauscht und die aktive α -Untereinheit wird frei. Je nach Art des G-Proteins aktiviert oder inaktiviert sie Enzyme, wie die Adenylatzyklase, die aus ATP den Second messenger cAMP herstellt, oder die Phospholipase C, die ein Membranlipid in zwei ebenfalls als Second messenger agierende Moleküle, das Diacylglycerol (DAG) und das Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3), spaltet. Die Second messenger wiederum können direkt die Genexpression beeinflussen, wie cAMP, andere Second messenger regulieren, wie IP_3 , das Kalziumionen aus intrazellulären Speichern freisetzt, oder Phosphorylierungskaskaden auslösen, wie DAG, das die Proteinkinase C zusammen mit Kalziumionen aktivieren kann. Die meisten dieser Prozesse münden in Phosphorylierungskaskaden, die manchmal über viele Zwischenschritte metabolische Funktionen, die Genexpression und den Proliferationszustand der Zelle steuern.

Neben den membranständigen Rezeptoren existieren auch zytosolische Rezeptorproteine, die leicht die Membran durchdringende Moleküle, wie Steroidhormone, binden und dadurch eine andere Konformation einnehmen, in der sie die Genexpression der Zelle direkt beeinflussen können.

1.1.1.3 Zellkern

Der Zellkern oder Nukleus ist die Steuerzentrale der Zelle. Deshalb besitzt jede Zelle auch nur einen Kern mit Ausnahme einiger Zelltypen, wie Skelettmuskelzellen, die durch die Fusion mehrerer Zellen entstanden sind. Der Kern wird von zwei Membranschichten umschlossen, die die perinukleäre Zisterne umschließen (Abb. 1.1.1). Das Lumen dieses Zwischenraums steht mit dem Lumen des endoplasmatischen Retikulums in Verbindung. Einige 1000 Kernporenkomplexe, die beide Membranen durchspannen, regeln den Austausch auch von sehr großen Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Innern des Kerns, dem Nukleoplasma (Abb. 1.1.6). Der Kern enthält eine von Spezies zu Spezies unterschiedliche Anzahl von Chromosomen, die jeweils aus einem DNA-Mole-

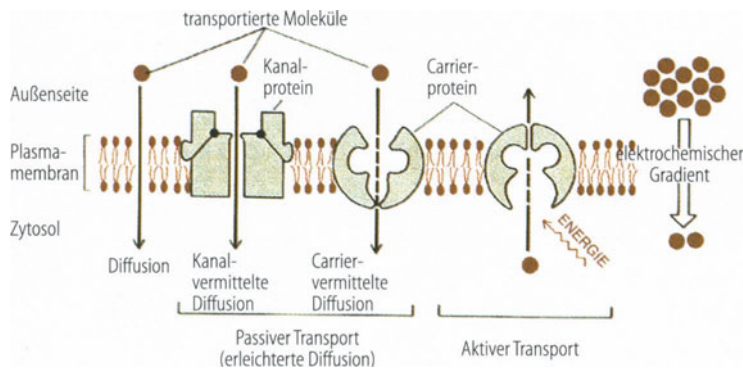


Abb. 1.1.4. Klassen von Kanälen und Transportern. Kanäle öffnen Tunnel durch die Plasmamembran, die spezifische Moleküle durchlassen. Carrier binden Moleküle auf der Außenseite, ändern ihre Konformation und entlassen das Molekül ins Zellinnere. Manche Carrier benötigen dazu Energie, die entweder aus ATP oder aus dem elektrochemischen Gradienten über die Membran stammt, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990]

kül und daran assoziierten Proteinen bestehen. Dort finden alle enzymatischen Reaktionen statt, die zur Expression, Erhaltung und Vervielfältigung der genetischen Information auf den Chromosomen nötig sind. Da es sich bei all diesen Prozessen um sehr komplizierte Vorgänge handelt, an denen viele, verschiedene Komponenten beteiligt sind, ist jeder einzelne von ihnen auf bestimmte Bereiche des Kerns beschränkt, an denen die involvierten Proteine und Nukleinsäuren konzentriert werden. Solche Regionen, in denen Ribosomen produziert werden, sind ohne spezielle Markierung im Lichtmikroskop erkennbar und werden Nukleoli genannt. Diese intranukleäre Organisation wird durch ein Netzwerk von Proteinfibrillen ermöglicht, der nukleären Matrix. Dazu gehört auch die die Kernmembran stabilisierende Außenhülle, ein Netzwerk aus Laminen (Tabelle 1.1.1), welches über spezifische membranständige Rezeptoren mit der inneren Kernmembran verbunden ist (Abb. 1.1.6).

1.1.1.4 Mitochondrien

Mitochondrien sind die Kraftwerke der Zelle, von denen sie etwa 1000 besitzt. Wie der Kern sind sie von einer doppelten Membran umgeben, die eine Zwischenschicht einschließt, den Intermembranraum (Abb. 1.1.7). Innerhalb der stark gefalteten, inneren Membran befindet sich die mitochondriale Matrix, die ebenfalls DNA und alle zur Genexpression notwendigen Elemente enthält. Diese ähneln jedoch stärker den Bestandteilen prokaryotischer Zellen als den funktionsgleichen Komponenten im Kern und Zytoplasma der gleichen Zelle. Auf dieser überraschenden Entdeckung beruht die Endosymbiontentheorie, die besagt, daß Mitochondrien, wie auch die pflanzlichen Chloroplasten, während der Evolution in eukaryotische Zel-

len eingewanderte Bakterien darstellen. Diese haben ihre Selbständigkeit im weiteren Verlauf der Entwicklung verloren, so daß nur noch ca. 10 Proteine im eigenen Genom kodiert sind; alle anderen werden von der Gastgeberzelle zur Verfügung gestellt. Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die oxidative Phosphorylierung von Zucker- und Lipidmolekülen, bei der ATP erzeugt wird, das für praktisch alle Stoffwechselfvorgänge der Zelle notwendig ist.

1.1.1.5 Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Netzwerk von miteinander verbundenen, geschlossenen Membranvesikeln. Aufgrund lichtmikroskopischer Beobachtungen unterscheidet man glattes und rauhes ER. In den meisten Zellen überwiegt das rauhe ER, dessen zum Zytoplasma gewandte Membranseite mit Ribosomen bedeckt ist (Abb. 1.1.8). An diesen Ribosomen werden Proteine synthetisiert, die entweder in die Membran eingebaut oder durch sie hindurch transportiert und später aus der Zelle sezerniert werden sollen. Da die Synthese und initiale Modifikation derartiger Proteine die Hauptaufgabe des rauhen ER ist, besteht ein Großteil des Zellvolumens sekretorischer Zellen aus diesen Vesikeln. Das glatte ER ist nicht von Ribosomen besetzt und dient der Synthese von Fettsäuren und Phospholipiden. Die meisten Zellen haben nur wenig glattes ER, mit Ausnahme von Leberzellen, in denen es zusätzlich zur Entgiftung von in den Körper gelangten Fremdstoffen genutzt wird.

1.1.1.6 Golgi-Apparat

Golgi-Apparate sind Stapel von flachen Membranvesikeln, die sich in drei Regionen unterteilen las-

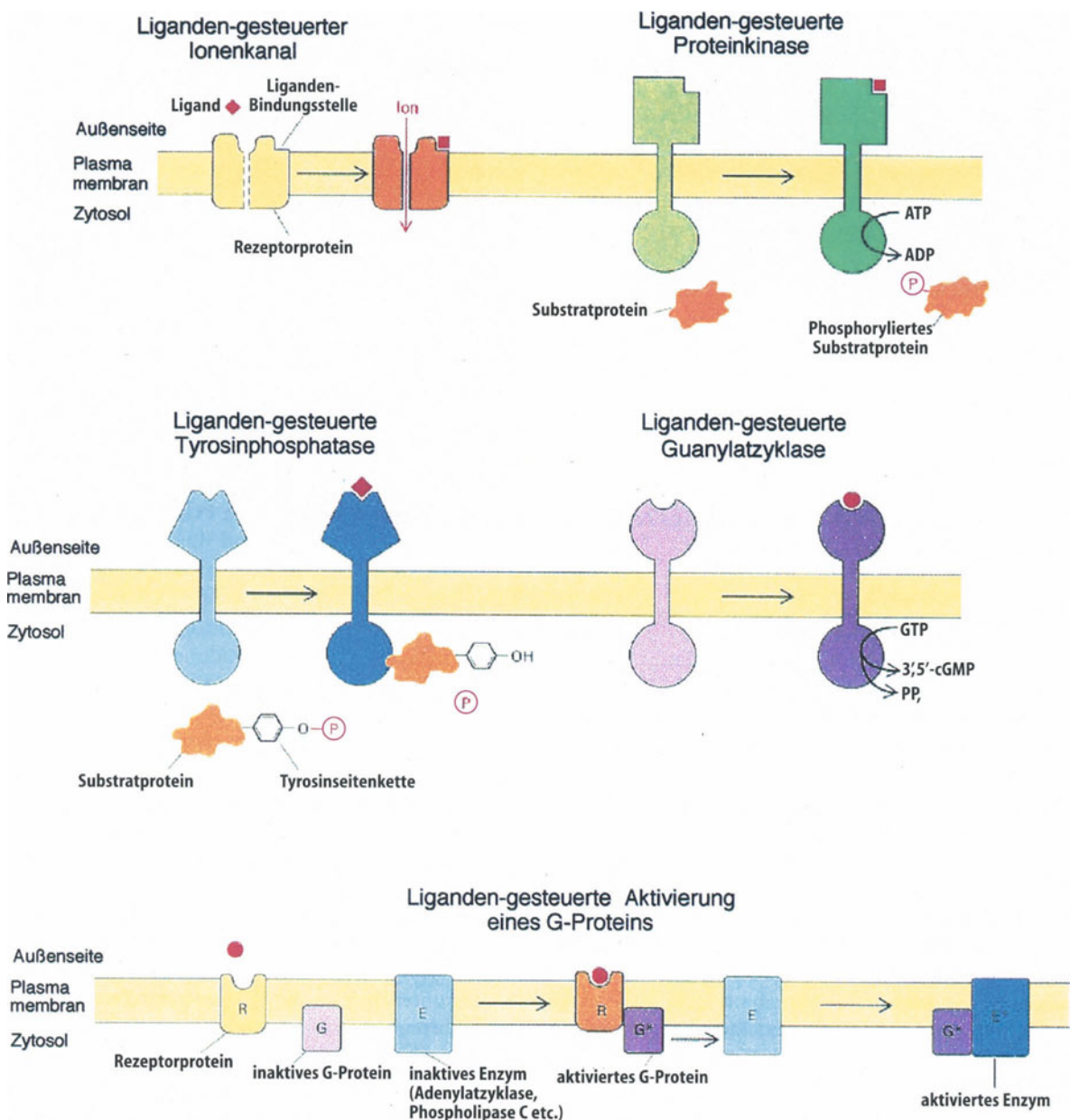


Abb. 1.1.5. Klassen von Rezeptoren mit ihren Second messengers. Nach Bindung des Liganden aktivieren verschiedene Rezeptorklassen unterschiedliche Signalsysteme: Sie öffnen Ionenkanäle, phosphorylieren oder dephosphorylieren andere Proteine an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten, zykli-

sieren GTP zu cGMP oder aktivieren G-Proteine, die ihrerseits die gleichen und andere Second messenger beeinflussen können, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990]

sen (Abb. 1.1.8, 1.1.9). In der Cis-Region fusionieren vom rauhen ER abgeschnürte Vesikel, deren Inhalt, frisch synthetisierte Proteine, in der mittleren (medialen) Region weiter modifiziert wird, bevor er in der Trans-Region in neue, sog. Trans-Golgi-Vesikel verpackt und weitertransportiert

wird. Im Golgi-Apparat wird, wie in einem Postverteiler, festgelegt, wohin ein bestimmtes Protein transportiert wird. Durch Fusion des Trans-Golgi-Vesikels mit anderen Membranen wird das Protein entweder durch Exozytose zur Außenseite der Zelle oder ins Innere anderer Organellen geschleust.

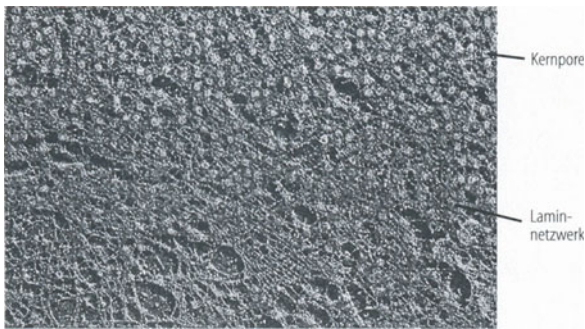


Abb. 1.1.6. Elektronenmikroskopische Innenansicht der inneren Kernmembran mit Kernporenkomplexen und dem Laminnetzwerk, wiedergegeben mit Genehmigung aus Aebi et al. [1986]

1.1.1.7 Lysosomen

Primäre Lysosomen sind spezialisierte Trans-Golgi-Vesikel, in denen eine hohe Konzentration abbauender Enzyme gefunden wird (Abb. 1.1.10). Sie verschmelzen mit ausgedienten Organellen oder mit endozytotischen Vesikeln, die durch Einwölbung und Abschnürung der Plasmamembran Stoffe aus der Außenwelt in die Zelle transportieren. In den Fusionsprodukten, den sekundären Lysosomen, herrscht ein pH-Wert unter 5, bei dem die meisten Proteine denaturieren und damit leichter von den säurestabilen lysosomalen Enzymen abgebaut werden können. Diese Enzyme sind in ihrer Aktivität vom sauren Milieu abhängig, so daß bei der Freisetzung des vollständig verdauten Inhalts der Lysosomen ins pH-neutrale Zytoplasma der Zelle kein Schaden durch sie entstehen kann. Lysosomen stellen also die Verdauungsorgane einer Zelle dar.

1.1.1.8 Peroxisomen

Peroxisomen ähneln in ihrer Struktur Lysosomen, enthalten aber eine völlig andere Zusammensetzung von Enzymen (Abb. 1.1.11). Hauptkomponenten peroxisomaler Enzyme sind die Katalase, die Wasserstoffperoxyd abbaut, sowie Enzyme, die zum Abbau von langkettigen Fettsäuren genutzt werden. Die Proteine in Peroxisomen werden jedoch nicht durch Trans-Golgi-Vesikel zugestellt, sondern im Zytoplasma synthetisiert und durch die Membran der Peroxisomen importiert.

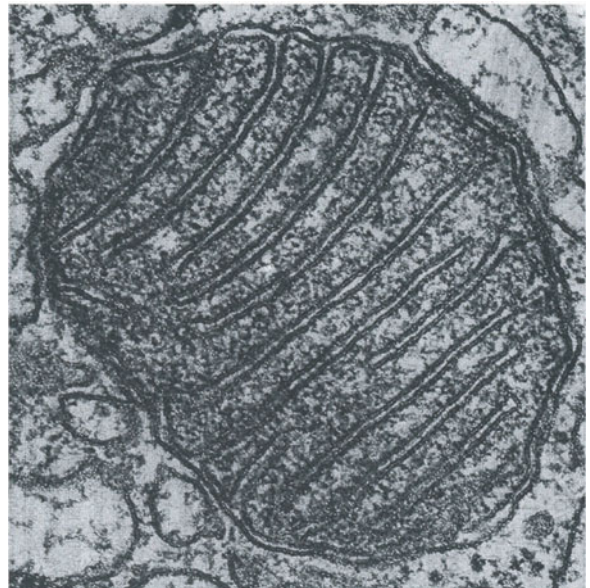


Abb. 1.1.7. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch ein Leberzellmitochondrium, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 407

1.1.1.9 Zytosol und Zytoskelett

Das Zytosol ist die flüssige Phase, die im Zellinneren die Organelle umgibt. Der größte Teil des Stoffwechsels der Zelle findet in diesem Kompartiment statt, u.a. die Synthese von Proteinen, die nicht durch eine Membran geschleust werden sollen. In spezialisierten Zelltypen dient es auch als Speicher für energiegeladene Moleküle wie Glykogen oder Fett. Das Zytosol ist jedoch keine homogene Lösung, wie das ursprünglich angenommen wurde, sondern wird von einem hochgradig vernetzten Gerüst von Proteinfasern verschiedener Dicke und Zusammensetzung, dem Zytoskelett, durchzogen (Abb. 1.1.12). Vermutlich sind die meisten Organellen, Enzymkomplexe und Ribosomen an dieses Netz gebunden. Dadurch kann die Zelle metabolische Aktivitäten in definierten Bereichen konzentrieren, wodurch sich sowohl Diffusionszeiten verkürzen und damit die Produktivität erhöhen lassen als auch eine lokale Anhäufung des Reaktionsprodukts möglich wird. Das Zytoskelett besteht aus drei Klassen von Proteinfilamenten: Aktinmikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente.

1.1.1.9.1 Aktinmikrofilamente

Aktin ist das häufigste Protein einer eukaryoten Zelle und kann bis zu 10% des Proteins in Muskel-

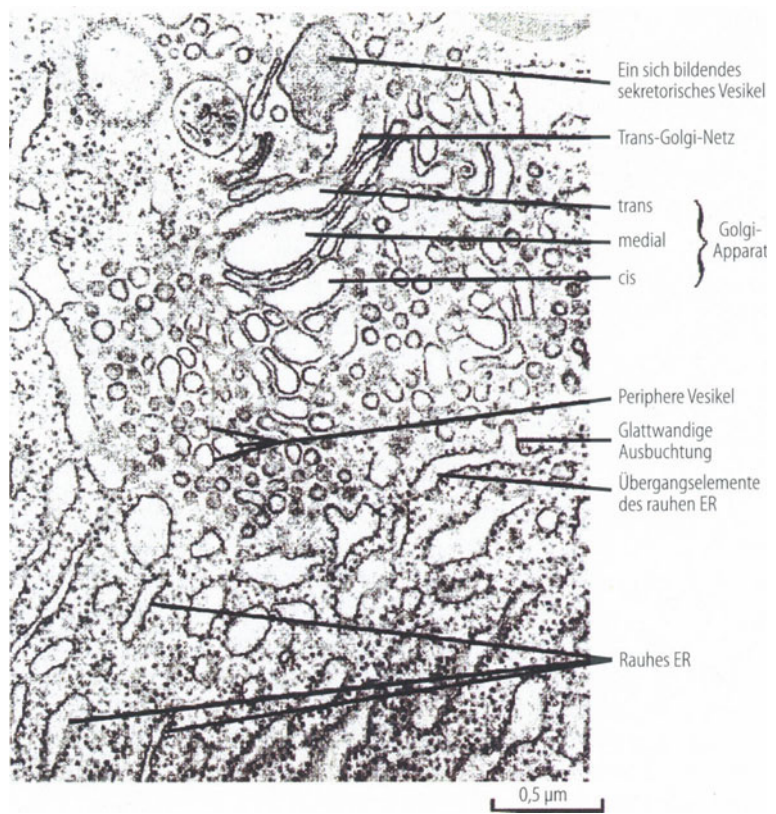


Abb. 1.1.8. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch eine sekretorische Zelle des Pankreas mit rauhem ER und Golgi-Apparaten. Vesikel schnüren sich als glatte Ausbuchtung vom rauhen ER ab und verschmelzen mit dem Cis-Golgi-Apparat, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 758

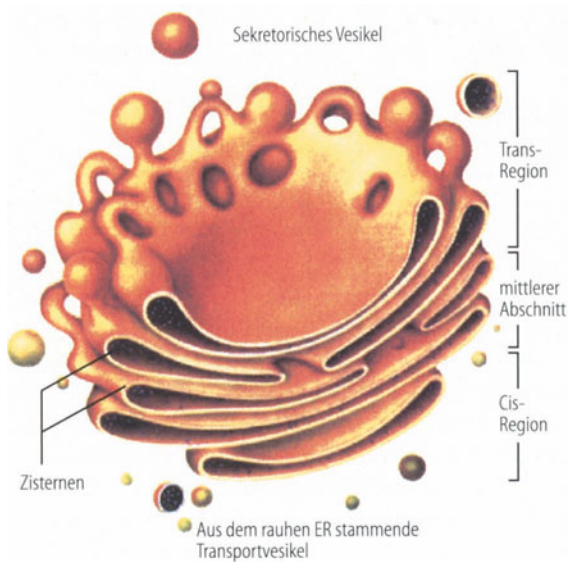


Abb. 1.1.9. Schematische Darstellung eines Golgi-Apparats. Der Golgi-Apparat ist ein dynamisches Gebilde aus Membranstapeln, in dessen Cis-Region Vesikel aus dem rER fusionieren und in dessen Trans-Region Vesikel mit unterschiedlichem Bestimmungsort abgegeben werden, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 166

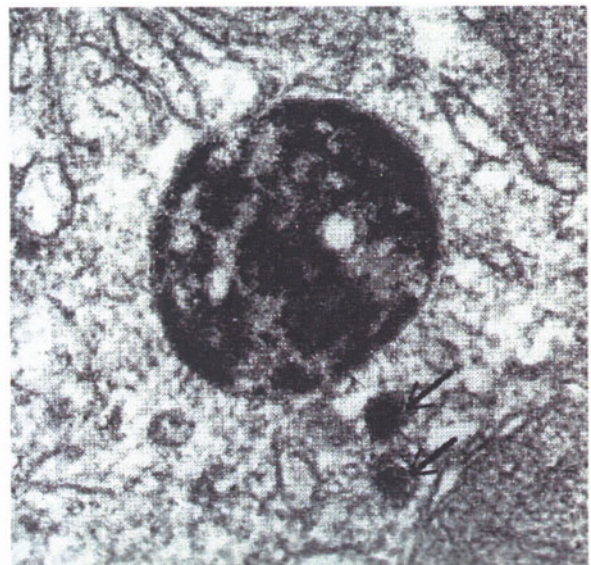


Abb. 1.1.10. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch ein Lysosom, gefärbt für das Markerenzym Saure Phosphatase. Die Pfeile markieren Vesikel, die neusynthetisierte Enzyme aus dem Trans-Golgi-Apparat zum Lysosom transportieren, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 544

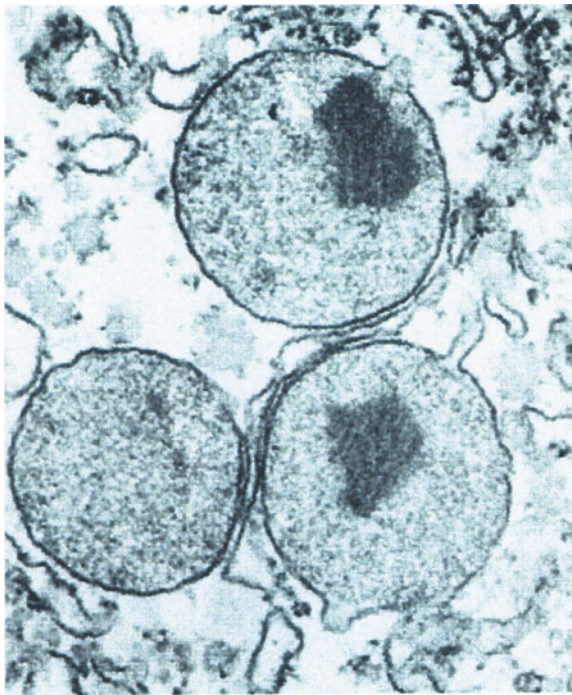


Abb. 1.1.11. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnitts durch drei Leberperoxisomen. Die eingeschlossenen kristallartigen Strukturen bestehen aus Uratoxidase, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 511

zellen und 5% in Nichtmuskelzellen ausmachen. Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus globulären G-Aktin-Untereinheiten, die in Selbstorganisation helikal polymerisiert sind (Abb. 1.1.13). Aktinfilamente sind durch quer vernetzende Proteine miteinander verbunden und bilden Bündel oder netzwerkartige Strukturen. Über weitere assoziierte Proteine sind sie an der Plasmamembran verankert und bestimmen dadurch die Form der Zelle. Die Zelle kann die Mikrofilamente gezielt auf- oder abbauen und dadurch Zytoplasmaausläufer vorschieben oder zurückziehen. Aktin bildet nicht nur die Grundlage für diese sehr einfachen Bewegungsvorgänge, sondern ist auch eine der Komponenten eines viel effizienteren, Mobilität erzeugenden Apparats der Zelle. Die eigentlich aktive, einem Motor ähnelnde Komponente ist das Myosin, dessen aus einer schweren und mehreren leichten Untereinheiten bestehenden Filamente mit Hilfe der aus ATP gewonnenen Energie an Aktinfilamenten entlanggleiten können. In den auf Kontraktion spezialisierten Muskelzellen liegen Aktin- und Myosinfilamente in parallelen Bündeln vor, deren koordiniertes Ineinandergleiten zur Kontraktion des Muskels führt. Die Erhöhung der in-

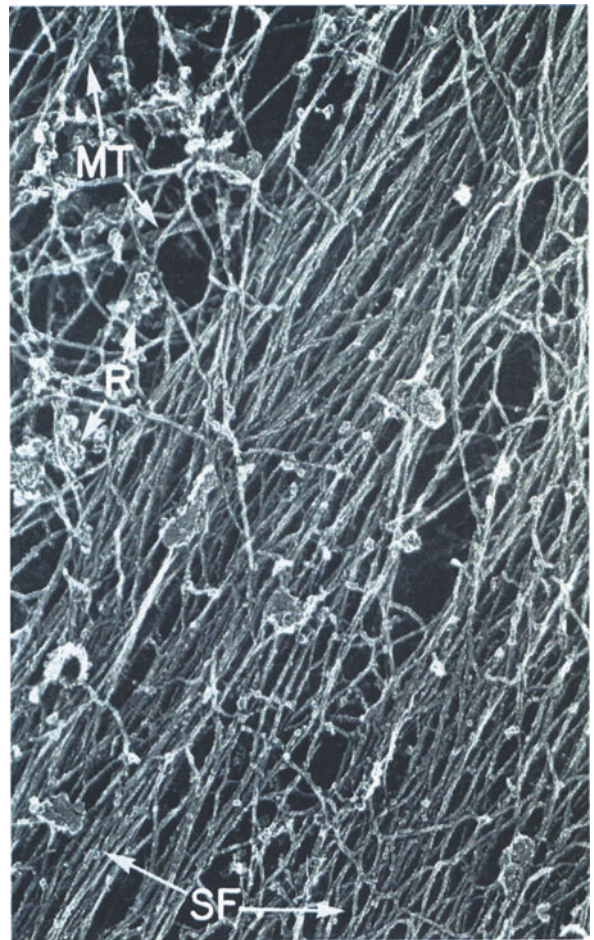


Abb. 1.1.12. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gefrierätzpräparats des Fibroblastenzytoskeletts mit Aktinfilamentbündeln (stress fibers, SF), Mikrotubuli (MT) und dem dazwischenliegenden Netzwerk von Intermediärfilamenten, an die Polyribosomen (R) angelagert sind, wiedergegeben mit Genehmigung aus Heuser u. Kirschner [1980]

trazellularen Kalziumkonzentration ist der Auslöser für die Kontraktion. Mit dem Aktomyosinkomplex assoziierte Proteine, wie Tropomyosin und Troponin im Skelettmuskel oder Caldesmon und Calponin, sowie die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins im glatten Muskel regulieren diesen Vorgang.

1.1.1.9.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind die Zelle durchspannende Röhren, die von einem Mikrotubulusorganisationszentrum aus durch Anlagerung von Tubulinmolekülen helikal wachsen. Tubulin, ein Dimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, lagert sich dabei in Selbstorganisation unter Bindung und Spaltung

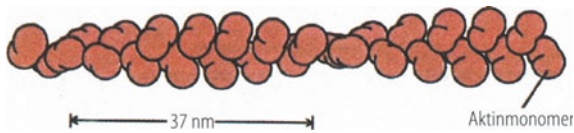


Abb. 1.1.13. Schematische Darstellung von F-Aktin mit einzelnen G-Aktin-Monomeren, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 738

von GTP an den wachsenden Mikrotubulus an (Abb. 1.1.14). Die Zelle nutzt diese Strukturen als Halteseile, an denen entlang Organellen oder kleinere Partikel mit Hilfe von Motorproteinen, wie Kinesin oder Dynein, unter ATP-Spaltung bewegt werden können. Darüber hinaus bilden Mikrotubuli Flagellen oder Zilien, die der Fortbewegung der Zelle dienen. Dabei lagern sich 9 Mikrotubulipaare zu einer größeren Röhre zusammen, die zwei einzelne Mikrotubuli im Zentrum umschließt (Abb. 1.1.15). Flagellares Dynein erlaubt das Aneinanderentlanggleiten der Mikrotubulipaare in der Außenwand, was zur Krümmung der Flagelle führt und bei entsprechender Koordination und Geschwindigkeit zum Zilienschlag, der die Zelle fortbewegen kann. Während der Zellteilung binden Mikrotubuli die Chromosomen und ziehen sie, indem sie sich durch Depolymerisation verkürzen, in die beiden noch verbundenen Tochterzellen (Abb. 1.1.16). Auch hier gehen die Mikrotubuli vom Mikrotubulusorganisationszentrum aus, das in dieser Situation Zentriol (Abb. 1.1.1) genannt wird und sich bereits sehr früh während der Zellteilung reproduziert und auf die beiden zukünftigen Tochterzellen aufgeteilt hat. Die beiden Zentriolen unterstützen die Bewegung der Chromosomen, indem sich von ihnen ausgehende Mikrotubuli in der Mitte der sich teilenden Zelle aneinanderlagern und sie unter Zuhilfenahme von Kinesin-ähnlichen Motorproteinen auseinanderschieben.

1.1.1.9.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind im Gegensatz zu den dynamisch strukturierten Mikrofilamenten und Mikrotubuli eher statische Gebilde und bilden das stabile Grundgerüst des Zytoskeletts. Die Proteinbausteine unterscheiden sich von Zelltyp zu Zelltyp, und es konnten bisher mehr als 50 verschiedene Proteine in 5 Klassen unterschieden werden (Tabelle 1.1.1). Es sind α -helikale Stäbchen, von denen sich je zwei zu einer Superhelix umeinanderwinden. Durch weiteres Aneinanderlagern dieser Dimere bilden sich Protofilamente, die sich

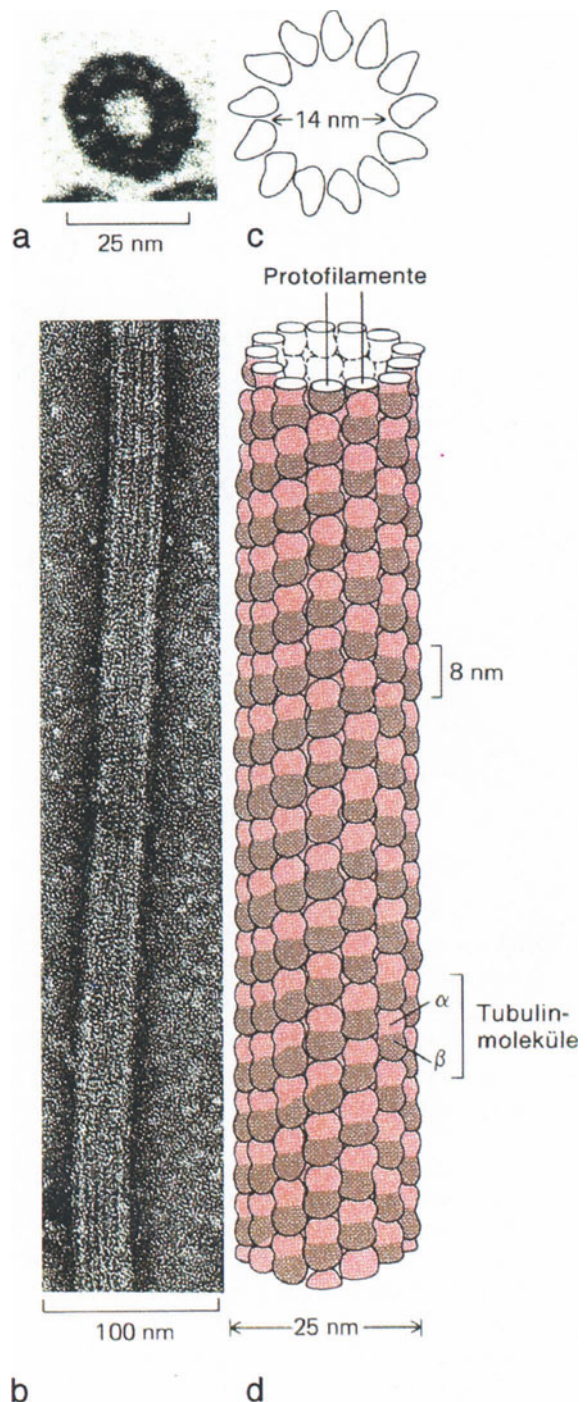


Abb. 1.1.14 a-d. Aufbau der Mikrotubuli in elektronenmikroskopischen Aufnahmen und schematisch im Querschnitt (a, c) und in der Aufsicht (b, d). Mikrotubuli bestehen aus Tubulin- α - β -Dimeren, die einen Hohlzylinder ausbilden, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 772

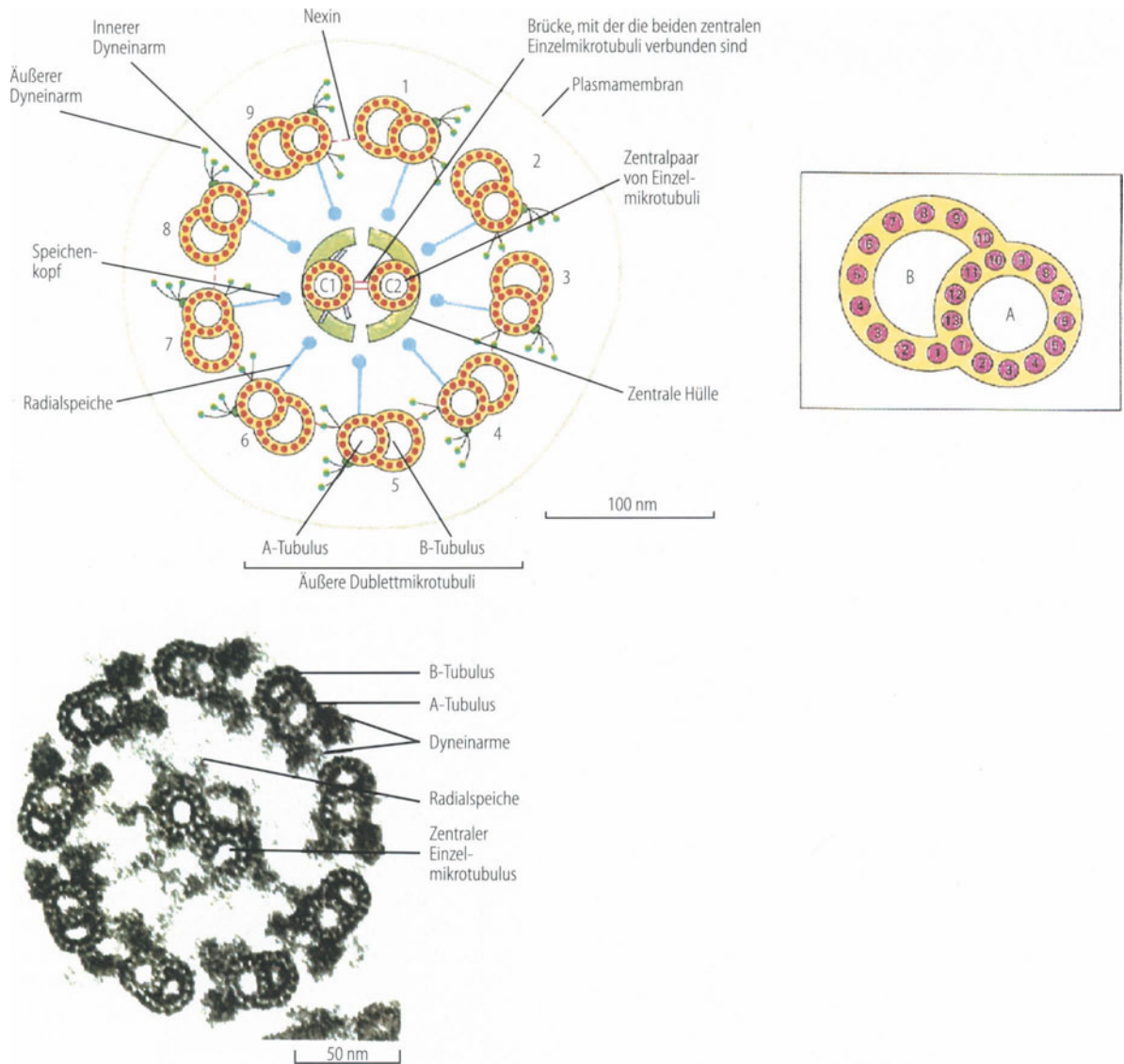


Abb. 1.1.15. Aufbau einer Zilie schematisch (oben links) und in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (unten). 23 Tubulinmoleküle (oben rechts) liegen im Querschnitt der 9 Doppelringe, die die beiden Zentralmikrotubuli umgeben.

Dyneine erzeugen die Bewegung und Nexin vernetzt benachbarte Doppelmikrotubuli elastisch, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 958

wiederrum zylinderförmig anordnen und damit das Intermediärfilament bilden (Abb. 1.1.17). Die ansonsten gewünschte Stabilität der Intermediärfilamente ist in bestimmten Situationen, wie bei der Zellteilung oder der Fortbewegung, für die Zelle störend. In diesen Fällen kann die Zelle das Fasergerüst durch Phosphorylierung der Intermediärfilamentproteine auflösen, wie es z.B. während der Mitose mit den im Kern lokalisierten Laminen erfolgt.

1.1.1.10 Extrazelluläre Matrix und Zell-Zell-Kontakte

In multizellularen Organismen bilden Zellen Verbände, die als Gewebe oder Organe spezifische Funktionen übernehmen. Diese Zellverbände werden durch Proteine und Polysaccharide zusammengehalten, die von den Zellen sezerniert werden. Dabei hängt die Art der Matrixmoleküle vom Zelltyp und Organ ab.

Tabelle 1.1.1. Intermediärfilamentproteine

Protein	MG×10 ³	Anzahl der Polypeptide	Gewebe-expression
Typ I			
Saure Keratine	40–57	>15	Epithelien
Typ II			
Basische Keratine	53–67	>15	Epithelien
Typ III			
Desmin	53	1	Muskel
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	50	1	Astrozyten
Vimentin	57	1	Mesenchym
Peripherin	57	1	Neuronen
Typ IV (Neurofilamentprotein)			
NF-L	62	1	Neuronen
NF-M	102	1	Neuronen
NF-H	110	1	Neuronen
Internexin	66	1	Embryonales Nervensystem
Typ V (Lamine)			
Lamin A	70	1	Alle Zellen (Kernmatrix)
Lamin B	67	1	Alle Zellen (Kernmatrix)
Lamin C	67	1	Alle Zellen (Kernmatrix)

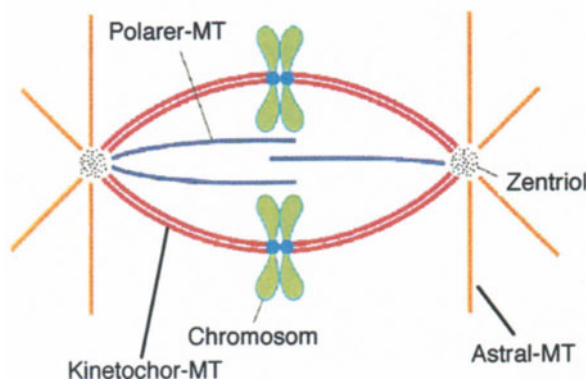


Abb. 1.1.16. Anordnung der Mikrotubuli bei der Mitose. Kinetochormikrotubuli binden direkt an die Chromosomen und polare Mikrotubuli verbinden beide Zentriolen und drücken sie auseinander, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1093

1.1.1.10.1 Kollagene und Proteoglykane

Die Hauptklasse dieser extrazellulären Matrixproteine sind die Kollagene. Im ER bildet sich aus drei neu synthetisierten Kollagensträngen die typische Tripelhelixstruktur dieser Proteinklasse. Nach der Sekretion lagern sich diese Tripelhelices zu

übergeordneten Strukturen in Kollagenfibrillen zusammen (Abb. 1.1.18). Sie sind der Hauptbestandteil des Bindegewebes von Haut, Knorpel, Sehnen, Knochen und Muskeln. Daneben findet man im Knorpelgewebe eine weitere Klasse von extrazellulären Matrixmolekülen, die Proteoglykane (Abb. 1.1.19). Sie bestehen aus langkettigen Polysaccharidmolekülen, wie Hyaluronsäure, Heparin und Chondroitinsulfaten, die oft über Polypeptidketten mit der Plasmamembran der in die Matrix eingebetteten Zellen verankert sind. Proteoglykanmatrices schwellen durch die Aufnahme von Wasser zu einem Vielfachen ihres Trockenvolumens an und erzeugen dadurch einen Innendruck im Gewebe, der Druck von außen abfedern kann. Darüber hinaus binden Proteoglykane Wachstumsfaktoren und modulieren deren Wirkung auf die Zellen.

1.1.1.10.2 Basallamina und Integrine

Laminin bildet mit Nidogen, Kollagen und Proteoglykanen die Basallamina, die sich epitheliale Zellen, wie die Endothelzellen der Blutgefäße, selbst als stabilisierende Grundlage synthetisieren (Abb. 1.1.20, 1.1.21). Fibronectin ist wie Laminin ein hochmolekulares Glykoprotein, das durch multiple Bindestellen Zellen mit verschiedensten extrazellulären Matrices verbinden kann. Dabei bindet es über die Tripeptidsequenz Arginin-Glyzin-Asparaginsäure (RGD) an Integrine (Abb. 1.1.22). Es handelt sich dabei um in der Plasmamembran verankerte Proteine, die aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, α und β , bestehen. Da es von beiden Untereinheiten mehrere Subtypen gibt, können neben Fibronectin auch andere Matrixmoleküle gebunden werden. Die Zelle kann also durch die Art der von ihr exprimierten Integrinheterodimere ihre Interaktion mit der extrazellulären Matrix steuern. Mehrere Integrinmoleküle werden an Stellen enger Zell-Matrix-Kontakte zu Focal adhesions zusammengefaßt, an die über vermittelnde Proteine (Talin, Vinculin und α -Actinin) das Aktinzytoskelett bindet (Abb. 1.1.23). Nach Bindung des Liganden vollziehen die Integrine eine Konformationsänderung, die, u. a. über die Aktivierung der Focal-adhesion-Kinase (FAK), intrazellulär zur Phosphorylierung von Proteinen und damit zu Veränderungen im Zellmetabolismus und in der Genexpression führt.

1.1.1.10.3 Zelladhäsionsmoleküle

Die Erkennung und Bindung der Nachbarzelle gelingt einer Zelle durch eine weitere Klasse von Ma-

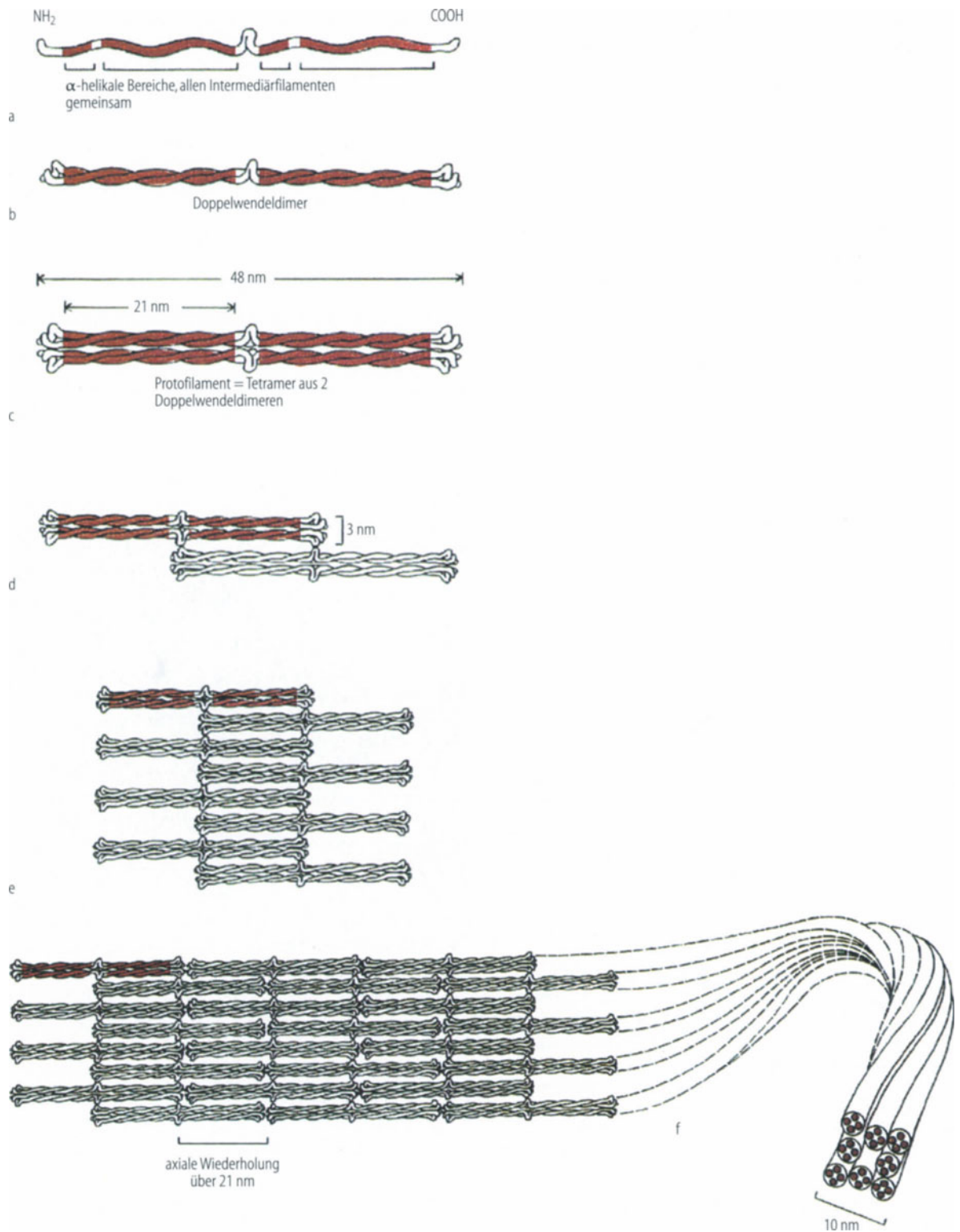


Abb. 1.1.17a–f. Schematischer Aufbau der Intermediärfilamente. Zwei Monomere (a) lagern sich zu einer Doppelhelix (b) zusammen, von denen wieder zwei ein Protofilament bilden (c). Protofilamente interagieren zu immer größeren

Strukturen (d, e), bis das seilähnliche Filament entsteht (f), wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 792

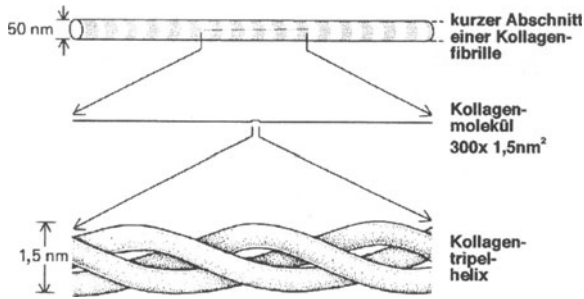


Abb. 1.1.18. Schematischer Aufbau einer Kollagenfibrille aus tripelhelikalen Kollagenmolekülen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 127

trixproteinen, die Zelladhäsionsproteine, die, wie die Integrine, in der Membran verankert sind und Signaltransduktionswege in der Zelle aktivieren können. Sie sind verantwortlich dafür, daß sich gleichartige Zellen erkennen und Verbände bilden können. Jeder Zelltyp exprimiert also unterschiedliche Zelladhäsionsmoleküle, die sich in drei Hauptklassen aufteilen lassen, die Cadherine, die Selektine und die Gruppe der Immunglobulinähnlichen (Abb. 1.1.24).

1.1.1.10.4 Desmosomen

Eine weitere Klasse von Proteinen bindet Zellen noch enger und fester aneinander, wie z.B. die Desmogleine in den Desmosomen, die wie Klebepunkte die Plasmamembranen zweier Nachbarzellen zusammenhalten (Abb. 1.1.25). Die Desmosomen sind innerhalb der Zelle durch Keratinfilamente miteinander verbunden, die über Desmoplakin oder Plakoglobin den intrazellularen Teil des Desmogleins binden. Diese Konstruktion findet man hauptsächlich in epithelialen Zellen und in Zellen der glatten und kardialen Muskulatur, in denen sie zur Stabilisierung des Zellverbands entscheidend beiträgt.

1.1.1.10.5 Tight Junctions

Epitheliale Zellverbände bilden zusätzlich eine weitere Zell-Zell-Kontakt-Struktur aus, wenn sie den Stofftransport an ihnen vorbei verhindern sollen, die Tight junctions (Abb. 1.1.26). Dabei bilden die Zellen eine flächendeckende Lage aus, bei der sämtliche Zellzwischenräume durch einen Gürtel von Tight junctions um jede Zelle versiegelt werden. Hauptprotein der Tight junctions ist das Okkludin, das über andere Proteine intrazellulär an Zytoskelettstrukturen wie die Aktinfilamente gebunden ist.

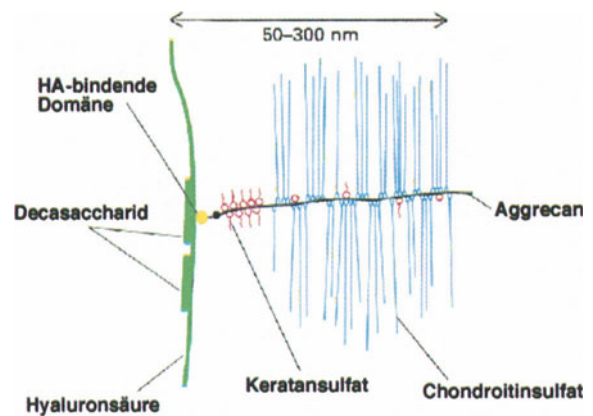


Abb. 1.1.19. Schematischer Aufbau eines Proteoglykans aus dem Aggrecan-core-Protein, Keratansulfat- und Chondroitinsulfatmolekülen und Hyaluronsäure (HA), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1141



Abb. 1.1.20. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Basallamina (BL) mit aufsitzenden Epithelzellen (E) und darunterliegenden Kollagenfibrillen (C), wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 976

1.1.1.10.6 Gap Junctions

Einen noch engeren Kontakt mit der Nachbarzelle, der sogar einen Stoffaustausch ermöglicht, kann die Zelle durch Gap junctions aufbauen. Sie bestehen aus je einem Membran-durchspannenden Zylinder aus 6 Connexinpolypeptidketten in beiden Nachbarzellen, die miteinander eine Röhre bilden (Abb. 1.1.27). Dadurch werden die Zytosole der beiden Zellen miteinander verbunden, und Substanzen von einem Molekulargewicht (MG) bis

zu 2000 können frei von Zelle zu Zelle diffundieren. Zu diesen Substanzen gehören die Second messenger cAMP und Kalziumionen und andere Ionen, mit denen auch elektrische Potentiale übertragen werden können. Dadurch geben Zellen Erregungen fast ohne Verzögerungen an die Nachbarzelle weiter, und Zellverbände können simultan auf Stimulation reagieren. Einige Neuronen, insbesondere bei Fischen, bedienen sich großer Verbände solcher Gap junctions in elektrischen Synapsen, um Signale von Zelle zu Zelle durch elektrische Kopplung zu übertragen. Diese Art der Signalübertragung ist zwar sehr schnell, hat aber den Nachteil, nicht regulierbar zu sein. Deswegen bedienen sich die meisten Neuronen chemischer Synapsen, um Signale auf andere Neuronen oder auf Muskelzellen zu übertragen.

1.1.1.10.7 Synapsen

An einer Synapse lagert sich die Axonendigung eines Neurons eng an die Plasmamembran einer nachgeschalteten Zelle an (Abb. 1.1.28). Dabei sind die beiden Zellen nur durch einen dünnen, den synaptischen Spalt voneinander getrennt. Die Axonendigung enthält eine Vielzahl von sekretorischen Vesikeln, deren Inhalt in den synaptischen Spalt entleert wird, sobald ein Aktionspotential, d.h. eine Depolarisation der neuronalen Plasmamembran, die Axonendigung erreicht. Die Vesikel enthalten Neurotransmitter, Substanzen, deren chemische Natur von dem Typ des Neurons abhängt und für die die nachgeschaltete Zelle spezifische Rezeptoren besitzt. Bekannte Neurotransmitter sind Azetylcholin, Aminosäuren wie Glyzin und Glutamat und Aminosäureabkömmlinge wie Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin, Histamin und γ -Aminobuttersäure (GABA) sowie Nukleoside und Nukleotide und länger-kettige Peptide (Abb. 1.1.29). Die Bindung an einen Rezeptor in der postsynaptischen Zelle führt zu deren Erregung und im Fall des Neurons zur Weiterleitung des ankommenden Signals oder im Fall einer Muskelzelle zur Kontraktion des Muskels.

1.1.1.10.8 Hormone

Im Prinzip handelt es sich bei chemischen Synapsen um eine sehr spezialisierte Form von Zell-Zell-Interaktionen, bei denen bestimmte Zellen Stoffe sezernieren, die durch spezifische Rezeptoren von anderen Zellen erkannt werden. Zu diesen Hormonen gehören neben den oben genannten Neurotransmittern eine Vielzahl weiterer Peptide, Pro-

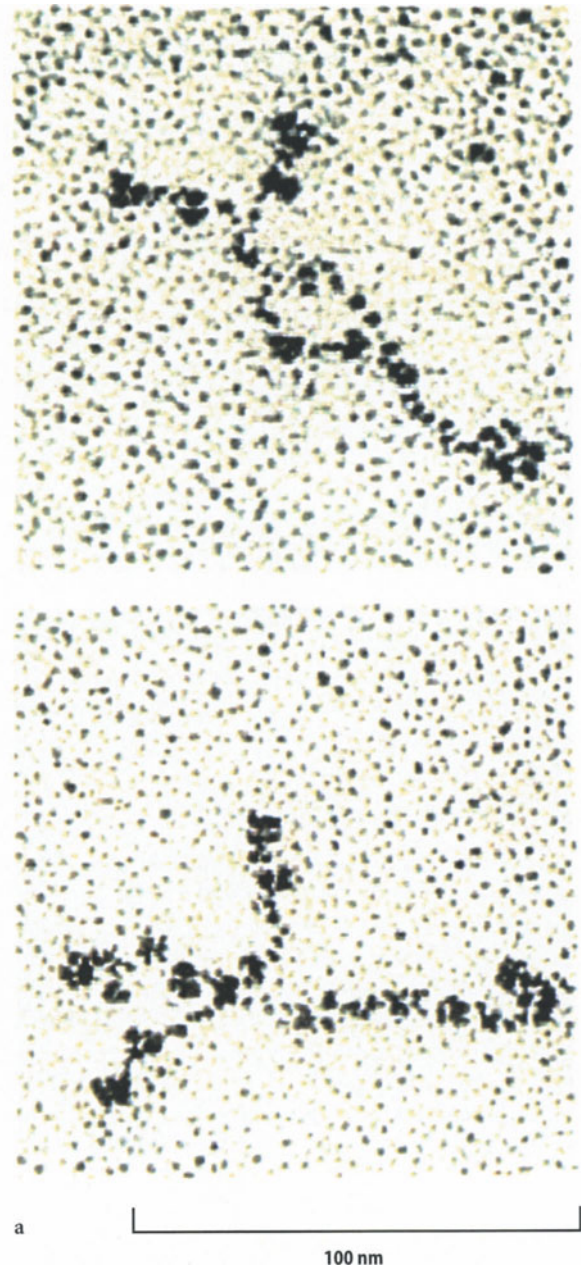


Abb. 1.1.21. Aufbau von Laminin in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (a) und schematisch (b). Es besteht aus drei umeinandergewundene Proteinketten mit globulären Domänen, die an andere Bestandteile der extrazellulären Matrix binden, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 976

teine, Steroide und so einfache Moleküle wie die Gase Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO). Man unterscheidet je nach Reichweite zwischen autokriner, d.h. auf dieselbe Zelle zurückwirkender, parakriner, d.h. Nachbarzellen betreffender, oder endokriner, d.h. den gesamten Kör-

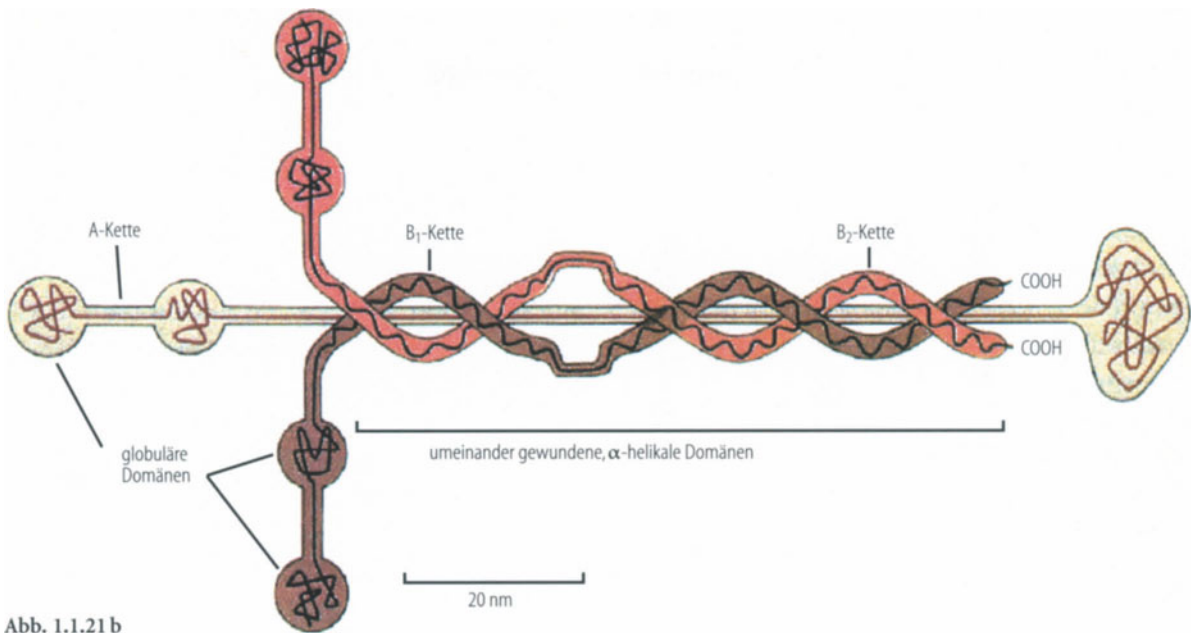


Abb. 1.1.21 b

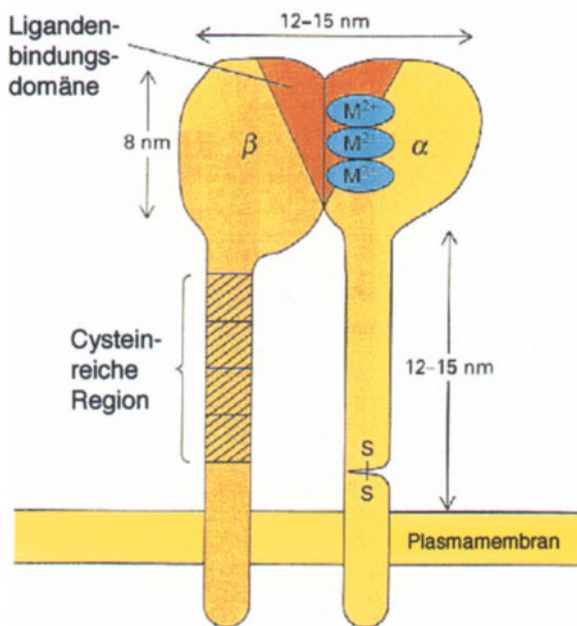


Abb. 1.1.22. Schematischer Aufbau von Integrinen aus einer zweiteiligen, durch eine Disulfidbrücke verbundenen, zweiwertige Metallionen (M^{2+}) bindenden α -Untereinheit und einer β -Untereinheit, die zusammen die Ligandenbindungsdomäne bilden, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1145

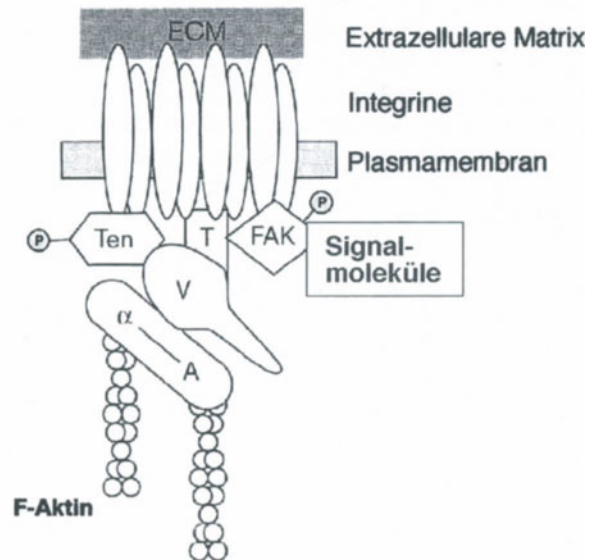


Abb. 1.1.23. Signaltransduktionskette der Integrine. Nach Bindung des extrazellulären Matrixliganden (ECM) werden Integrinmoleküle in Focal adhesions gebündelt, Tensin (*Ten*) und Focal-adhesion-Kinase (*FAK*) binden und werden an Tyrosin phosphoryliert. Danach lagern sich Talin (*T*), Vinculin (*V*) und α -Actinin (*α -A*) an F-Aktin an, und andere Signalmoleküle werden aktiviert, wiedergegeben mit Genehmigung aus Craig u. Johnson [1996]

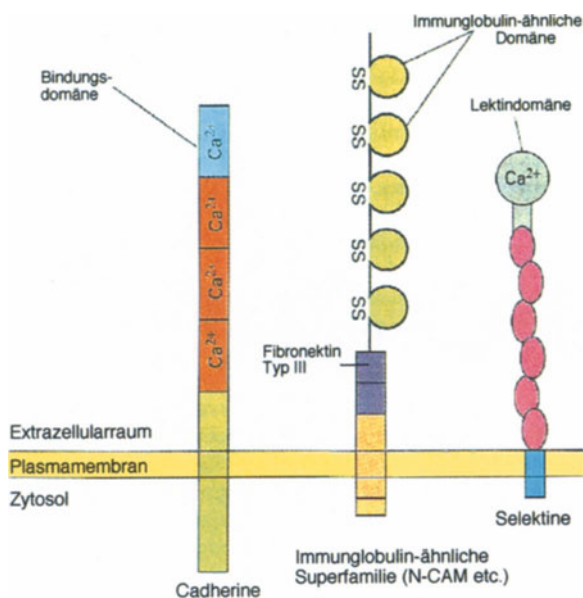


Abb. 1.1.24. Familien von Zelladhäsionsmolekülen. Cadherine binden an gleichartige Moleküle auf anderen Zellen über die äußerste von vier Ca^{2+} -bindenden Domänen. Die Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Proteine enthalten mehrere Immunglobulin- und Fibronectin-ähnliche Domänen und binden Ca^{2+} -unabhängig an gleichartige und andere Proteine von Nachbarzellen. Selektine bestehen ebenfalls aus mehreren repetitiven Sequenzabschnitten und binden Ca^{2+} -abhängig über eine endständige Lektindomäne an Oligosaccharidketten auf Nachbarzellen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1151

per durch das Blutgefäßsystem beeinflussender, Hormonwirkung. Hormone sind also die zentralen informationsübertragenden Moleküle innerhalb eines vielzelligen Organismus. Selbst das Nervensystem mit seiner hoch entwickelten Signalübertragung beruht im Grund auf der Wirkung von Hormonen, die allerdings auf den synaptischen Spalt beschränkt bleibt.

1.1.2 Von der DNA zum Protein – Molekulare Grundlagen des Lebens

1.1.2.1 Struktur der DNA

Gene, die Erbanlagen der Zelle, sind Abschnitte auf der DNA, die die Information für die regulierte Produktion einer Ribonukleinsäure (RNA) oder eines Proteins enthalten. DNA ist ein langkettiges Molekül aus vier Nukleotidmonomeren, das jedes aus einer Base [Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T)], einem Zucker (Deso-

xyribose) und einem Phosphatmolekül besteht (Abb. 1.1.30). Die genetische Information ist in der Abfolge der Bausteine wie in einer Schrift gespeichert. Die DNA liegt jedoch nicht als einzelner Strang vor, sondern ein zweiter Strang ist in einer Doppelhelix mit dem ersten Strang assoziiert. Die Verbindung zwischen den beiden Strängen wird durch Basenpaarungen zwischen A und T sowie G und C gewährleistet. Die G-C-Paarung erfolgt über drei Wasserstoffbrückenbindungen und ist deshalb stabiler als die A-T-Paarung, die nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen enthält. Da G immer nur mit C und A immer nur mit T paart, enthalten beide Stränge der Doppelhelix die gleiche Information; der eine Strang ist nur eine Art Negativ des anderen. Daraus folgt, daß bei Trennung beider Stränge jeder einzelne als Matrize zur Herstellung einer mit dem Ausgangsmolekül identischen Doppelhelix dienen kann.

Im Kern einer eukaryotischen Zelle liegt DNA nicht als ausgestreckte Doppelhelix vor, sondern wird durch die Interaktion mit spezifischen Proteinen in kondensierte Überstrukturen organisiert. Zunächst winden sich Abschnitte von 146 Nukleotiden um eine Scheibe, das Nukleosom, das aus je zwei Molekülen der Histone 2A, 2B, 3 und 4 besteht (Abb. 1.1.31). Wie auf einer Perlenschnur sind diese Nukleosomen auf der DNA angeordnet, wobei sie einen Abstand von etwa 50 Nukleotiden einhalten. Dies ist wahrscheinlich die aktive Form der DNA, in der ihre Information abgeschrieben und vervielfältigt werden kann. Durch die Interaktion mit dem Histon H1 bildet sich eine weitere Überstruktur, das 30-nm-Solenoid, dessen Geometrie noch nicht völlig geklärt ist. Wahrscheinlich handelt es sich nicht, wie bisher angenommen, um eine regelmäßige Helix, in die sich die Perlenschnur des DNA-Nukleosomen-Komplexes aufwindet, sondern um eine unregelmäßigere Zick-Zack-Struktur (Abb. 1.1.32). Im Abstand von 30000–100000 Nukleotiden bindet die so aufgefaltete DNA über spezifische Sequenzen, die SAR (scaffold attachment regions), an die nukleäre Matrix, die z. T. aus dem Enzym Topoisomerase zwei besteht (Abb. 1.1.33). Dieses Enzym ist wichtig, wenn ein DNA-Doppelstrang zur Anfertigung einer Kopie getrennt und entwunden wird, wobei sich angrenzend an die entwundene Stelle überdrehte Bereiche ausbilden, die die weitere Entwindung hemmen. Das Enzym kann die doppelsträngige DNA schneiden, die überdrehten Enden entwenden und wieder verbinden. Abschnitte zwischen zwei SAR sind also durch Topoisomerasemoleküle flankiert und werden dadurch in ihrer helikalen Spannung vom

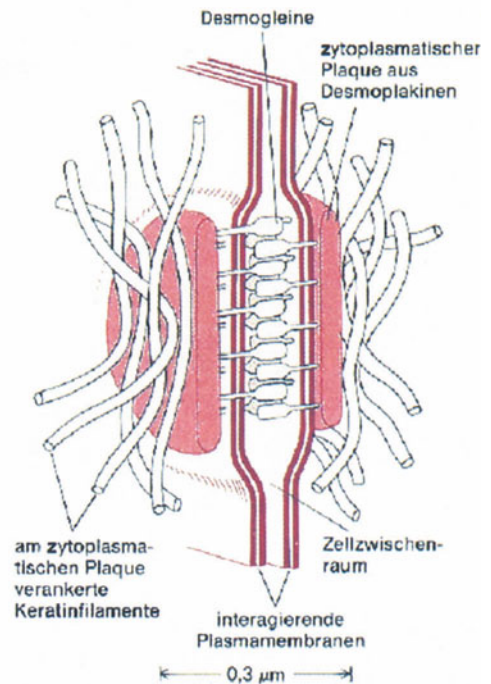
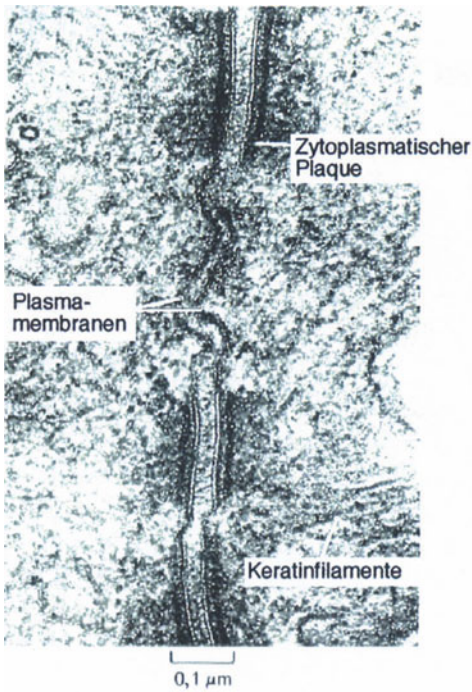


Abb. 1.1.25. Aufbau eines Desmosoms in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (*links*) und schematisch (*rechts*). Desmogleine verbinden die beiden interagierenden Plasmamembranen über den Zellzwischenraum und sind intrazellu-

lar über Desmoplakine und Plakoglobin an Keratinfilamenten verankert, wiedergegeben mit Genehmigung aus Alberts et al. [1990], S 950

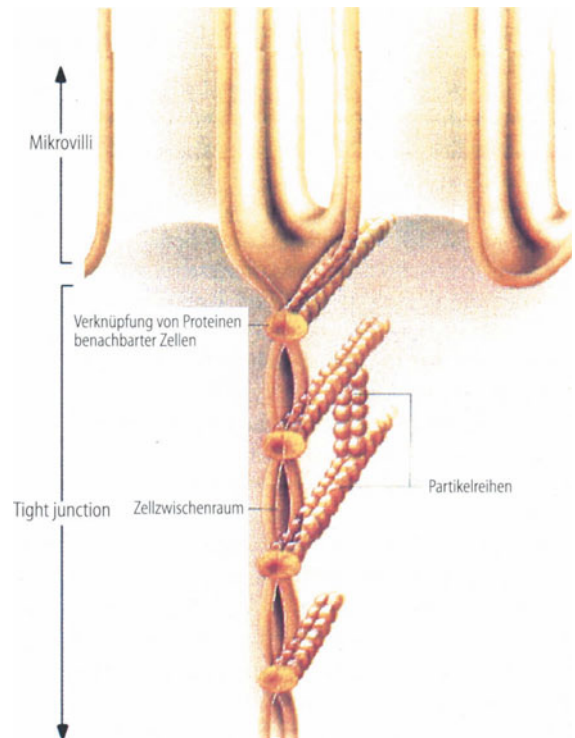


Abb. 1.1.26. Aufbau einer Tight junction in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (*links*) und schematisch (*rechts*). Partikelreihen aus Okkludin verbinden die beiden interagierenden Plasmamembranen von Epithelzellen an deren luminalem Pol, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 605

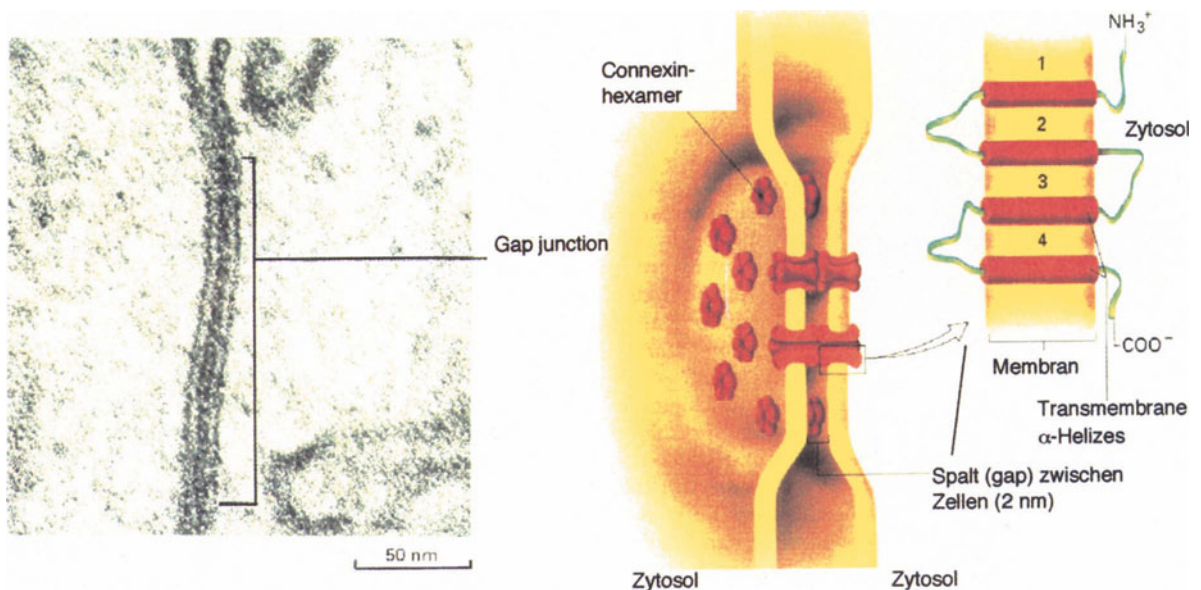


Abb. 1.1.27. Aufbau einer Gap junction in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (*links*) und schematisch (*rechts*). Connexin ist ein 4mal die Membran durchspannendes Molekül, das als Hexamer mit gleichartigen Molekülen der Nach-

barzelle interagiert und einen die beiden Zytosole verbindenden Kanal eröffnet, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1158–1159

restlichen DNA-Molekül entkoppelt. Man nimmt an, daß diese Bereiche auch funktionell getrennt sind, daß also Gene in ihnen gemeinsam reguliert und repliziert werden. Bei der Zellteilung wird durch Überspiralisierung des Proteingerüsts die DNA noch stärker kondensiert, und es entstehen die im Lichtmikroskop bereits sichtbaren Metaphasechromosomen, die dann auf die beiden Tochterzellen verteilt werden (Abb. 1.1.33a).

1.1.2.2 Replikation

Bevor sich die Zelle teilen kann, muß sie zuerst im Prozeß der Replikation ihre DNA kopieren. Die Replikation beginnt an einigen 1000, über das ganze Genom verteilten Replikationsursprüngen (auch *ori* genannt), an die neben Initiationsfaktoren das Enzym Helikase bindet und die Stränge entspiralisiert, gefolgt von der Primase, einem Enzym, das an der DNA-Matrize eine kurze Ribonukleinsäure(RNA)-Kopie, einen Primer, erzeugt (Abb. 1.1.34). Dieser dient als Ansatzpunkt für die DNA-abhängige DNA-Polymerase α , die den DNA-Strang durch Anlagerung von Nukleosidtriphosphaten unter Abspaltung von Pyrophosphat verlängert. Vom *ori* aus werden beide Stränge in beide Richtungen repliziert. Da die Verlängerung der neuen DNA-Stränge nur am 3'-Ende erfolgen

kann, ist die Synthese nur in einer Richtung unproblematisch und folgt der Wanderung der an der Replikation beteiligten Faktoren entlang der Doppelhelix. Dabei übernimmt die DNA-Polymerase δ von der Polymerase α die Verlängerung des neuen Strangs. Auf dem Gegenstrang erfolgt die Neusynthese entgegen der Richtung der sich öffnenden DNA-Doppelhelix. Dieser Strang wird in kurzen, von Primase und Polymerase α synthetisierten Stücken, den Okazaki-Fragmenten, synthetisiert, die durch Ersetzen der RNA durch DNA und Zusammenkleben der Stücke durch DNA-Ligase zu einem Strang verschmelzen. An den Enden der Chromosomen, den Telomeren, ergibt sich dabei das Problem, daß die RNA-Primer nicht mehr durch DNA ersetzt werden können, wodurch sich die Chromosomen bei jeder Replikation an den Enden verkürzen. Sie besitzen jedoch dort eine funktionslose hochrepetitive Sequenz aus einigen 100 Wiederholungen von GGTTAG, so daß zunächst keine wichtigen Gene betroffen sind. Dennoch ist dieser Verlust an DNA wahrscheinlich an der Alterung und am Tod von Zellen beteiligt. Einige Zellen, z. B. Keimzellenvorläufer, aber auch Tumorzellen, aktivieren daher eine Telomerase, einen Komplex aus einer 560 Basen langen RNA mit Proteinen (Abb. 1.1.35). Dieses Ribonukleoproteinpartikel (RNP) hybridisiert mit seinem RNA-Anteil an das nach der Replikation überstehende

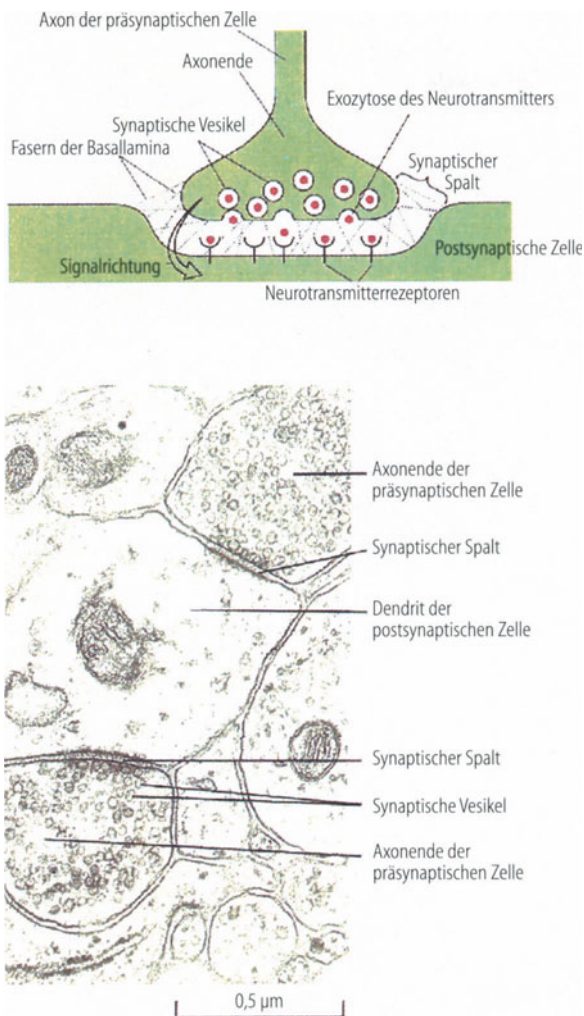


Abb. 1.1.28. Aufbau einer Synapse schematisch (*oben*) und in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (*unten*). Nach Eintreffen einer elektrischen Erregung am Axonende der präsynaptischen Zelle verschmelzen die sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran und setzen den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt frei. Rezeptoren auf der postsynaptischen Zelle binden den Neurotransmitter und leiten das Signal in diese Zelle weiter, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 929

Ende des als Matrize dienenden DNA-Einzelstrangs. An der RNA entlang wird der DNA-Strang durch die Reverse-Transkriptase-Aktivität der Telomerase verlängert, wobei entsprechend der RNA-Sequenz ein weiteres Mal GGTTAG angehängt wird. Daran bindet die gleiche RNA und startet einen erneuten Elongationszyklus. Ist der neu synthetisierte DNA-Einzelstrang lang genug, kann ein neues Okazaki-Fragment initiiert werden und die Länge des Chromosoms bleibt erhalten.

1.1.2.3 Mutation und Reparatur

Bei der DNA-Synthese auftretende Fehler können teilweise von der Polymerase δ selbst repariert werden, indem sie rückwärts die neu synthetisierte DNA abbaut und erneut synthetisiert. Darüber hinaus besitzen Zellen weitere DNA-Reparaturmechanismen für Schäden, die sich durch Umwelteinflüsse in der DNA anhäufen (Tabelle 1.1.2). Dabei wird meist das defekte Stück herausgeschnitten und neu synthetisiert. Dennoch bleiben auch nach dem Korrekturlesen einige solcher Veränderungen (Mutationen) der DNA erhalten und werden an die Tochterzellen weitergegeben. Wenn dies in der befruchteten Eizelle geschieht, kann es manchmal zu phänotypischen Veränderungen im entstehenden Organismus kommen, die meist als Erbkrankheiten offensichtlich werden. In diesem Fall spricht man von dominanten Mutationen. Meist sind Mutationen in Genen aber rezessiv, d.h. sie treten nicht in Erscheinung, da jede Zelle eine intakte zweite Version (Allel) des betroffenen Gens enthält. In seltenen Fällen bringen Mutationen jedoch sogar Vorteile und setzen sich in der Evolution durch. Die an der DNA-Replikation beteiligten Faktoren dürfen also nicht fehlerfrei arbeiten, wenn eine Höherentwicklung von Organismen evolutionär erwünscht ist. Da im Genom der höheren Eukaryoten jedoch nur ein kleiner Teil der DNA aus Genen besteht – der größere Teil sind oft hochrepetitive funktionell wahrscheinlich unwichtige Sequenzen – wirken sich Mutationen meist nicht auf den Phänotyp aus, führen aber zu Polymorphismen, d.h. interindividuellen Unterschieden auf dem Genom, die in der genetischen Forschung genutzt werden können.

1.1.2.4 Zellzyklus und Tumorentstehung

Die Replikation der DNA ist ein wichtiger Abschnitt während des Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle und findet in dessen S-Phase statt (Abb. 1.1.36). Die meisten Zellen eines Organismus durchlaufen allerdings gar keinen Zellzyklus, sondern befinden sich in der Ruhephase, der G_0 -Phase. Nur wenn sie durch Wachstumsfaktoren zur Vermehrung stimuliert werden, beginnen sie, die Proteine Cyclin D und E zu produzieren. Sie assoziieren mit den Cyclin-abhängigen Kinasen 2, 4 und 5 (CDK2, CDK4, CDK5) und aktivieren diese. Aktivierte CDK phosphorylieren weitere Proteine und führen dadurch zur Anschaltung von Genen, deren Produkte für die Replikation benö-

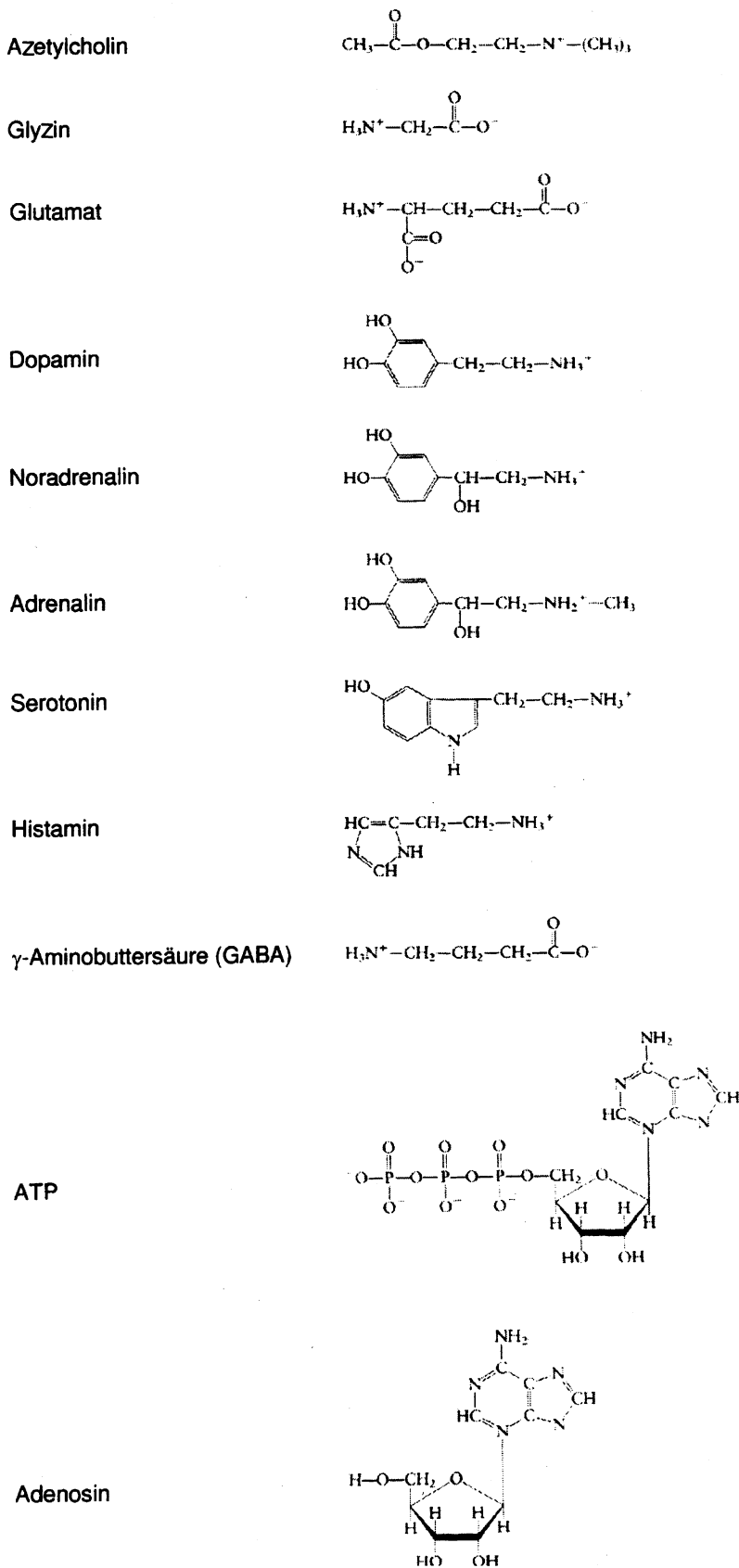
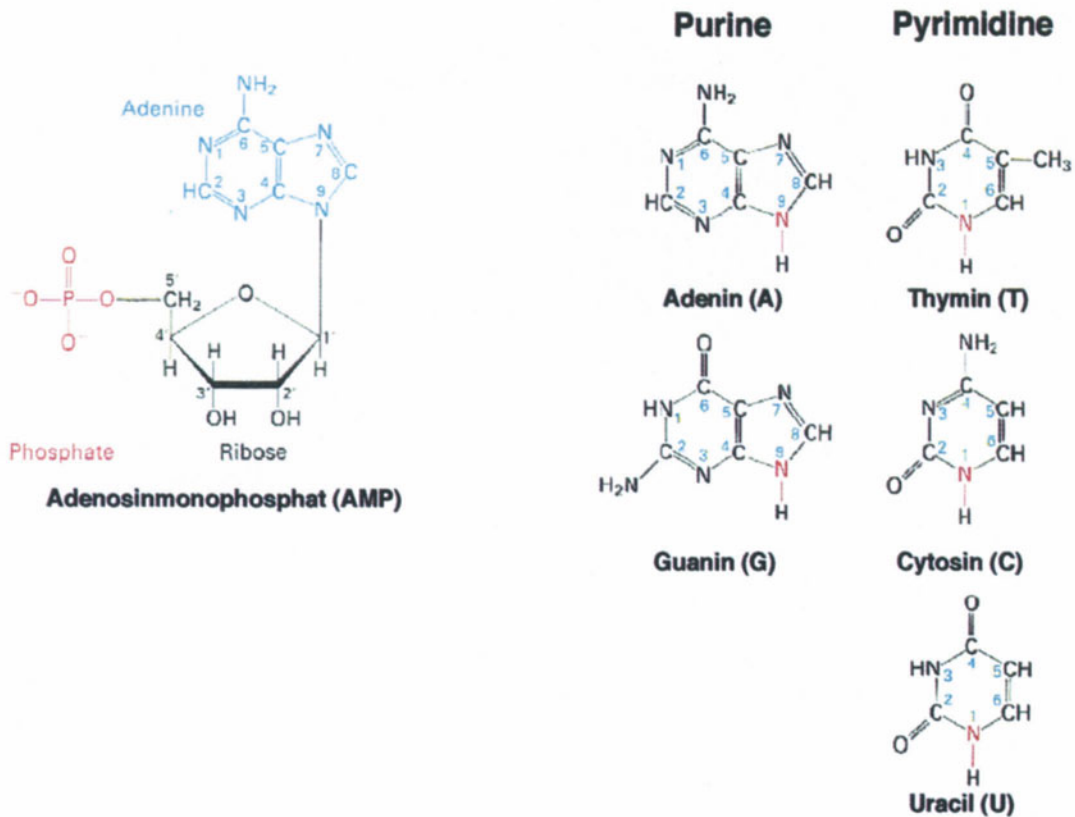
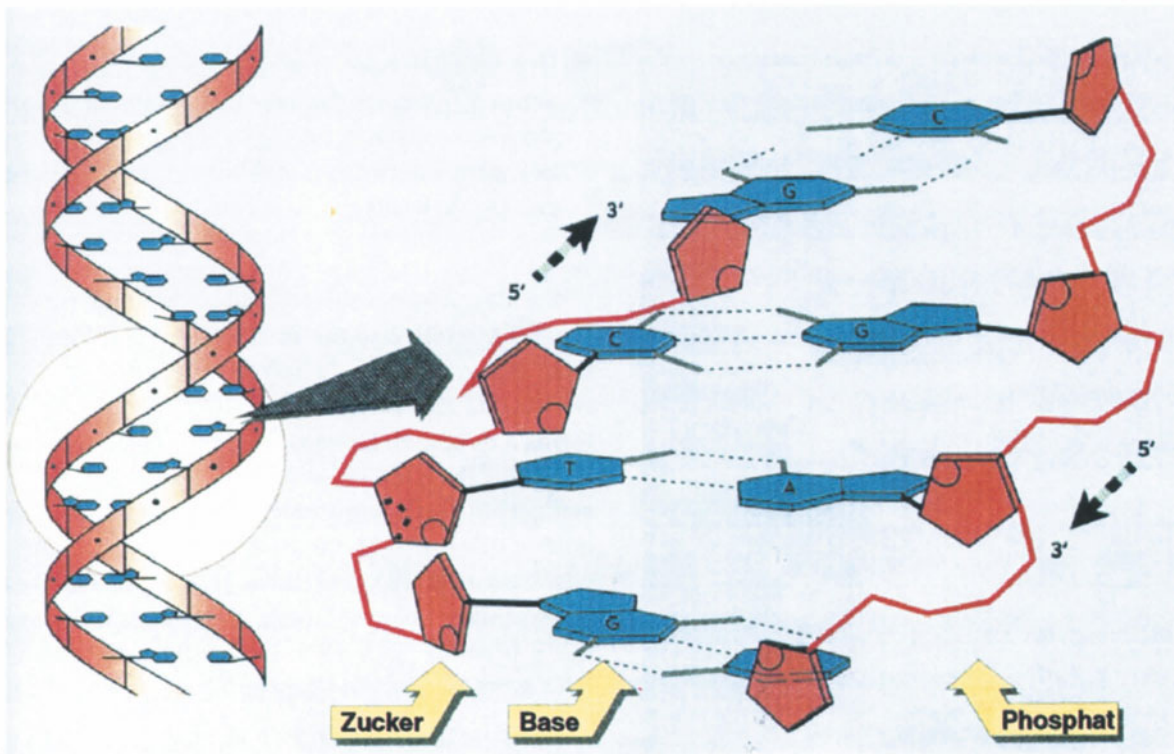


Abb. 1.1.29. Struktur wichtiger Neurotransmitter



a



b

Abb. 1.1.30. a Struktur eines typischen RNA-Nukleotids (AMP, links) aus Base (cyan), Zucker (schwarz) und Phosphat (rot) und Struktur der in DNA (A,G,C,T) und RNA (A,G,C,U) vorkommenden Basen (rechts), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 102–103, b Struk-

tur der DNA-Doppelhelix. Zucker- und Phosphatreste bilden das Rückgrat der beide Stränge, die antiparallel über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zur Doppelhelix verbunden sind, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lewin [1994], S 93

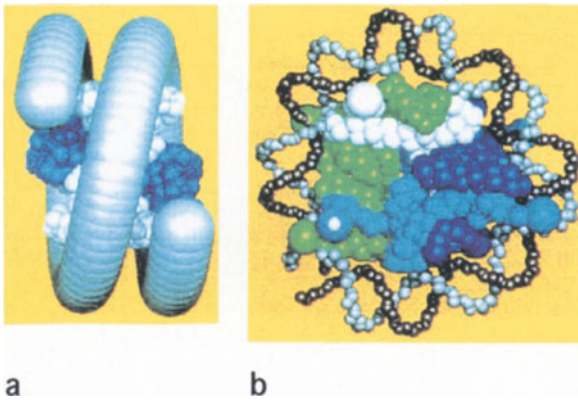


Abb. 1.1.31a, b. Struktur des Nucleosoms. DNA **a** als Seil dargestellt, **b** als Doppelhelix. Die Histone sind farblich gekennzeichnet: H2A (*hellcyan*), H2B (*dunkelcyan*), H3 (*grün*) und H4 (*weiß*), wiedergegeben mit Genehmigung aus Arents u. Moudrianakis [1993]

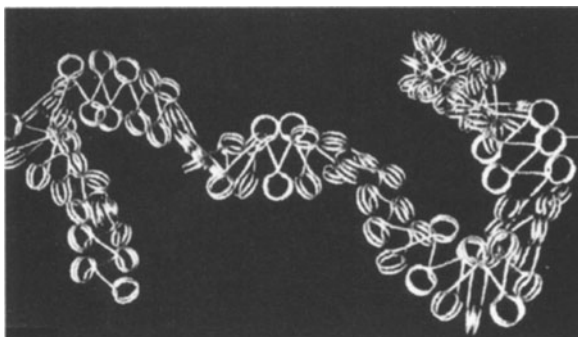
tigt werden, wie Polymerasen, Desoxyribonukleotid-synthetisierende Enzyme und Replikationsinitiationsfaktoren, die durch Bindung an die ori den Start der Replikation und damit der S-Phase ermöglichen. Dabei spielt auch die Inaktivierung hemmender Faktoren eine wichtige Rolle, wie des Rb (Retinoblastomtumorsuppressorgen) und des p53-Proteins, die zunächst als Tumorsuppressoren entdeckt wurden. Ein Ausfall dieser Gene, z.B. durch Mutation beider Allele, führt nämlich, wie die Inaktivierung von Rb durch CDK4, zur Auslösung einer S-Phase und damit zur Zellteilung und Tumorbildung. Die vererbte, eigentlich rezessive Schädigung eines Allels dieser Tumorsuppressorgene ist die Grundlage einer genetischen Prädisposition für Krebs, da eine einzelne Mutation im anderen Allel einer einzelnen somatischen Zelle ausreicht, die Tumorentstehung zu fördern.

Während der S-Phase wird Cyclin E massiv abgebaut und die neu synthetisierten Cycline A und B

Tabelle 1.1.2. Typen von DNA-Schäden

Schaden	Mögliche Ursachen
Fehlende Base	Depurinierung durch Säure oder Hitze
Falsche Base	Ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien
Insertion oder Deletion von Basen	Alkylierende Agenzien
Pyrimidindimere (meist Thymidin)	UV-Strahlung verursacht Cyclobutyl-Ringbildung benachbarter Thymidine
Strangbrüche	Ionisierende Strahlung, freie Radikale oder chemische Substanzen brechen die Phosphodiester-Bindung
Strangbrücke	Kovalente Verknüpfung 2er Stränge durch bifunktionelle alkylierende Agenzien

binden an das freiwerdende CDK2. Nach Abschluß der Replikation geht die Zelle in die 2-Phase über, während der sich immer mehr Cyclin B anhäuft, bis seine Konzentration einen Schwellenwert übersteigt und die Zelle in die M-Phase, die Mitosephase, übergeht. An der Auslösung der Mitose ist nicht nur Cyclin B beteiligt, sondern auch die mit ihm assoziierten Proteine CDK1 und die CDK-aktivierende Kinase (CAK), die CDK1 phosphoryliert und damit einen aktiven Mitose-auslösenden Faktor (MPF) produziert. Dieser Faktor phosphoryliert Lamin (Abb. 1.1.6 und Tabelle 1.1.1) und verursacht damit dessen Depolymerisierung und die Auflösung der Kernmembran. Darüber hinaus aktiviert er während der Mitose ein Protein-degradierendes System, das sowohl ihn selbst durch Proteolyse von Cyclin B abbaut als auch die Anaphase, also die Auftrennung der Chromosomenhälften (Chromatiden) in die Tochterzellen, auslöst. Wird durch eine vor-schnelle Aktivierung des Mechanismus die Ana-



um Nucleosom gewundene DNA (Nucleosom nicht gezeichnet)

Abb. 1.1.32. Potentielle Zick-Zack-Struktur des 30-nm-Solenoids, wiedergegeben mit Genehmigung aus Woodcock u. Horowitz [1995]

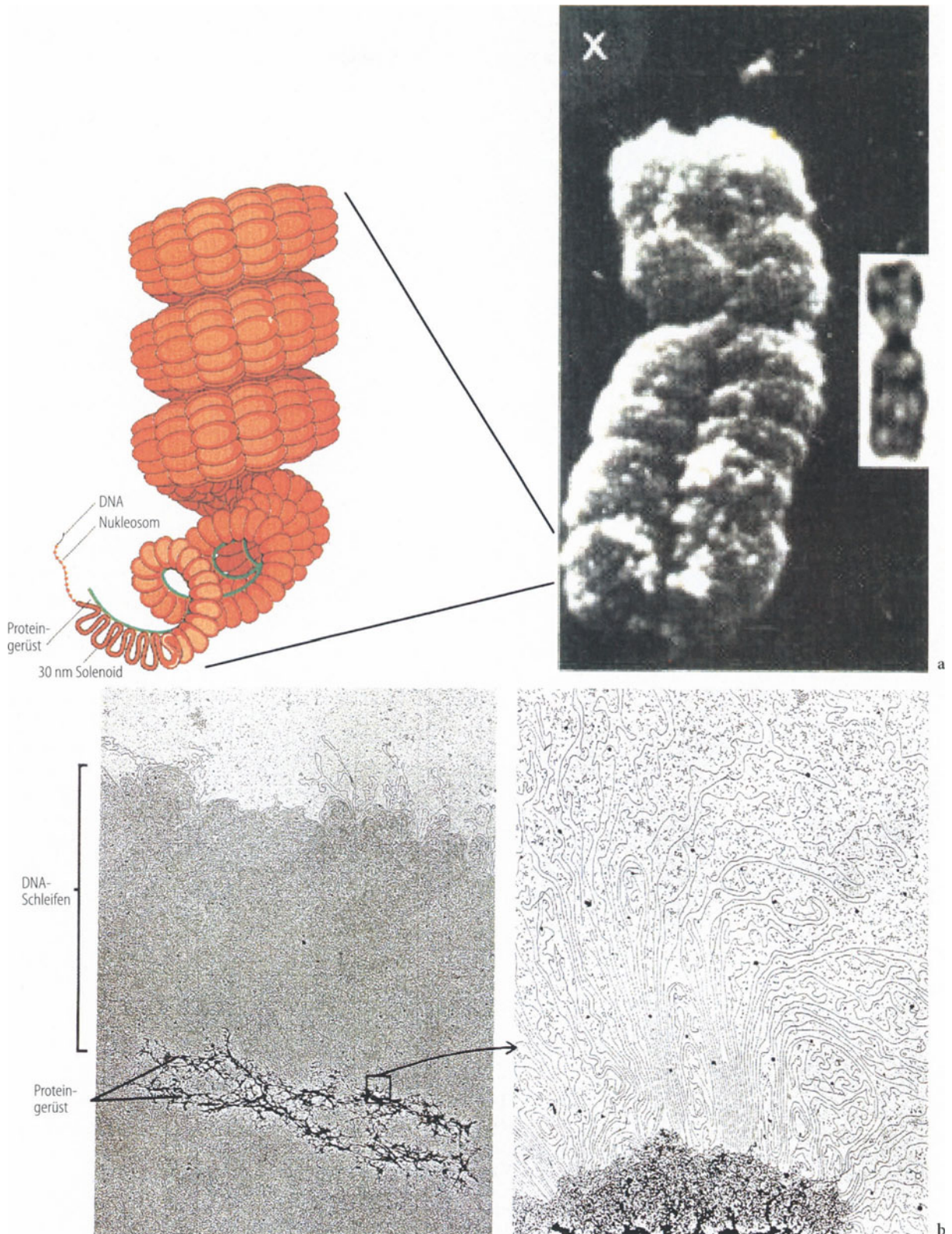


Abb. 1.1.33. a Struktur des Metaphasechromosoms. Das 30-nm-Solenoid bindet in unregelmäßigen Abständen über SARs an ein Proteingerüst, das die DNA durch weitere Auf-faltung noch enger packt (*links*), bis ein Metaphase-Chromosom (hier das X-Chromosom) entsteht (*rechts*), wiederge-

geben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 372, **b** nach leichter Detergenzbehandlung wird in der elektronenmikroskopischen Aufnahme das Proteingerüst mit den daran gebundenen DNA-Schleifen sichtbar, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 372

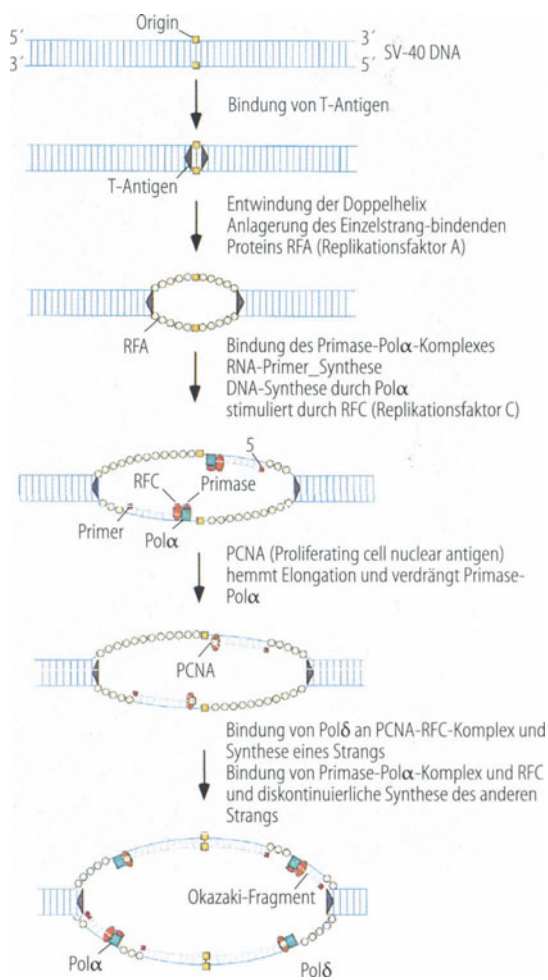


Abb. 1.1.34. Schema der eukaryotischen Replikation am Beispiel des Affenvirus SV40 (weitere Erläuterungen s. Text), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 379

phase zu früh gestartet, kann es zu Chromosomenfehlverteilungen kommen und damit z. B. zu Trisomien in Tochterzellen. Nach der Mitose gehen die beiden Tochterzellen wieder in die G_1 -Phase über und durchlaufen erneut den Zellzyklus, solange der mitogene Stimulus anhält.

1.1.2.5 Onkogene

Ein Zellzyklus kann aber auch ohne exogenen Stimulus ausgelöst werden, wenn in einer Zelle Mutationen in proliferationsregulierenden Genen auftreten, die zu Aktivitätsänderungen ihrer Produkte führen. Die betroffene Zelle beginnt sich vom Organismus unkontrolliert zu teilen und bildet einen Tumor. Gene, deren mutierte Form krebsauslösend

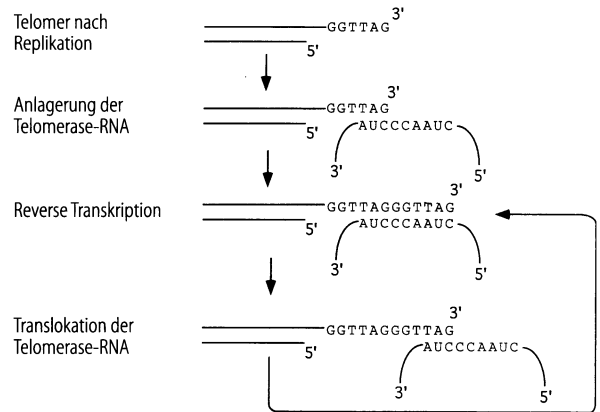


Abb. 1.1.35. Mechanismus der durch Telomerase ausgelösten Wiederherstellung der Telomere nach Replikation. Der nach der unvollständigen Replikation am Telomer überhängende DNA-Einzelstrang wird durch wiederholte Anlagerung der Telomerase und Reverse Transkription entlang der Telomerase-RNA verlängert und kann danach wieder als Ansatzpunkt für den Replikationszyklus dienen

sein kann, werden Onkogene genannt und kodieren meist für Proteine, die in mitogenen Signalwegen eine Rolle spielen, wie Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Enzyme in Second-messenger-Systemen, Genexpressions- und Zellzyklus-regulierende Proteine (Tabelle 1.1.3). Einige Onkogene sind als Bestandteil krebs erzeugender Retroviren entdeckt worden. Diese besitzen ein RNA-Genom, das sie nach Infektion einer Zelle durch eine mitgebrachte Reverse Transkriptase in DNA umschreiben, die in das Genom der Zelle integrieren kann (Abb. 1.1.37). Dort können zelluläre Gene in das Virusgenom aufgenommen und – nach Transkription der DNA in RNA und Freisetzung des Virus – in andere Zellen mitgeschleppt werden. Dabei haben Viren, die ein aktiviertes Onkogen in sich tragen, einen Selektionsvorteil, da sich die infizierte Zelle zu teilen beginnt und damit das Retrovirus schon auf DNA-Ebene vermehrt.

1.1.2.6 Transkription

Um die in der DNA gespeicherte Information in Funktion umzusetzen, stellt die Zelle zunächst eine Abschrift der DNA in Form von RNA her. Dieser als Transkription bezeichnete erste Schritt in der Expression eines Gens unterliegt einer komplexen Regulation. Reguliert wird dabei hauptsächlich die Bindung der RNA-Polymerase an den Startpunkt der Transkription. Eukaryotische Zellen besitzen drei verschiedene RNA-Polymerasen, die unter-

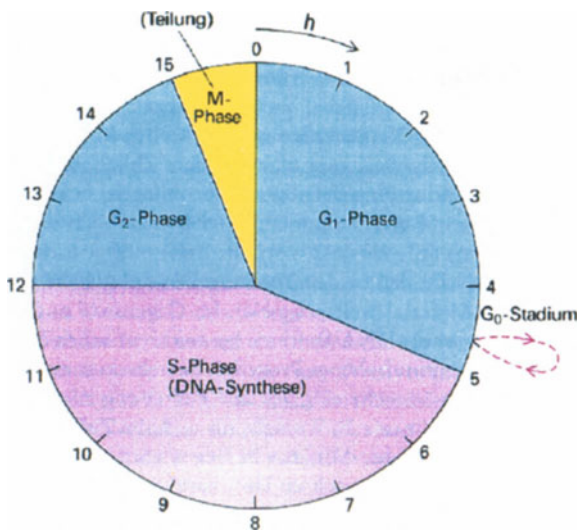


Abb. 1.1.36. Schema des Zellzyklus. Sich teilende Zellen durchlaufen zunächst eine G₁-Phase, in der sie für die Replikation notwendige Faktoren synthetisieren, bevor sie in die Replikationsphase (S-Phase) übergehen, in der die DNA verdoppelt wird. Danach folgt eine zweite Synthesephase (G₂-Phase), nach der sich die Zelle im Prozeß der Mitose (M-Phase) in zwei Tochterzellen teilt. Am Ende der G₁-Phase können Zellen in die Proliferationsruhephase G₀ übergehen, in der sich die meisten Zellen eukaryotischer Organismen befinden. Durch mitogene Stimuli können sie wieder an derselben Stelle in den Zellzyklus eintreten und eine erneute Proliferation beginnen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 182

schiedliche Klassen von Genen transkribieren. Die RNA-Polymerase I ist verantwortlich für die Synthese der drei größeren ribosomalen RNAs (rRNA) (Abb. 1.1.38), RNA-Polymerase II transkribiert alle Protein-kodierenden Gene und die Gene für einige kleine RNAs (Abb. 1.1.39) und RNA-Polymerase III produziert die kleinste rRNA, alle Transfer-RNAs (tRNA) und weitere kleine RNAs (Abb. 1.1.40).

1.1.2.6.1 Initiation

Alle drei Polymerasen besitzen distinkte, durch die Sequenz der DNA und mit ihr interagierender Proteine definierte Ansatzstellen, die Promotoren. Transkriptionsfaktoren genannte Proteine binden spezifisch an die Promotorsequenzen und werden ihrerseits wieder von der jeweiligen RNA-Polymerase erkannt und in einem Initiationskomplex gebunden. Die Transkriptionsfaktoren sind für alle drei RNA-Polymerasen verschieden, mit Ausnahme eines Proteins, das in allen Initiationskomplexen vorkommt, das TATA-Box-bindende Protein (TBP). Es war ursprünglich gefunden worden als das Protein mit der zentralen Rolle bei der Bildung des

Tabelle 1.1.3. Onkogene

Onkogen	Lokalisation	Funktion
abl	Zytoplasma und Kern	Tyrosinkinase
crk	Zytoplasma	Tyrosinkinaseaktivator
erbA	Zytoplasma	Thyroidhormonrezeptor
erbB	Plasmamembran	EGF-Rezeptor, Tyrosinkinase
ets	Kern	Transkriptionsfaktor
fes (fps)	Zytoplasma	Tyrosinkinase
fgr	Zytoplasma	Tyrosinkinase
fms	Plasmamembran	CSF-1-Rezeptor, Tyrosinkinase
fos	Kern	Transkriptionsfaktor
jun	Kern	Transkriptionsfaktor
kit	Plasmamembran	Tyrosinkinase
mas	Plasmamembran	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
met	Plasmamembran	Tyrosinkinase
mil/raf	Zytoplasma	Serin-Threonin-Kinase
mos	Zytoplasma	Serin-Threonin-Kinase
myb	Kern	Transkriptionsfaktor
myc	Kern	Transkriptionsfaktor
neu	Plasmamembran	Tyrosinkinase
(erb-2)		
Ha-ras	Plasmamembran	G-Protein
Ki-ras	Plasmamembran	G-Protein
N-ras	Plasmamembran	G-Protein
rel	Zytoplasma und Kern	Transkriptionsfaktor
ros	Plasmamembran	Tyrosinkinase
sea	Plasmamembran	Tyrosinkinase
sis	Extrazellulär	Wachstumsfaktor
ski	Kern	Transkriptionsfaktor
src	Zytoplasma	Tyrosinkinase
yes	Zytoplasma	Tyrosinkinase

Initiationskomplexes an den häufigsten Promotoren. Diese werden von der RNA-Polymerase II transkribiert und enthalten etwa 30 Basenpaare (bp) vor dem Startpunkt, die nach ihrer Sequenz benannte TATA-Box. An diese bindet das TBP als Komplex mit einem TBP-assoziierten Faktor (TAF) als Transkriptionsfaktor IID (TFIID). Danach lagern sich die Transkriptionsfaktoren IIA und IIB und die RNA-Polymerase II zusammen mit TFIIF an. Aber erst nach Bindung von TFIIE, TFIIH und TFIIJ kann die Transkription beginnen.

1.1.2.6.2 Regulation

Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren und damit die Bildung des Initiationskomplexes kann durch trans-aktive regulierende Proteine beeinflusst werden (Abb. 1.1.39). Diese binden an spezifische Sequenzen, die meist innerhalb der ersten Kilobasen (kb) 5' vom Transkriptionsstartpunkt eines Gens liegen, die aber auch viel weiter entfernt im Gen selbst oder in dessen 3'-Region lokalisiert

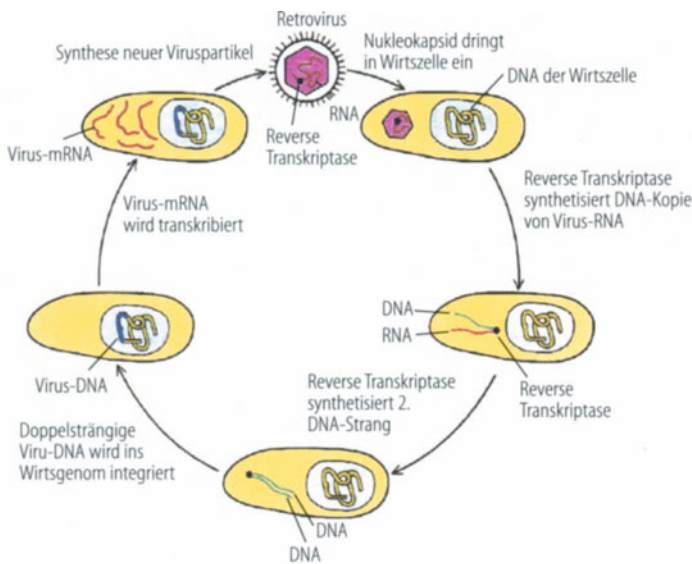


Abb. 1.1.37. Lebenszyklus eines Retrovirus, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 212

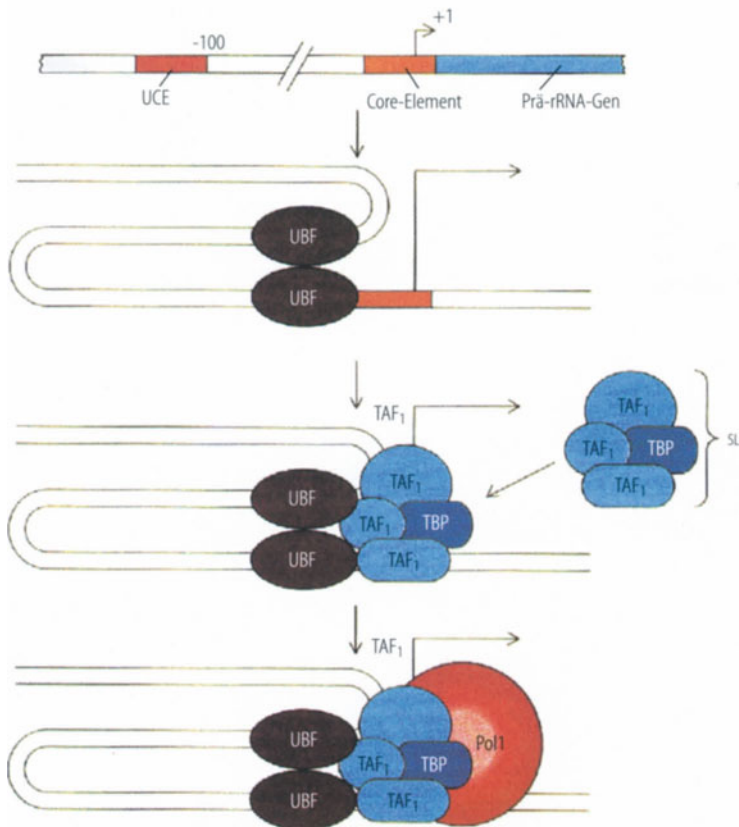


Abb. 1.1.38. Initiation der Transkription an einem rRNA-Gen. Der Upstream-binding-Faktor (UBF) bindet als Dimer an das Upstream-control-Element (UCE) und das Core-Element direkt an der Initiationsstelle. Danach binden das TATA-Box-bindende Protein (TBP) und mit TBP assoziierte Faktoren (TAF). Dieser SL1-Komplex bindet die RNA-Polymerase I (Pol I), die die Transkription des rRNA-Gens durchführt, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 470

sein können. Je nachdem, ob der Einfluß auf die Transkription hemmend oder stimulierend ist, nennt man diese Bindestellen Silencer oder Enhancer. Dabei sind meist die Orientierung der Bindestelle und ihre Entfernung vom Promotor für die

Aktivität irrelevant, da die dazwischenliegende DNA eine Schleife bildet, wenn der Enhancer-bindende Transkriptionsfaktor mit dem basalen Transkriptionsfaktor am Promotor wechselwirkt. Obwohl alle Zellen eines Organismus identische, re-

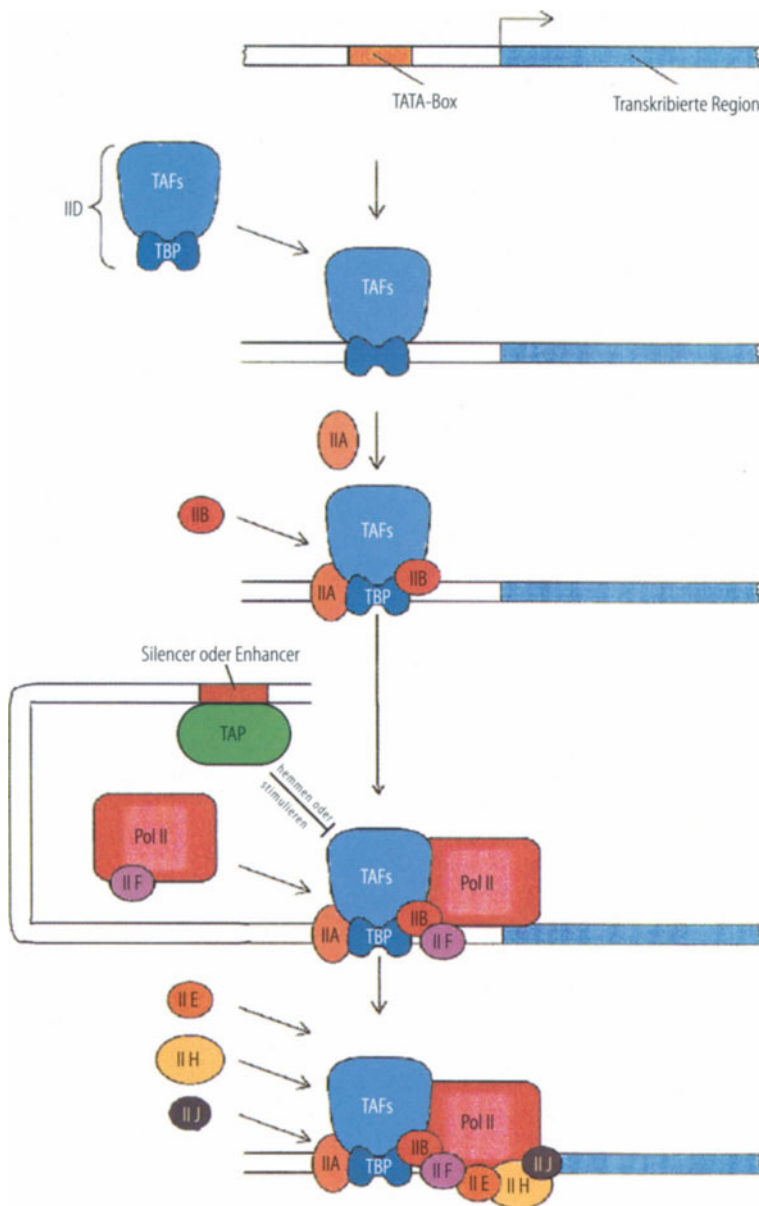


Abb. 1.1.39. Initiation der Transkription an einem mRNA-kodierenden Gen. An die TATA-Box bindet TFIID, bestehend aus TBP und TAFs. Weitere Initiationsfaktoren assoziieren (*TFIIA*, *TFIIB*), und die RNA-Polymerase II bindet als Komplex mit *TFIIF*. Dieser Schritt wird durch trans-aktive Proteine (*TAP*), die an andere cis-aktive Elemente auf dem glei-

chen DNA-Molekül binden und mit den TAFs wechselwirken, reguliert. Je nach der Wirkung dieser Elemente werden sie Enhancer oder Silencer genannt. Vor dem Start der Transkription binden die Transkriptionsfaktoren *TFIIE*, *TFIIH* und *TFIIJ*, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 454

gulatorische Sequenzen geerbt haben, können sie doch durch Veränderungen in der Konzentration und in der Aktivität von Transkriptionsfaktoren Gene unterschiedlich exprimieren. So gibt es DNA-Sequenzelemente, die von nur in bestimmten Zelltypen produzierten Transkriptionsfaktoren erkannt werden und damit gewebespezifisch die Transkription des Gens aktivieren. Hormon-re-

sponsive Elemente aktivieren die Genexpression nur beim Vorhandensein eines bestimmten Hormons. So liegen Steroidrezeptoren im Zytosol der Zelle mit einem Inhibitor komplexiert vor, bis das passende Hormon durch die Plasmamembran in die Zelle gelangt, den Inhibitor vom Rezeptor verdrängt und dadurch dessen Import in den Kern und dessen Interaktion mit den spezifischen re-

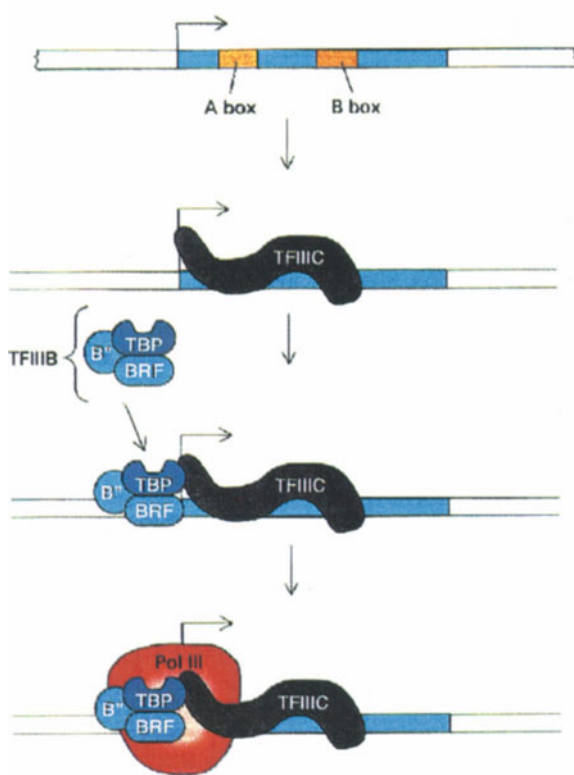


Abb. 1.1.40. Initiation der Transkription an einem Hefe-tRNA-Gen. Transkriptionsfaktor IIC (*TFIIC*) bindet an zwei Sequenzabschnitte im tRNA-Gen, die A- und die B-Box. Nach Anlagerung des TFIIB-Komplexes kann RNA-Polymerase III binden und das tRNA-Gen transkribieren, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 472

sponsiven Elementen ermöglicht. Andere Hormone vermitteln über ihre Rezeptoren die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und regulieren damit die Genexpression.

Die in Vertebraten auftretende Methylierung von 50–80% der Cytosinreste in der Basenabfolge CG korrespondiert ebenfalls oft mit der Ausschaltung von Genen insbesondere beim Imprinting und bei der Inaktivierung der meisten Gene auf einem der zwei X-Chromosomen in weiblichen Tieren. Während beim Imprinting einige Gene nur auf einem Chromosom transkribiert werden, wobei genspezifisch entweder immer nur das von der Mutter stammende (materne) oder immer nur das vom Vater stammende (paterne) Allel als Matrize dient, wechselt die parentale Herkunft des inaktivierten X-Chromosoms von Zelle zu Zelle. Der Zusammenhang zwischen Methylierung und Geninaktivierung ist, wie die Funktion dieser Prozesse, noch ungeklärt.

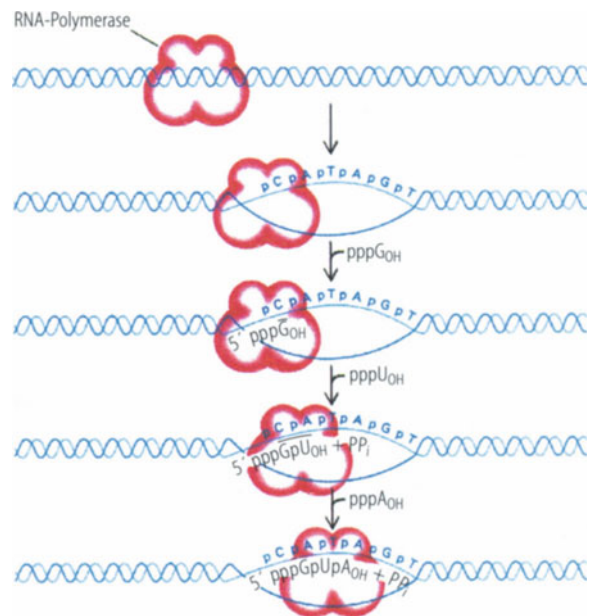


Abb. 1.1.41. Schema der Transkriptionselongation. Die RNA-Polymerase synthetisiert die RNA in 5'-3'-Richtung durch Anlagerung des zur DNA-Vorlage komplementären Nucleotridtriphosphats und Abspaltung eines Pyrophosphatrests (PPi), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 116

1.1.2.6.3 Elongation und Termination

Nachdem der Initiationskomplex am Promotor gebildet ist, wandert er entlang eines Strangs der DNA, wobei TFIIF als Helikase die beiden Stränge der Doppelhelix entwindet, und synthetisiert eine RNA-Kopie des Gens in 5'-3'-Richtung (Abb. 1.1.41). Diese Kopie entspricht genau der Basenabfolge des DNA-Gegenstrangs mit der Ausnahme, daß Thymin in der RNA durch Uracil (U) ersetzt ist (Abb. 1.1.30). Die Termination der Transkription erfolgt durch spezifische DNA-Sequenzen. Bei der RNA-Polymerase III handelt es sich dabei um eine A-reiche Region und bei der RNA-Polymerase I um eine 18bp lange Sequenz, die von einem Terminationsfaktor erkannt wird. Für die RNA-Polymerase II ist die Termination nicht völlig geklärt. Für sie ist die Polyadenylierungsstelle die erste Region, nach der sie terminieren darf; sie tut es aber oft erst einige 100bp weiter. Um das 3'-Ende der RNA exakt zuzuschneiden, bindet an der Polyadenylierungsstelle ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Faktor (Abb. 1.1.42). Zwei verschiedene Untereinheiten erkennen dabei die beiden für diese Stelle spezifischen Sequenzab-

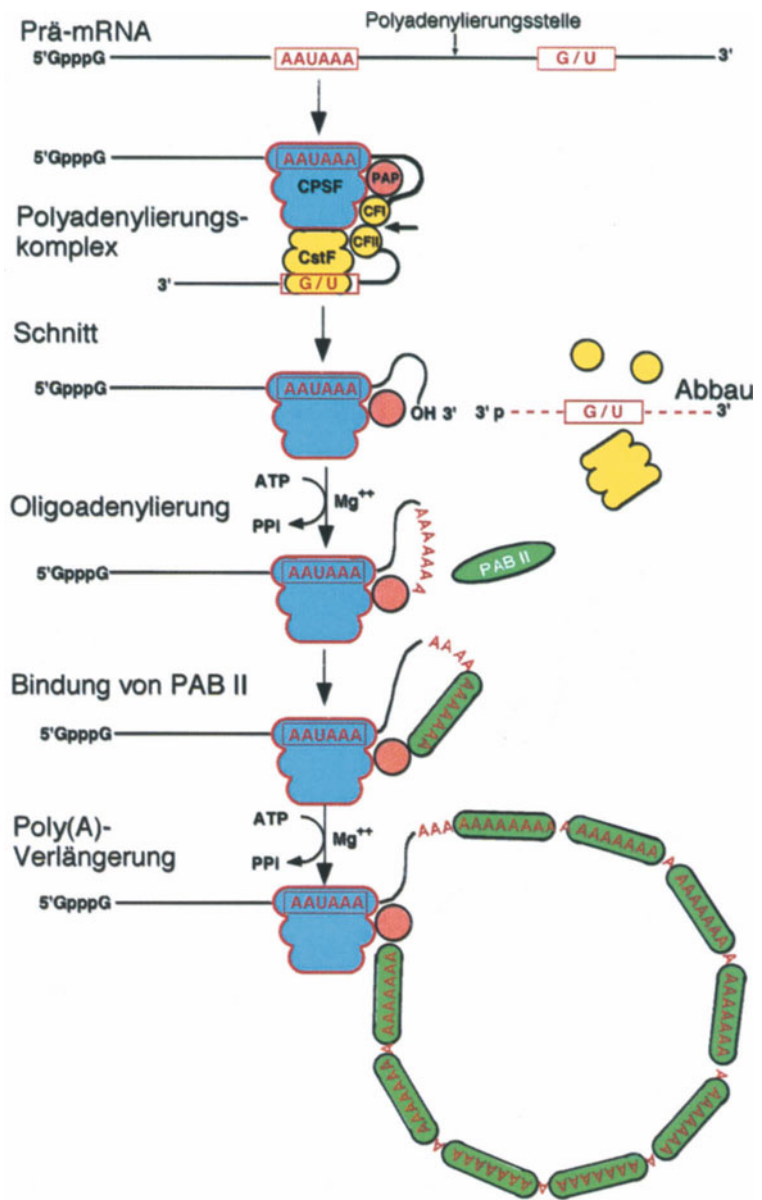


Abb. 1.1.42. Schema der Polyadenylierung von Prä-mRNA. Cleavage-and-polyadenylation-specific-Faktor (CPSF) bindet an das Polyadenylierungssignal AAUAAA und der Cleavage-stimulatory-Faktor (CStF) bindet an die GU-reiche Region 3' von der Polyadenylierungsstelle. Zwei Cleavage-Faktoren (CFI und CFII) bilden mit CPSF und CStF und der Poly(A)-Polymerase (PAP) den Polyadenylierungskomplex. Die RNA wird gespalten, CFI, CFII und CStF dissoziieren ab und das abgespaltene 3'-Ende wird abgebaut. PAP hängt ca. 12 Adenosinreste an, das Poly(A)-bindende Protein II (PABII) bindet und stimuliert die weitere Polyadenylierung durch PAP, wiedergegeben mit Genehmigung aus Keller [1990]

schnitte, AAUAAA kurz vor der Schnittstelle und eine GU-reiche Region kurz hinter der Schnittstelle. Dazwischen schneidet der Faktor die mRNA und erlaubt die Bindung der Poly(A)-Polymerase, eines Enzyms, das ans Ende der mRNA 200–250 A-Reste anhängt. Diese schützen die mRNA vor dem Angriff von exonukleolytischen RNasen. Die gleiche Aufgabe am 5'-Ende der RNA hat die Cap-Struktur, ein dort über eine 5'-5'-Triphosphatgruppe gebundenes, methyliertes Guanodin (Abb. 1.1.43). Sie wird kurz nach dem Start der Transkription von einem spezifischen Enzym angekoppelt und bildet de facto ein zweites 3'-Ende.

1.1.2.7 Prozessierung der Primärtranskripte

Die Produkte der Aktivität aller 3 RNA-Polymerasen, die Primärtranskripte, müssen weiter prozessiert werden, um reife funktionsfähige RNAs zu erhalten. Prä-tRNAs werden am 5'-Ende verkürzt und erhalten am 3'-Ende zusätzlich die Basensequenz CCA angehängt, an die später die Aminosäure angekoppelt werden kann (Abb. 1.1.44). Außerdem werden etwa 10% der Basen einer Prä-tRNA chemisch modifiziert, z.B. durch Methylierung. Einige tRNAs besitzen darüber hinaus Introns. Das sind Sequenzabschnitte im Innern eines

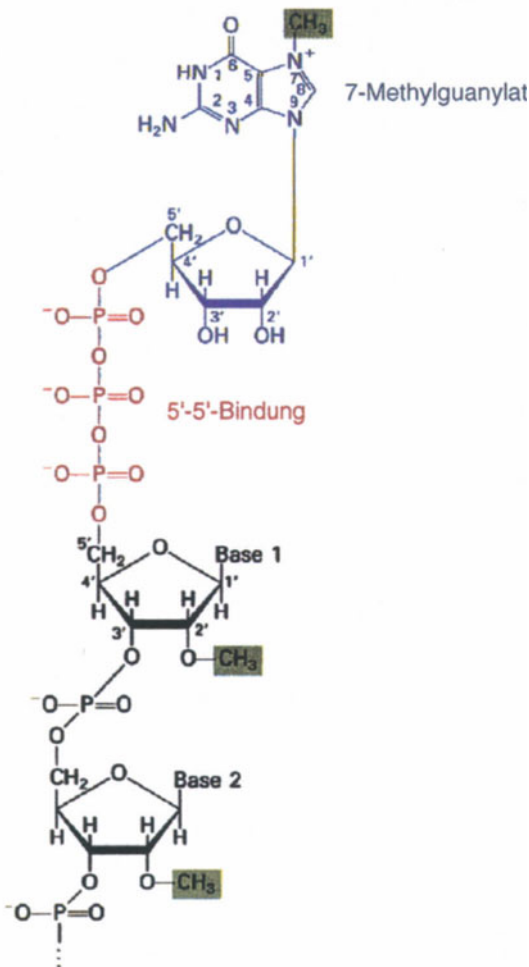


Abb. 1.1.43. Struktur des 5'-Endes eukaryotischer mRNA (Cap). Über eine 5'-5' Triphosphatbrücke (rot) wird während der Transkription durch ein spezifisches Capping-Enzym ein methyliertes Guanin (cyan) an die 5'-terminalen Basen angehängt, die auch oft methyliert sind, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 119

Vorläufer-RNA-Moleküls, die in der reifen Form nicht mehr vorkommen und von Exons flankiert sind, die nach der Prozessierung das aktive RNA-Molekül bilden. Das Herausschneiden der Introns aller RNA-Moleküle erfolgt im Zellkern. Unprozessierte RNAs können nicht ins Zytoplasma gelangen. Bei den Prä-tRNAs sind die Enden des Introns aufgrund der Faltung des Primärtranskripts nahe beieinander gelegen. Sie werden durch eine spezifische Endonuklease geschnitten, und die Exons durch eine Ligase wieder verbunden.

Die Prä-rRNA enthält alle drei großen rRNA-Moleküle in einem Primärtranskript. Schon die Transkription findet in den Nukleoli statt, wo die Primärtranskripte sofort mit spezifisch bindenden

Proteinen und RNA-Protein-Komplexen, den kleinen nukleolären Ribonukleoproteinpartikeln (snoRNP), assoziieren. Danach werden sie in mehreren Schritten gespalten, wobei Sequenzen zwischen den reifen rRNA-Molekülen, die Spacer, herausgeschnitten werden (Abb. 1.1.45). Es entstehen die reife 18S-rRNA, die mit den assoziierten Proteinen die kleine 40S Untereinheit des Ribosoms bildet, und die 28S- und 5,8S-rRNAs, zu denen die außerhalb des Nukleolus von RNA-Polymerase III produzierte 5S-rRNA hinstößt und mit den assoziierten Proteinen die große 60S Untereinheit des Ribosoms bildet. Beide Untereinheiten werden getrennt durch die Kernporen ins Zytoplasma geschleust. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten enthalten die Prä-rRNAs einiger Protozoen, wie *Tetrahymena thermophila*, Introns im Vorläufer für die größte rRNA. Diese Introns sind in der Lage, sich selbst ohne Beteiligung von Proteinen aus den Prä-rRNAs herauszuschneiden, was auf der katalytischen Aktivität in ihnen enthaltener RNA-Sequenzen, der Ribozyme, beruht (Abb. 1.1.46).

Auch die Herstellung und Prozessierung von RNA-Polymerase-II-Transkripten ist auf wenige Stellen im Kern beschränkt, an denen sich alle beteiligten Faktoren ansammeln. Schon in der frühen Phase der Transkription lagern sich an das Primärtranskript Proteine an. Sie bilden mit der Prä-mRNA die hnRNPs, die heterogenen nukleären Ribonukleoproteinpartikel. Mit diesen hnRNPs interagieren snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles), die die snRNAs U1, U2, U4, U5 und U6 enthalten (Abb. 1.1.47). Der gesamte Komplex aus hnRNPs und snRNPs wird auch Spleißosom genannt, da in ihm der Vorgang des Prozessierens oder Spleißens der Prä-mRNA erfolgt. Zunächst bindet das U1-snRNP mit Hilfe des Proteins ASF/SF2 durch spezifische Basenpaarung an das 5'-Ende des Introns und das 3'-Ende des davor gelegenen Exons, die Spleißdonorstelle (Abb. 1.1.47b). Das 3'-Ende des Introns, die Spleißakzeptorstelle, ist ebenfalls definiert durch eine bestimmte Abfolge von Basen, die von dem Protein U2AF erkannt wird, das wiederum die Assoziation des U2-snRNPs vermittelt. In Vertebratengenen mit meist kurzen Exons (50–300 bp) und mehrere kb langen Introns werden Exons wahrscheinlich „definiert“, indem U1- und U2-snRNPs unterstützt durch Exon-bindende Serin-Arginin-reiche (SR)-Proteine miteinander interagieren, um die korrekten Spleißakzeptor- und -donorstellen und damit die Exons zu finden. Durch Anlagerung eines Komplexes aus U4-, U5-, U6-snRNPs wird das Spleißosom komplettiert. Spleißdonor- und -akzeptorstelle werden durch das U5-

snRNP zusammengeführt, wobei das dazwischenliegende Intron eine Schleife ausbildet. Die Exon-Intron-Grenze an der Spleißdonorstelle wird gespalten, und das 5'-Ende des Introns bindet über eine 2'-5'-Verbindung an den Verzweigungspunkt, der einige Basen vor dem 3'-Ende des Introns liegt. Danach wird auch die Intron-Exon-Grenze an der Spleißakzeptorstelle gespalten, das 3'-Ende des einen Exons mit dem 5'-Ende des anderen Exons verbunden und das nun in einer Lasso- oder Lariatstruktur vorliegende Intron mit den snRNPs freigesetzt. Während das Intron sofort von Ribonukleasen verdaut wird, werden die snRNPs in weiteren Prozessierungsrunden wieder verwendet. Der biologische Sinn dieser aufwendigen Prozessierung, bei der in manchen RNAs weit mehr als 20 Introns und mehr als 3/4 der Primärtranskriptsequenzen entfernt werden, ist nicht völlig geklärt. Möglicherweise bietet es einen evolutionären Vorteil, funktionell wichtige Genbereiche durch unwichtige Sequenzen voneinander zu trennen und dadurch die Neukombination funktioneller Abschnitte auf der DNA-Ebene zu erleichtern. Darüber hinaus erlaubt diese Exon-Intron-Struktur alternatives Spleißen, ein Vorgang, bei dem durch die Aktivität Alternativer Spleißfaktoren (ASF) Exone zusätzlich eingebaut oder aber aus der reifen mRNA herausgelassen werden können. Dies eröffnet für die Zelle die Möglichkeit, von einem Gen mehrere verschiedene Genprodukte zu erhalten.

Das gleiche Ziel hat vermutlich RNA-editing, bei dem einige wenige Prä-mRNAs schon vor dem Spleißen im Kern sequenzspezifisch modifiziert werden, wobei C in U, U in C oder A in Inosin (I) umgewandelt werden kann.

Sobald die mRNA vollständig prozessiert ist, wird sie durch die Kernporen ins Zytoplasma geschleust, wobei nukleäre Cap-bindende Proteine

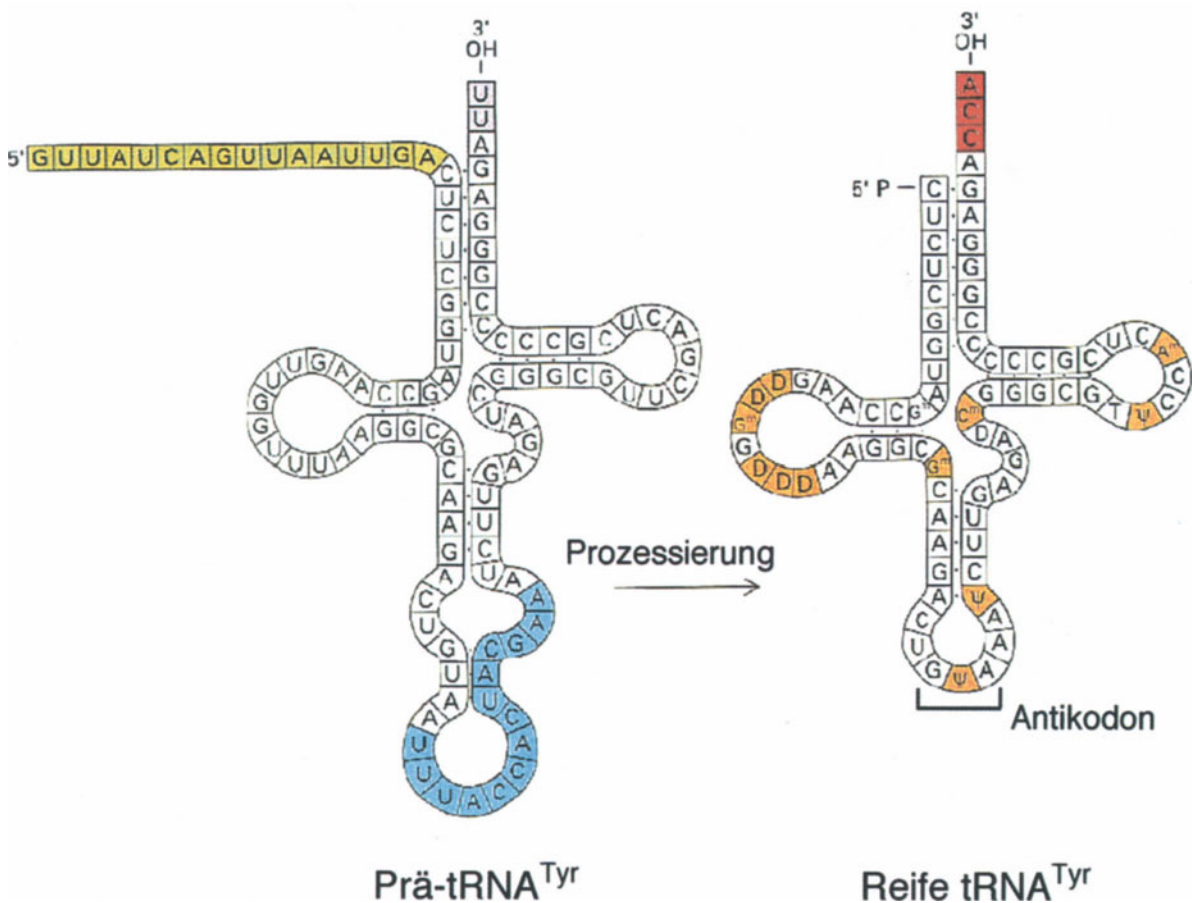


Abb. 1.1.44. Prozessierung von Tyrosin-Prä-tRNA. Ein 14 Nukleotide langes Intron (cyan) wird entfernt, 16 Nukleotide (grün) werden am 5'-Ende durch RNase P abgeschnitten und U-Reste am 3'-Ende werden durch CCA (rot) ersetzt.

Mehrere Nukleotide (orange) werden chemisch modifiziert (Veränderte Basen: D Dihydrouridin, Ψ Pseudouridin), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 533

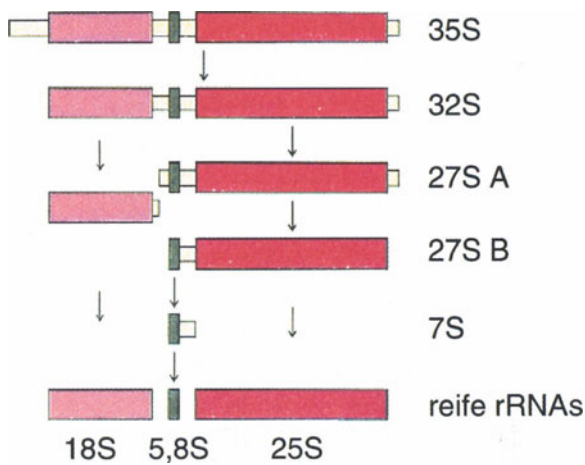


Abb. 1.1.45. Prozessierung der Prä-rRNA in Hefe. Ein gemeinsamer Vorläufer wird über mehrere Zwischenstufen zu den drei reifen rRNAs abgebaut, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 530

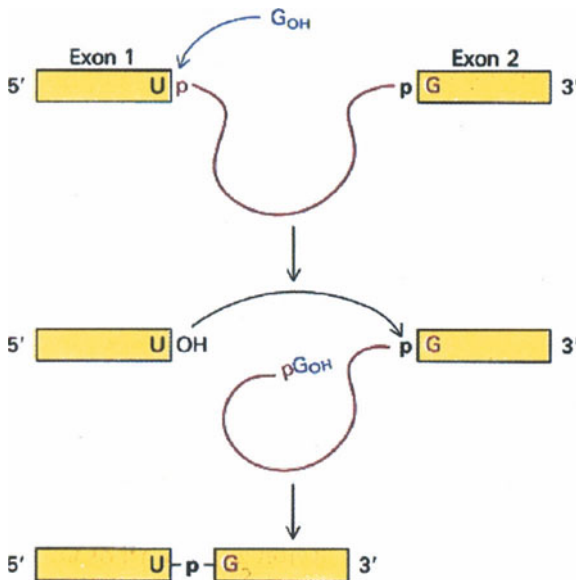


Abb. 1.1.46. Selbstsplicing von Intronen der Gruppe I von Tetrahymena. Ein Guanosin (cyan) interagiert als Kofaktor bei der Spleißreaktion, die die beiden Exons (gelb) verbindet und das Intron (rot) freisetzt, wiedergegeben mit Genehmigung aus Darnell et al. [1990], S 1208

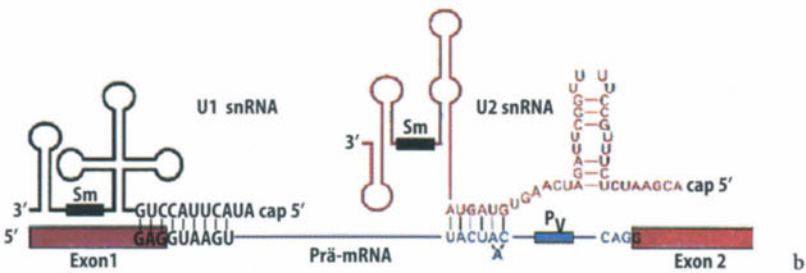
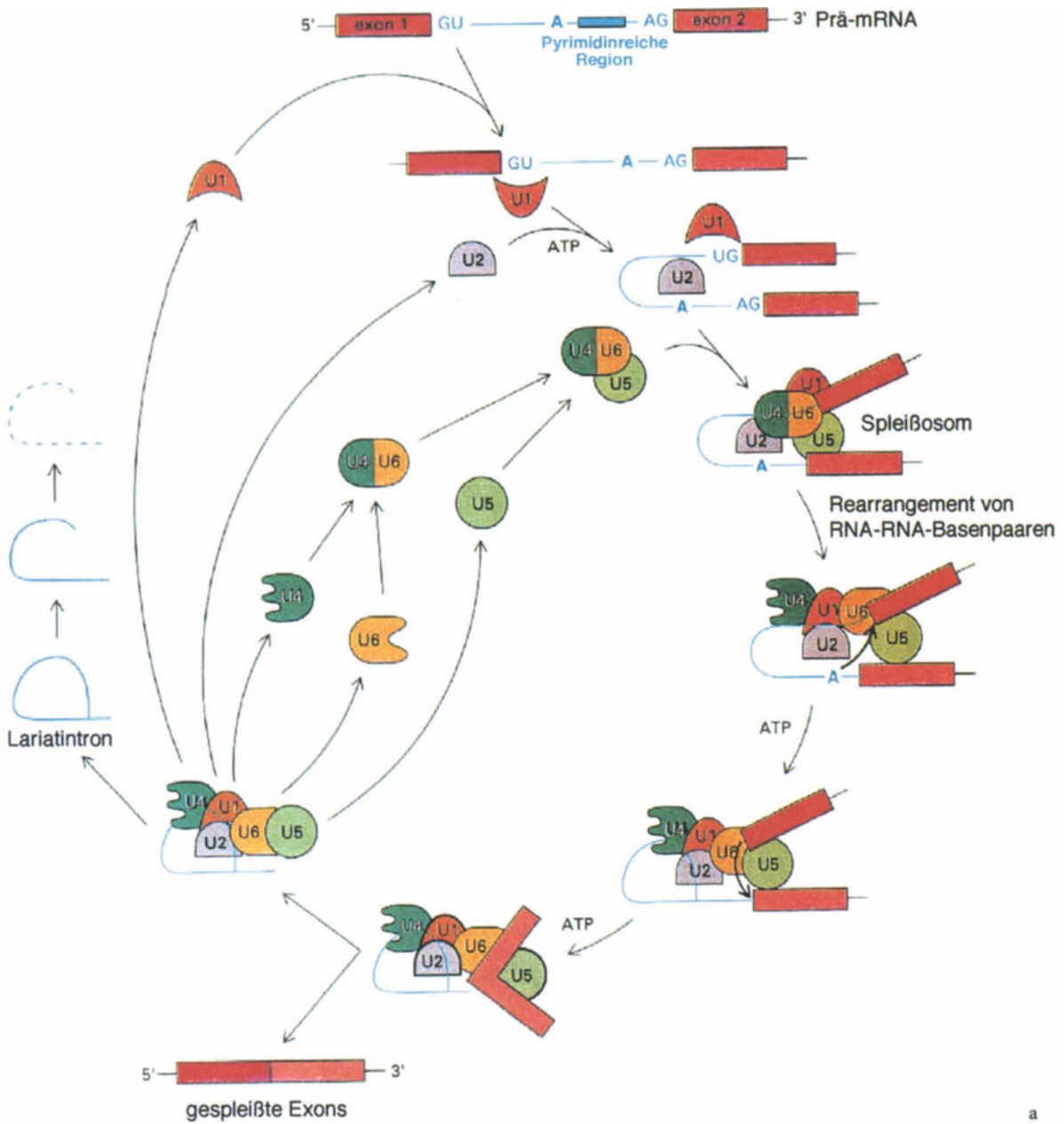
den Transport vermitteln. Im Zytoplasma dissoziieren die nukleären RNA-bindenden Proteine von der mRNA, und zytoplasmatische Proteine nehmen ihren Platz ein, darunter das Poly(A)-bindende Protein, das das 3'-Ende der RNA bedeckt.

1.1.2.8 Translation und genetischer Kode

1.1.2.8.1 Übersicht

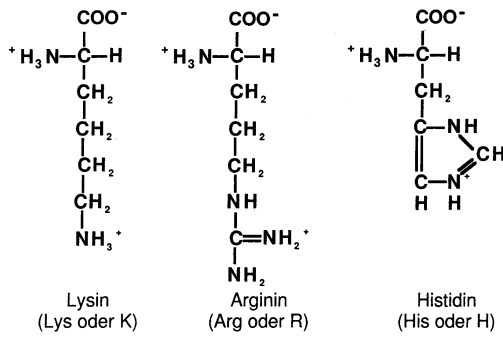
Sobald die prozessierte mRNA ins Zytoplasma gelangt ist, beginnt die Translation, der Prozeß der Übersetzung der auf ihr in der Sprache der vier Nucleotide gespeicherten Information in die Sprache der Proteine mit ihren 20 Aminosäuren (Abb. 1.1.48). Als die kleinste mögliche Zahl werden dabei drei Nucleotide zu einem „Wort“ (Kodon) zusammengefaßt, das für eine Aminosäure kodiert (Abb. 1.1.49). Außerdem gibt es ein Startkodon (AUG), das gleichzeitig für Methionin kodiert, und drei Stopkodons (UAA, UAG und UGA), die das Ende des Proteins anzeigen. Die Nucleotidtripletts auf der mRNA werden dabei von komplementären Tripletts, den Antikodons, auf den tRNAs erkannt (Abb. 1.1.44). Für die Kodon-Antikodon-Bindung ist das dritte Nucleotid des Kodontripletts oft nicht entscheidend, da das Antikodon bei einigen tRNAs an der homologen Stelle ein I trägt, das mit A, C und U paaren kann. Darüber hinaus können G und U zusätzlich zu ihren normalen Partnern Basenpaarungen miteinander eingehen. Das führt zur Redundanz des Kodes, da eine tRNA mehrere Kodons erkennen kann, so daß in Eukaryoten ca. 50 tRNAs statt der erwarteten 61 (4^3 mögliche Tripletts minus drei Stopkodons) vorkommen, immer noch bedeutend mehr als für die 20 Aminosäuren eigentlich erforderlich wären. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind dafür verantwortlich, daß die tRNAs mit einem bestimmten Antikodon mit einer definierten Aminosäure an ihrem 3'-Ende beladen

Abb. 1.1.47. a Prozessierung von Prä-mRNA. Zunächst bindet das U1-snRNP durch spezifische Basenpaarung (b) an das 5'-Ende des Introns und das 3'-Ende des davor gelegenen Exons. Das 3'-Ende des Introns wird ebenfalls durch spezifische Basenpaarung (b) vom U2-snRNP erkannt. Durch Anlagerung eines Komplexes aus U4-, U5-, U6-snRNPs wird das Spleißosom komplettiert. Spleißdonor- und -akzeptorstelle werden durch das U5-snRNP zusammengeführt, wobei das dazwischenliegende Intron eine Schleife ausbildet. Die Exon-Intron-Grenze an der Spleißdonorstelle wird gespalten, und das 5'-Ende des Introns bindet über eine 2'-5'-Verbindung an den Verzweigungspunkt, der einige Basen vor dem 3'-Ende des Introns liegt. Danach wird auch die Intron-Exon-Grenze an der Spleißakzeptorstelle gespalten, das 3'-Ende des einen Exons mit dem 5'-Ende des anderen Exons verbunden und das nun in einer Lariatstruktur vorliegende Intron mit den snRNPs freigesetzt. Während das Intron sofort von Ribonukleasen verdaut wird, werden die snRNPs in weiteren Prozessierungsrunden wieder verwendet. b Basenpaarungen zwischen der U1 und U2 snRNAs und den Exon-Intron-Grenzen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 505-506

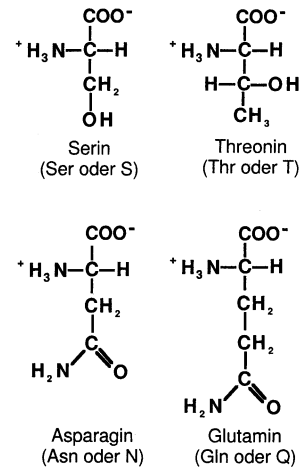


Hydrophile Aminosäuren

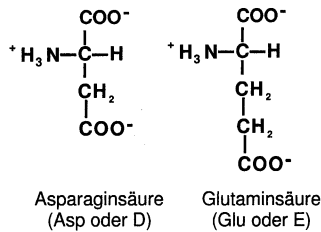
Basische Aminosäuren



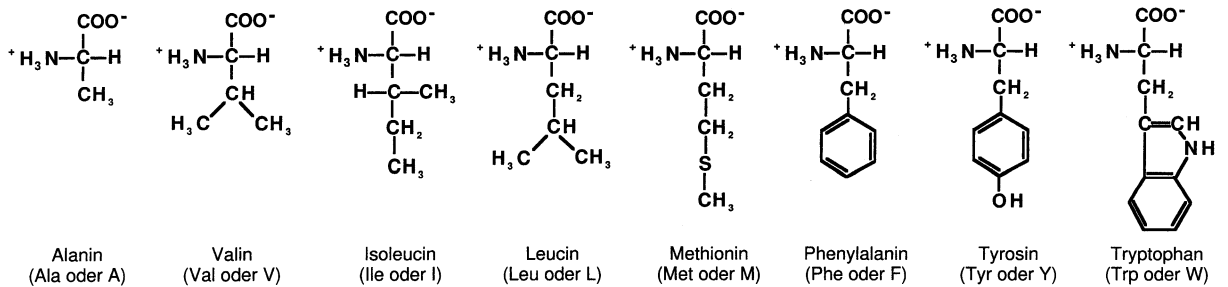
Polare Aminosäuren mit ungeladenen Seitenketten



Saure Aminosäuren



Hydrophobe Aminosäuren



Spezielle Aminosäuren

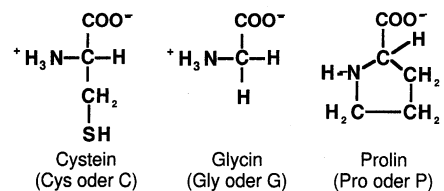


Abb. 1.1.48. Struktur der in Proteinen vorkommenden Aminosäuren, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 55

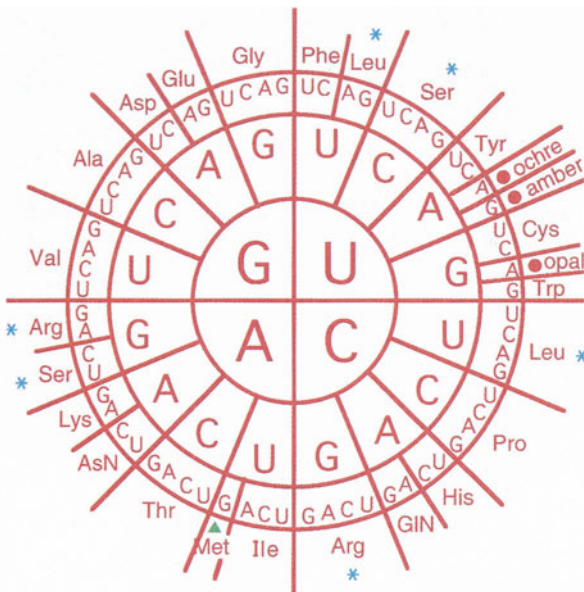


Abb. 1.1.49. Der genetische Kode. Von innen nach außen gelesen ergeben die Basentriplets die Kodons für die ganz außen angegebenen Aminosäuren, * 2mal auftretende Aminosäure, • Stopkodon, ▲ Startkodon

werden, und setzen damit den genetischen Kode fest (Abb. 1.1.50). Ribosomen stabilisieren die Kodon-Antikodon-Wechselwirkung zwischen mRNA und tRNA und verknüpfen die an tRNAs gebundenen Aminosäuren entsprechend der Abfolge der Kodons auf der mRNA. Im einzelnen läuft der Vorgang der Proteinsynthese folgendermaßen ab:

1.1.2.8.2 Initiation

Die mRNA wird zunächst von einem Proteinkomplex aus eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) an ihrer Cap-Struktur gebunden, an den sich danach die 40S-Untereinheit anlagert, die ebenfalls bereits mehrere eIFs, GTP sowie die mit Methionin beladene und das Startkodon AUG erkennende Initiator-tRNA trägt (Abb. 1.1.51). Die Zelle kann auf dieser Stufe ihre gesamte Proteinsynthese durch Phosphorylierung des eIF-2 regulieren, da phosphorylierter eIF-2 die Bindung von GTP nicht zulässt. Der 48S-Initiationskomplex bewegt sich entlang des 5'-Endes der RNA (scanning) bis die

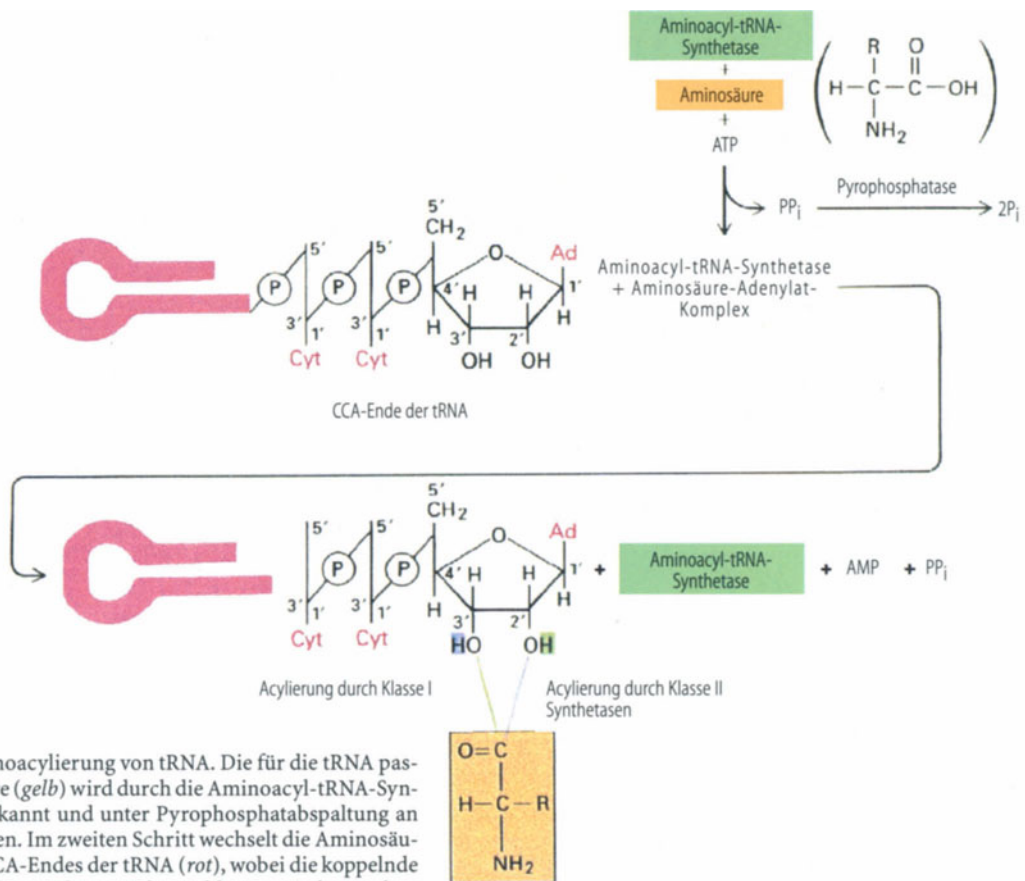


Abb. 1.1.50. Aminoacylierung von tRNA. Die für die tRNA passende Aminosäure (gelb) wird durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (grün) erkannt und unter Pyrophosphatabspaltung an Adenylat gebunden. Im zweiten Schritt wechselt die Aminosäure an das A des CCA-Endes der tRNA (rot), wobei die koppelnde OH-Gruppe von der Synthetase-Klasse abhängt, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 127

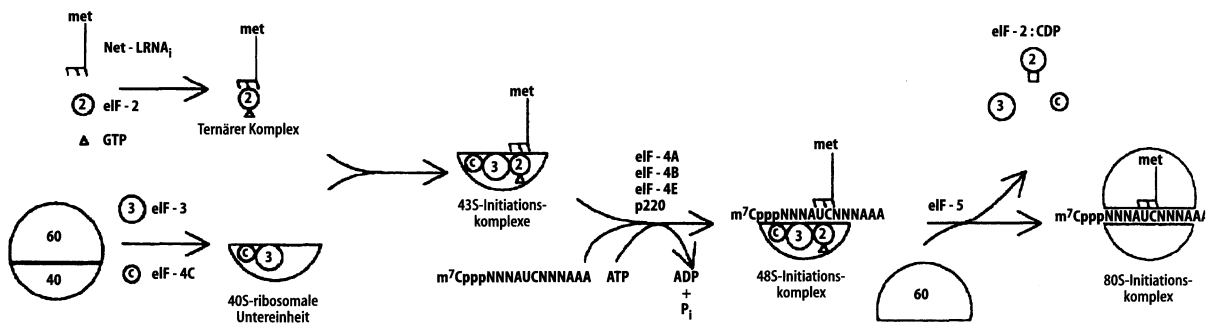


Abb. 1.1.51. Initiation der Translation. Die Initiator-Methionyl-tRNA bildet mit eIF-2 und GTP den ternären Komplex, welcher mit der 40S-Untereinheit, eIF-3 und -4C zusammen den 43S-Initiationskomplex bildet. An diesen lagert sich die mRNA über eIF-4A, -4B, -4E und p220, die die Cap-Region der RNA binden, an und der 48S-Initiationskomplex ent-

steht. Unter ATP-Spaltung bewegt sich dieser Komplex an dem 5'-Ende der mRNA entlang (scanning) bis das Antikodon der Met-tRNA das Startkodon AUG gefunden hat und sich die 60S-Untereinheit unter Vermittlung von eIF-5 und Freisetzung aller Initiationsfaktoren anlagert, wiedergegeben mit Genehmigung aus Trachsel [1991], S 110

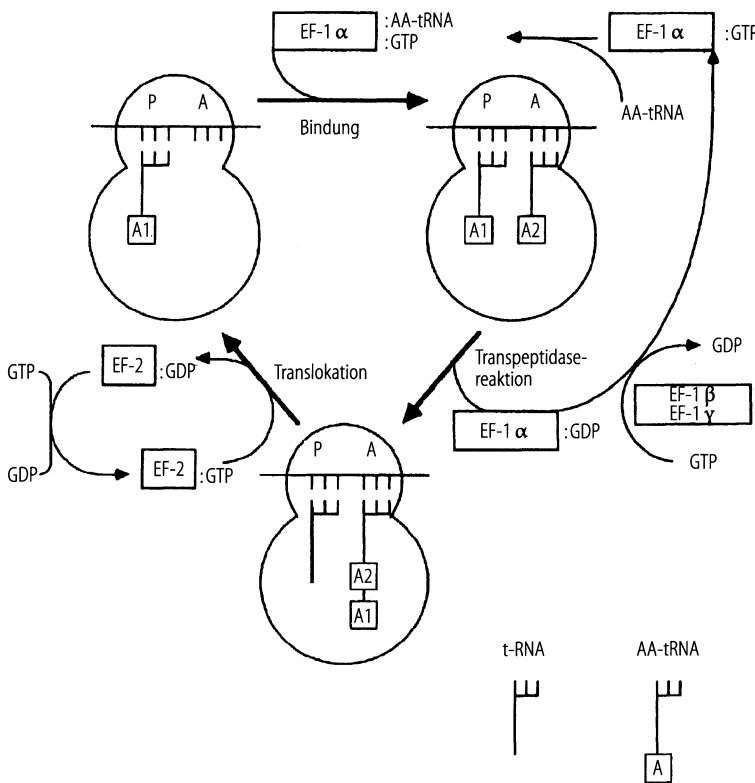


Abb. 1.1.52. Elongation der Translation. Vor jedem Elongationsschritt befindet sich die Peptidyl-tRNA am P-Ort. Der eEF-1 α -GTP-Komplex vermittelt die Bindung der für das nächste Kodon auf der mRNA spezifischen Aminoacyl-tRNA an den A-Ort. In der Transpeptidase-Reaktion wird unter GTP-Spaltung das Peptid am P-Ort an die am A-Ort angelagerte Aminosäure kovalent über eine Peptidbindung gebunden; das am eEF-1 α gebundene GDP wird durch eEF-1 β und γ gegen GTP ausgetauscht. eEF-2 rückt das Ribosom ebenfalls unter GTP-Spaltung drei Nucleotide weiter auf der mRNA vor (Translokation), wobei die am P-Ort gebundene freie tRNA zunächst an die dritte ribosomale tRNA-Bindestelle, den E-Ort (nicht eingezeichnet), transportiert und danach freigesetzt wird und die Peptid-tragende tRNA vom A-Ort zum P-Ort vorrückt, wiedergegeben mit Genehmigung aus Trachsel [1991], S 152

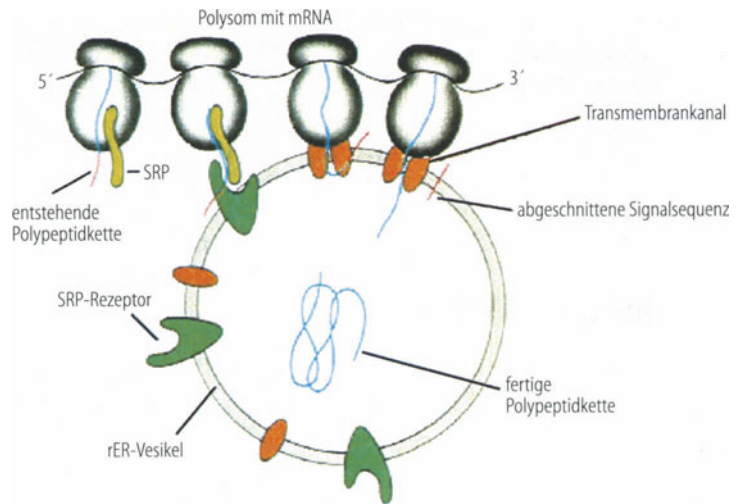
Methionyl-tRNA auf das AUG-Startkodon stößt. In den meisten Fällen ist es das erste AUG-Kodon auf der mRNA. Da aber auch die benachbarten Nucleotide bei der Erkennung eine Rolle spielen, können auch ein oder mehrere AUG-Kodons übergangen werden. Der nichtkodierende 5'-Bereich kann je nach mRNA Spezies einige wenige bis über 1000 Nucleotide lang sein und durch Ausbildung von Sekundärstrukturen eine wichtige Rolle in der Regulation der Proteinsynthese und damit der Ge-

nexpression spielen. Sobald die 40S-Untereinheit mit der Methionyl-tRNA an das Startkodon gebunden hat, assoziiert die große 60S-Untereinheit, GTP wird zu GDP gespalten und die eIFs dissoziieren ab.

1.1.2.8.3 Elongation und Termination

Nach Abschluß der Initiation befindet sich die Methionyl-tRNA am ribosomalen Peptidyl-tRNA-Bin-

Abb. 1.1.53. Proteinimport in das ER. Proteine, die in das ER transportiert werden sollen, besitzen eine Signalsequenz (rot) am zuerst synthetisierten Aminoende, die nach ihrer Synthese mit dem SRP (signal recognition particle, hellgrün) interagiert und damit die weitere Translation blockiert. Der Komplex bindet an den SRP-Rezeptor (dunkelgrün) in der ER-Membran und wird dadurch mit einem Transmembrankanal (orange) in Kontakt gebracht. Die Blockade der Translation wird aufgehoben und das entstehende Protein (cyan) wird durch den Kanal ins Innere des ER befördert, wo durch eine Signalpeptidase die Signalsequenz abgespalten wird, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 685



dungsort (P-Ort) (Abb. 1.1.52). Das Ribosom besitzt eine weitere tRNA-Bindestelle, den Akzeptorort oder A-Ort, an die die für das nächste Kodon spezifische Aminoacyl-tRNA bindet. Die beiden an benachbarte tRNAs gebundenen Aminosäuren werden durch die Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms kovalent über eine Peptidbindung verknüpft. Die Aktivität eines eukaryotischen Elongationsfaktors (eEF) rückt das Ribosom auf der mRNA drei Nukleotide weiter vor (Translokation), wobei die am P-Ort gebundene tRNA zunächst an die dritte ribosomale tRNA-Bindestelle, den E-Ort, transportiert und danach freigesetzt wird und die Peptid-tragende tRNA vom A-Ort zum P-Ort vorrückt. In der nächsten Runde wird der A-Ort wieder von der zum folgenden Kodon der mRNA passenden Aminoacyl-tRNA besetzt und die Peptidkette um eine weitere Aminosäure verlängert. Während ein Ribosom sich in der Elongationsphase befindet, kann bereits das nächste auf derselben mRNA eine neue Proteinsynthese initiieren, so daß aktiv translatierte mRNAs Polysomen bilden, mit einem Ribosom auf ca. 120 Nukleotide. Erreicht das Ribosom ein Stoppkodon, für das es keine tRNA gibt, so binden eukaryotische Releasing-Faktoren (eRF). Das fertiggestellte Protein wird freigesetzt und die ribosomale Untereinheiten und die mRNA dissoziieren. Alle mRNAs besitzen zwischen dem Stoppkodon und dem Poly(A)-Schwanz eine bis zu mehreren 100 Nukleotiden lange, nichtkodierende 3'-Region. Diese kann Sequenzen enthalten, die durch Wechselwirkung mit Proteinen die Stabilität der mRNA beeinflussen, wie AU-reiche Regionen, oder sie an das Zytoskelett binden und damit ihre Lokalisation in der Zelle bestimmen. Die Zelle kann dadurch sowohl die

Menge des von einem mRNA-Molekül produzierten Proteins als auch dessen intrazelluläre Verteilung regulieren.

1.1.2.9 Modifikation und Transport von Proteinen

1.1.2.9.1 Transport in das ER

Proteine können aber auch selbst den Ort ihrer Synthese bestimmen, indem sie bereits als naszierende Peptidkette mit anderen Proteinen wechselwirken. So besitzen die meisten membranständigen und sekretorischen Proteine an ihrem Amino-terminus eine Signalsequenz aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren, die, sobald sie aus den Ribosomen herausragt, vom Signal recognition particle (SRP) erkannt wird (Abb. 1.1.53). Die Bindung dieses SRPs an das Ribosom blockiert zunächst die Elongation der Translation. Das SRP bindet nun mit dem Ribosom an einen spezifischen Rezeptor in der Membran des rauhen ERs. Die Elongation wird fortgesetzt, und die naszierende Proteinkette wird durch einen Kanal in der ER-Membran in das ER-Lumen hineinsynthetisiert. Sobald die Signalsequenz im ER-Lumen angekommen ist, wird sie durch eine Signalpeptidase abgeschnitten. Proteine, die in eine Membran integriert werden sollen, besitzen topogene Signale, d.h. hydrophobe Sequenzabschnitte, die den Transport durch die Membran abbrechen und damit das Protein in der Membran verankern. Die durch die Membran transportierten Polypeptidketten werden von Chaperonproteinen im ER gebunden und an ihrer Faltung gehindert bis sie vollständig im ER-Lumen

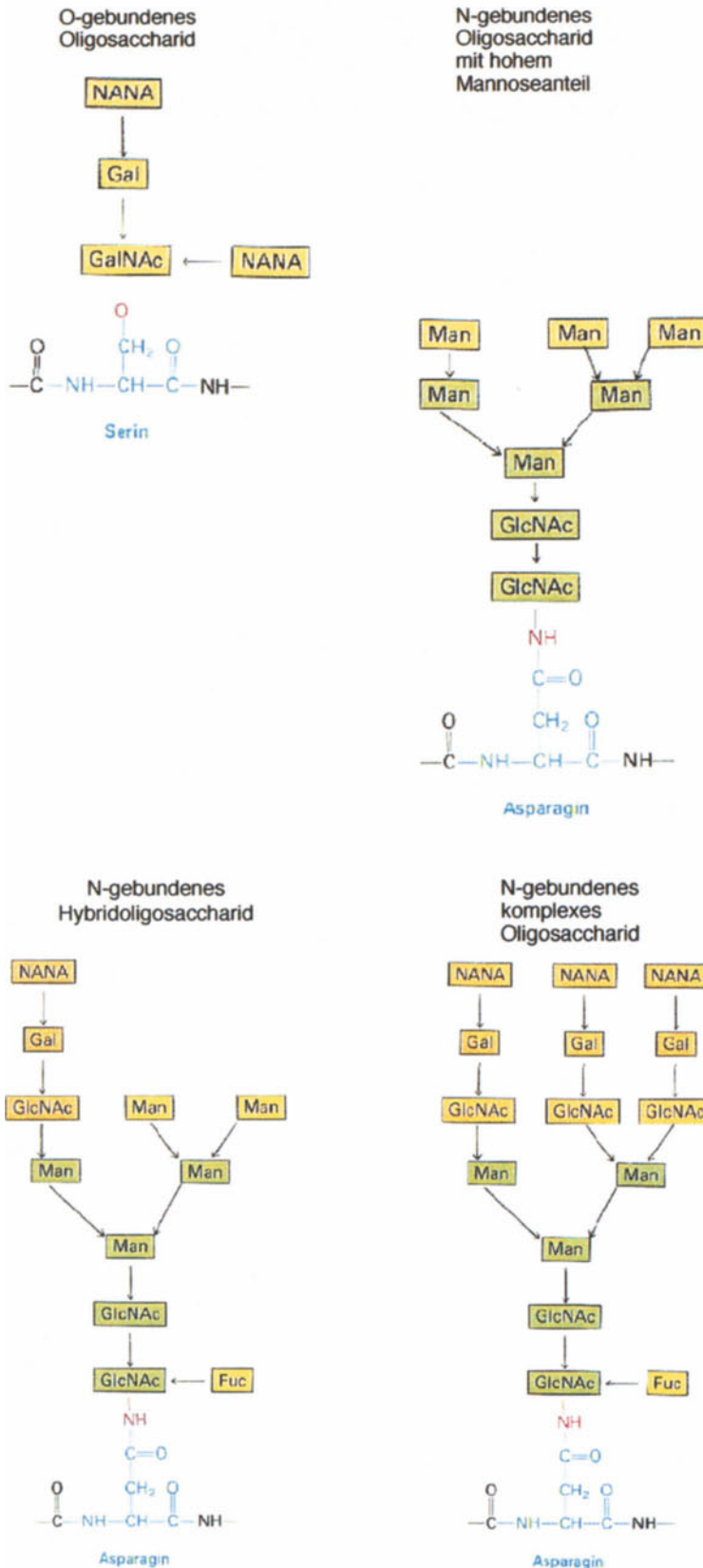


Abb. 1.1.54. Struktur typischer Oligosaccharidseitenketten. *NANA* N-Azetylneuraminsäure (Sialinsäure), *Gal* Galaktose, *GlcNAc* N-Azetylglucosamin, *GalNAc* N-Azetylgalaktosamin, *Man* Mannose, *Fuc* Fucose. Die 5 Zuckerreste, die in allen N-glykosylierten Proteinen vorkommen, sind grün markiert, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 701

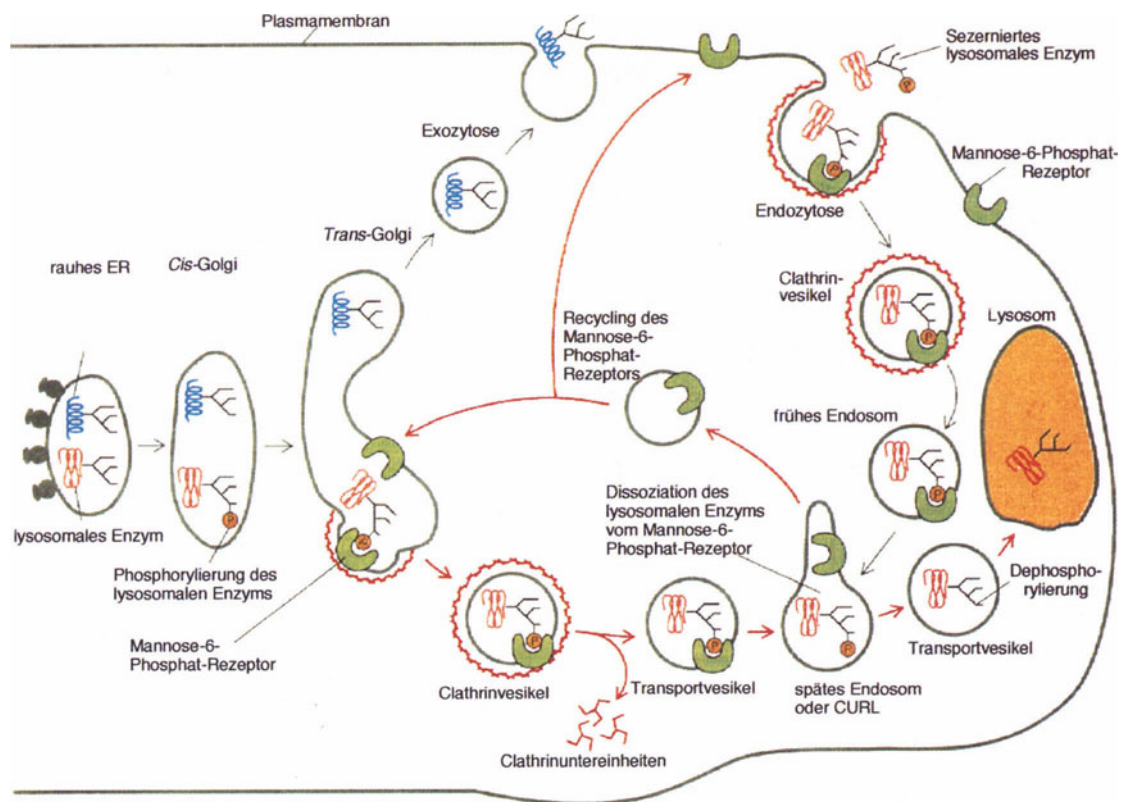


Abb. 1.1.55. Proteinimport in Lysosomen über den Mannose-6-Phosphat-Weg (weitere Erläuterungen s. Text), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 710

angekommen sind. Dort dissoziieren die Chaperone und entlassen die neue Peptidkette, die spontan die richtige Tertiärstruktur annimmt. Derartige Chaperone sorgen in fast allen Kompartimenten der Zelle für die korrekte Faltung von Proteinen.

1.1.2.9.2 Glykosylierung

Der überwiegende Anteil der Proteine, die ins ER gelangen, wird glykosyliert. Spezifische Enzyme koppeln Saccharide sowohl an die OH-Gruppe von Serinresten (O-Glykosylierung) als auch an die NH₂-Gruppe von Asparagin (N-Glykosylierung) (Abb. 1.1.54). Während bei der O-Glykosylierung einzelne Saccharidreste angehängt werden und sich relativ kurze Oligosaccharidketten bilden, wird auf das Asparagin ein bereits vorsynthetisiertes, verzweigtes Oligosaccharid übertragen. Es besteht u. a. aus Mannose und N-Azetylglukosamin und ist vor seiner Übertragung über ein langkettiges Lipidmolekül, das Dolichol, in der Membran des ER verankert. Die meisten Proteine werden nach der Glykosylierung zum Golgi-Apparat transportiert; diejenigen, die im ER verbleiben sollen,

werden dort von einem Rezeptor festgehalten, der die Aminosäuresequenz am C-Terminus dieser Proteine Lysin-Asparagin-Glutamin-Leucin (KDEL) erkennt. Im Golgi-Apparat werden die Oligosaccharidketten weiter modifiziert. So entstehen z. B. die Blutgruppenantigene A, B und 0 durch das Anhängen von N-Azetylgalaktosamin (A), Galaktose (B) oder keiner weiteren Saccharide (0) an bestimmte O-glykosylierte Proteine durch Enzyme, die nur die Träger einer Blutgruppe synthetisieren können.

1.1.2.9.3 Transport in Lysosomen

Proteine, die in Lysosomen transportiert werden sollen, werden im Golgi-Apparat durch Phosphorylierung von an Asparagin gebundenen Mannose-resten modifiziert (Abb. 1.1.55). Derart phosphorylierte Proteine werden im Trans-Golgi-Apparat von membranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren erkannt und gebunden. Danach schnüren sich Vesikel ab, die von einem Fasernetz aus Clathrin eingeschlossen sind, das aus 12 Fünfecken und 8 Sechsecken besteht und damit einem Fußball äh-

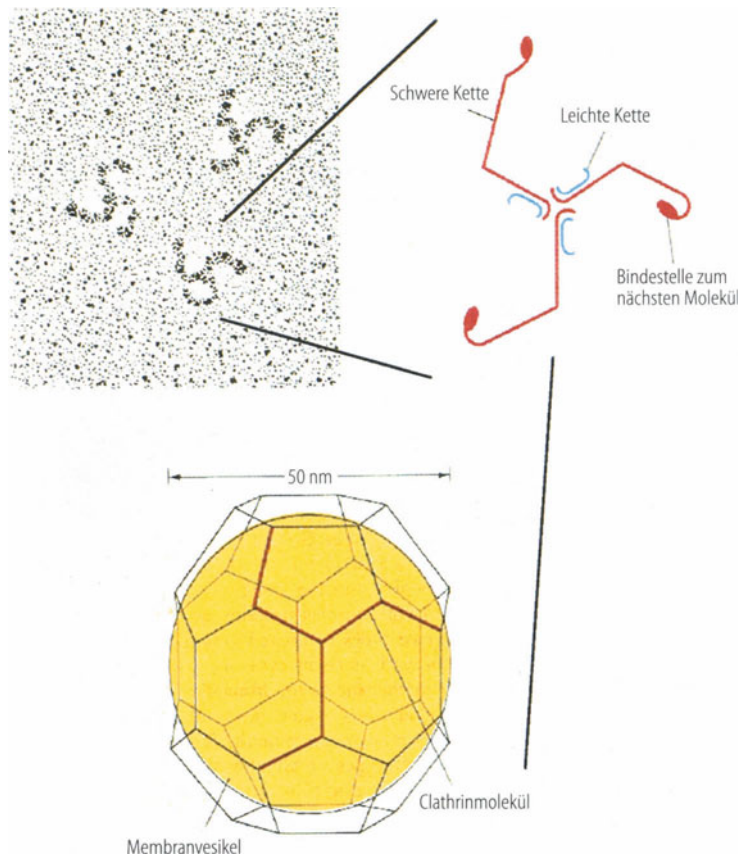


Abb. 1.1.56. Struktur (in elektronenmikroskopischer Aufnahme und schematisch) von Clathrin und Bildung eines Clathrin-ummantelten Vesikels. Ein Clathrinmolekül besteht aus drei schweren und drei leichten Ketten und ist leicht gewölbt (nicht sichtbar in Abbildung). 36 Clathrinmoleküle lagern sich zu dem ein Membranvesikel umschließenden „Ball“ aus 12 Fünf- und 8 Sechsecken zusammen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 712

nelt (Abb. 1.1.56). Über eine weitere Zwischenstufe, in der die Proteine wieder dephosphoryliert werden, gelangen sie schließlich durch Vesikelfusion in das Lysosom. Manche lysosomalen Proteine werden sogar sezerniert und von Plasmamembranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren durch Endozytose in Clathrin-ummantelte Vesikel aufgenommen und zu Lysosomen transportiert.

1.1.2.9.4 Sekretion

Die Sekretion von Proteinen wird durch verschiedene Vesikel vom Trans-Golgi-Apparat aus durchgeführt. Wie schon beim Transport in Lysosomen erkennen spezifische Proteine, wie die rab-Superfamilie, bestimmte Vesikel am Phosphorylierungszustand der Phosphatidylinositollipide (Abb. 1.1.3) und fusionieren sie unter GTP-Spaltung mit der Zielmembran (Abb. 1.1.57). Während kontinuierlich sezernierte Proteine durch nicht von Clathrin umgebene Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden, werden Proteine, die reguliert auf einen Stimulus hin sezerniert werden sollen, in Clathrin-ummantelten Vesikeln gespeichert. Dort wer-

den bei vielen Hormonvorläuferproteinen (Prohormonen) die aktiven Hormone durch spezifische Enzyme (Konvertasen) abgespalten. Für die richtige Sortierung sorgen im Trans-Golgi-Apparat Proteine wie Chromogranin B und Sekretogranin, die für die regulierte Sekretion vorgesehene Proteine binden, woraufhin der Einschluß in die richtigen Vesikel erfolgt. Wird die Zelle stimuliert, z.B. durch den Einstrom von Kalziumionen, so verschmelzen die sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran und setzen das aktive Hormon frei.

1.1.2.9.5 Transport in die Mitochondrien

Proteine, die im Zellkern kodiert sind und in Mitochondrien importiert werden sollen, werden zunächst durch zytoplasmatische Ribosomen synthetisiert und von Chaperonen unter ATP-Spaltung in einem ungefalteten Zustand gehalten (Abb. 1.1.58). Sie besitzen am N-Terminus eine Matrix-spezifische Signalsequenz, die von einem Rezeptorprotein in der äußeren Membran des Mitochondriums erkannt wird. Es transportiert das Protein zu einer Stelle, an der die innere und äußere Membran des Mito-

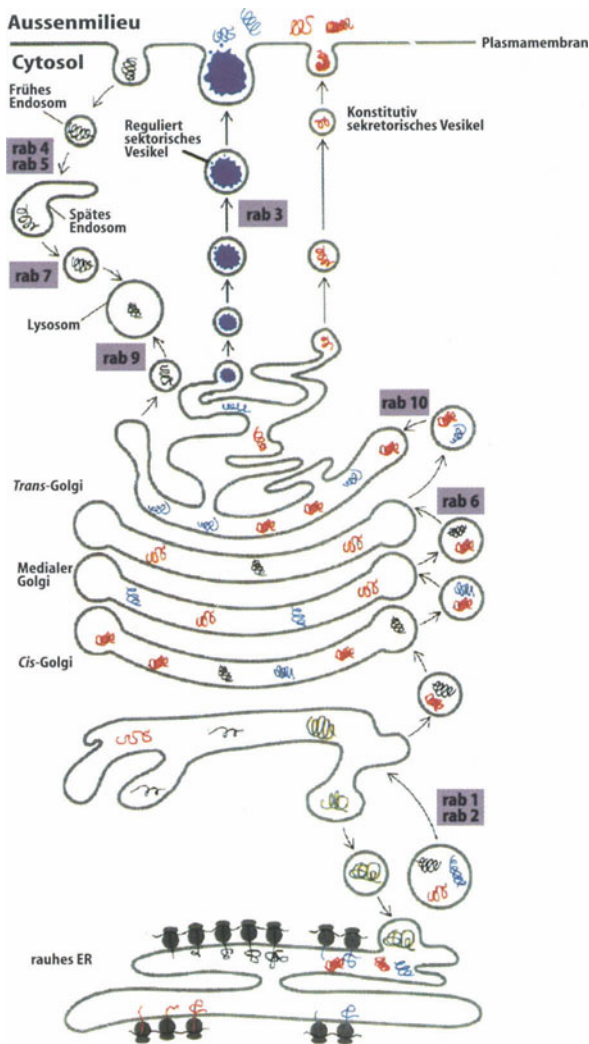


Abb. 1.1.57. Schema der Sekretion von Proteinen. Die angegebenen rab-Proteine steuern die einzelnen Vesikelfusionen (weitere Erläuterungen s. Text), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 718

chondriums direkten Kontakt haben und durch einen von Proteinen gebildeten Transportkanal durchspannt werden. Das Protein wird nun durch den Kanal in die Matrix des Mitochondriums transportiert, wo es von anderen Chaperonen gebunden und korrekt gefaltet wird und eine Protease die Signalsequenz abspaltet. In den Intermembranraum der Mitochondrien gelangen Proteine wahrscheinlich über den gleichen Weg durch einen nachgeschalteten Rücktransport nur durch die innere Membran nach außen. Proteine, die in die innere oder äußere Membran eingelagert werden sollen, enthalten topogene Signalsequenzen, die einen der erwähnten Transportprozesse blockieren und das Protein damit in der richtigen Membran verankern.

1.1.2.9.6 Transport in Peroxisomen

Proteine, die in Peroxisomen transportiert werden sollen, werden ebenfalls im Zytoplasma synthetisiert und enthalten entweder, wie die mitochondrialen Proteine eine N-terminale Signalsequenz oder die Sequenz Serin-Lysin-Leucin (SKL) an ihrem C-Terminus. Der Import in die Peroxisomen wird ähnlich wie beim Mitochondrium über für diese Sequenzen spezifische membranständige Rezeptoren vermittelt.

1.1.2.9.7 Transport in den Kern

Da im Zellkern die zur Proteinsynthese notwendigen Zellorganellen nicht lokalisiert sind, werden Proteine, die dort benötigt werden, wie Transkriptionsfaktoren, Polymerasen, aber auch ribosomale Proteine, zunächst im Zytoplasma synthetisiert und dann in den Kern importiert. Proteine mit einem $MG < 60000$ können frei durch die Poren in den Kern diffundieren, größere Proteine besitzen ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das meist aus mehreren aufeinanderfolgenden, positiv geladenen Aminosäuren besteht. Das neu synthetisierte Protein wird über das NLS an Proteine im Zytoplasma, wie das Importin, gebunden, die es mit Hilfe der GTPase Ran unter GTP-Spaltung durch die Kernporen in den Zellkern schleusen, wo das dann an Ran gebundene GDP durch RCC1 gegen GTP ausgetauscht wird (Abb. 1.1.59). Dieser Prozess kann durch Inhibitoren gehemmt werden, die das NLS maskieren und erst auf einen Stimulus hin das Protein für den Kernimport freigeben.

1.1.3 Von der Eizelle zum Organismus – genetische Steuerungen der Entwicklung

1.1.3.1 Meiose und Rekombination

Ein entscheidender Faktor in der Evolution höherer Organismen war die Erfindung der sexuellen Reproduktion, die Produktion von Nachkommen, deren Genom aus den Chromosomen zweier Elternteile zusammengesetzt ist. Dazu bilden diese Elternteile Keimzellen aus, die nur den 1fachen Chromosomensatz besitzen, also haploid sind, im Gegensatz zu den restlichen Körperzellen, die diploid sind, also zwei Chromosomensätze aufweisen. Dies geschieht im Vorgang der Meiose, für den die Chromosomen, wie bei der Mitose, zunächst du-

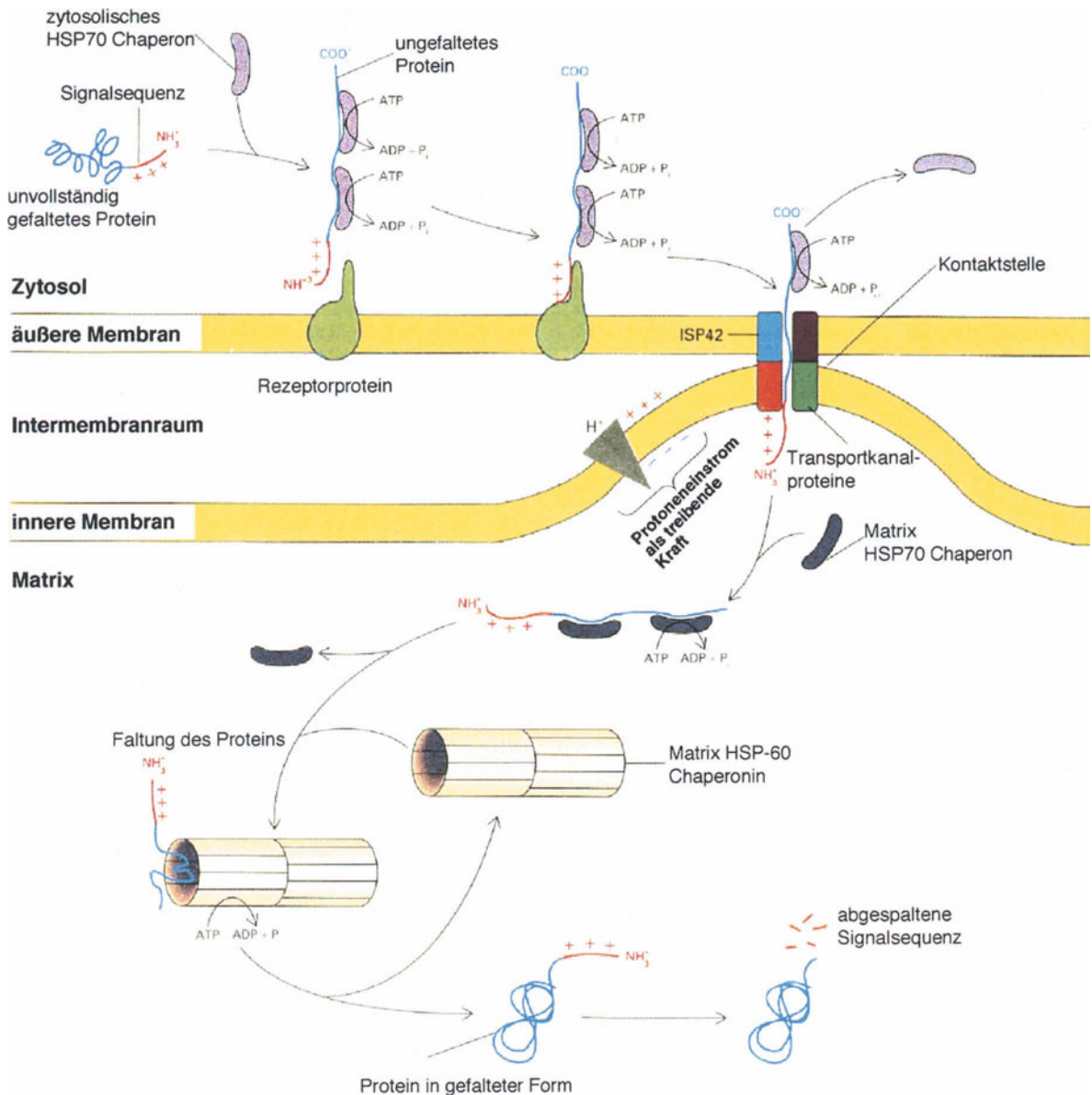


Abb. 1.1.58. Proteinimport in Mitochondrien. Die meisten mitochondrialen Proteine (cyan) werden im Zytoplasma synthetisiert und durch Chaperone (violett) im partiell ungefalteten Zustand gehalten. Die für den Mitochondrienimport notwendige Signalsequenz (rot) interagiert mit einem Rezeptor auf der äußeren Mitochondrienmembran (hellgrün). Der Rezeptor bringt das Protein zu einer Kontakt-

stelle, wo es durch einen beide Membranen durchspannenden Kanal direkt in die Matrix transportiert wird. Dabei wirkt der Protoneneinstrom über die innere Membran als treibende Kraft. In der Matrix binden andere Chaperone und sorgen für eine korrekte Faltung des Proteins bevor die Signalsequenz abgespalten wird, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 821

pliziert werden, sich dann aber die beiden entstehenden Chromatiden mit den beiden Chromatiden des zweiten Chromosoms gleichen Typs zusammenlagern (Abb. 1.1.60). Durch den Vorgang der Rekombination können Abschnitte des paternen und des maternen Chromosoms ausgetauscht werden, wodurch sich die in der sexuellen Reproduktion gewünschte Alleldurchmischung noch ver-

stärkt (Abb. 1.1.61). Vermutlich kommt es dabei zu Strangbrüchen in beiden Chromatiden und die freien DNA-Stränge hybridisieren mit den komplementären Strängen des anderen Chromatids unter Verdrängung des ursprünglichen Gegenstrangs. Der verdrängte Strang paart mit dem Gegenstrang des verdrängenden Strangs, wodurch zwei Heteroduplexe entstehen, also Doppelstränge, die, auf-

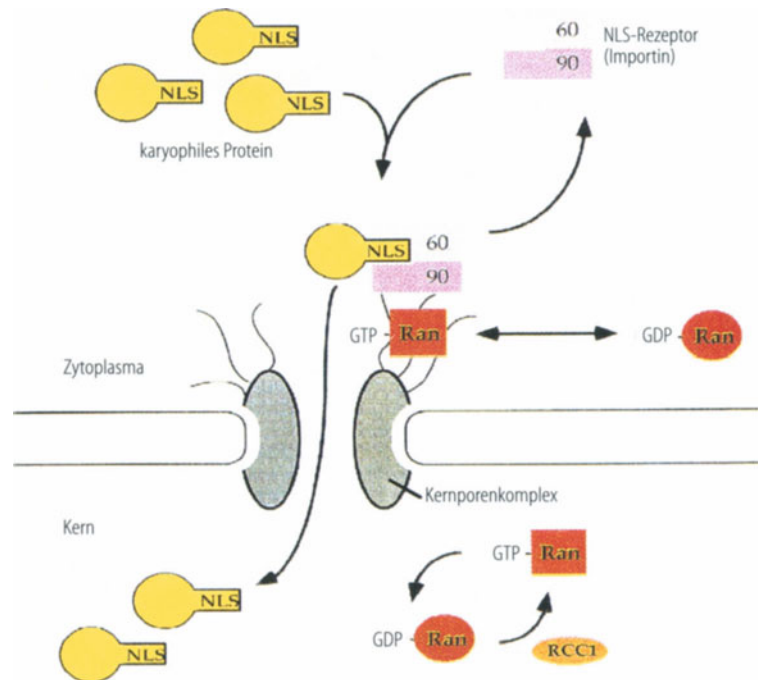


Abb. 1.1.59. Proteinimport in den Zellkern (Erläuterung s. Text). Für den Kernimport bestimmte (karyophile) Proteine (gelb) besitzen ein NLS (nuclear localization signal), das durch einen spezifischen Rezeptor (Importin, violett) erkannt wird. Der Komplex interagiert mit Hilfe von Ran-GTP (rot) mit dem Kernporenkomplex (grau), und das Protein wird unter GTP-Spaltung in den Kern transportiert. Proteine wie RCC1 (ocker) tauschen das GDP an Ran wieder gegen GTP aus und machen dadurch einen neuen Importzyklus möglich, wiedergegeben mit Genehmigung aus Zabel u. Hurt, [1995]

grund der unterschiedlichen Herkunft der beiden DNA-Einzelstränge, einzelne Fehlpaarungen enthalten können. Reparaturmechanismen setzen ein, die die Sequenz eines der beiden Stränge auf dem Doppelstrang festschreiben. Durch Ligation der eindringenden Gegenstränge mit den bereits vorhandenen entsteht eine Holliday-Struktur, die nur durch weitere Einzelstrangbrüche wieder in zwei getrennte DNA-Doppelstränge aufgelöst werden kann. Dabei werden entweder die alten Chromatiden wiederhergestellt oder es entstehen neu rekombinierte Chromatiden. Selbst wenn es nicht zur Rekombination kommt, kann durch die Heteroduplexbildung und die anschließende Reparatur eine genetische Veränderung im Bereich des Rekombinationsereignisses zurückbleiben, was zum Phänomen der Genkonversion führt.

In der ersten meiotischen Teilung wird je ein Chromosom eines Chromosomenpaars in eine der beiden entstehenden Tochterzellen verbracht. Es schließt sich die wie eine Mitose verlaufende zweiten meiotische Teilung an, in der die Chromatiden voneinander getrennt werden und deren Produkt haploide Keimzellen sind.

1.1.3.2 Frühe Embryonalentwicklung

Im Vorgang der Befruchtung verschmelzen die Keimzellen zweier Individuen zu einer diploiden

Zygote, bei Vertebraten ist das die befruchtete Eizelle. Die zunächst noch getrennten, materalen und paternalen Kerne (Pronuklei) verschmelzen ebenfalls, und das Ei beginnt sich zu teilen. Bei der Maus wird nach drei Tagen ein Stadium mit 16 Zellen erreicht, die alle noch totipotent sind, also einen vollständigen Organismus bilden könnten. Aus dieser Morula bildet sich die Blastozyste, die nun erstmals zwei unterschiedlich differenzierte Zelltypen enthält. Die außen liegenden Zellen der Morula haben sich zum Trophektoderm entwickelt, einer Zellschicht, die einen Hohlraum einschließt, in dem sich die innere Zellmasse befindet. Während sich aus der inneren Zellmasse später der ganze Embryo entwickelt, bildet das Trophektoderm die Plazenta und andere extraembryonale Gewebe.

Der bis zum Blastozystenstadium frei schwimmende Embryo setzt sich nun in der Uteruswand fest. Es schließt sich der Prozeß der Gastrulation an, bei dem sich eine Zellschicht ins Innere des Embryos einfaltet und der Embryo eine dreischichtige Struktur annimmt. Das interne Epithel, das Endoderm, bildet in der weiteren Embryogenese den Darm und die assoziierten Organe Lunge und Leber aus, das externe Epithel, das Ektoderm, bildet die Epidermis, und die dazwischen eingewanderten Zellen des Mesoderms sind die Vorläufer für Bindegewebe, Muskeln, das Gefäß- und das Urogenitalsystem. Matrixmoleküle spielen bei dieser Dreiteilung wahrscheinlich eine wichtige Rolle.

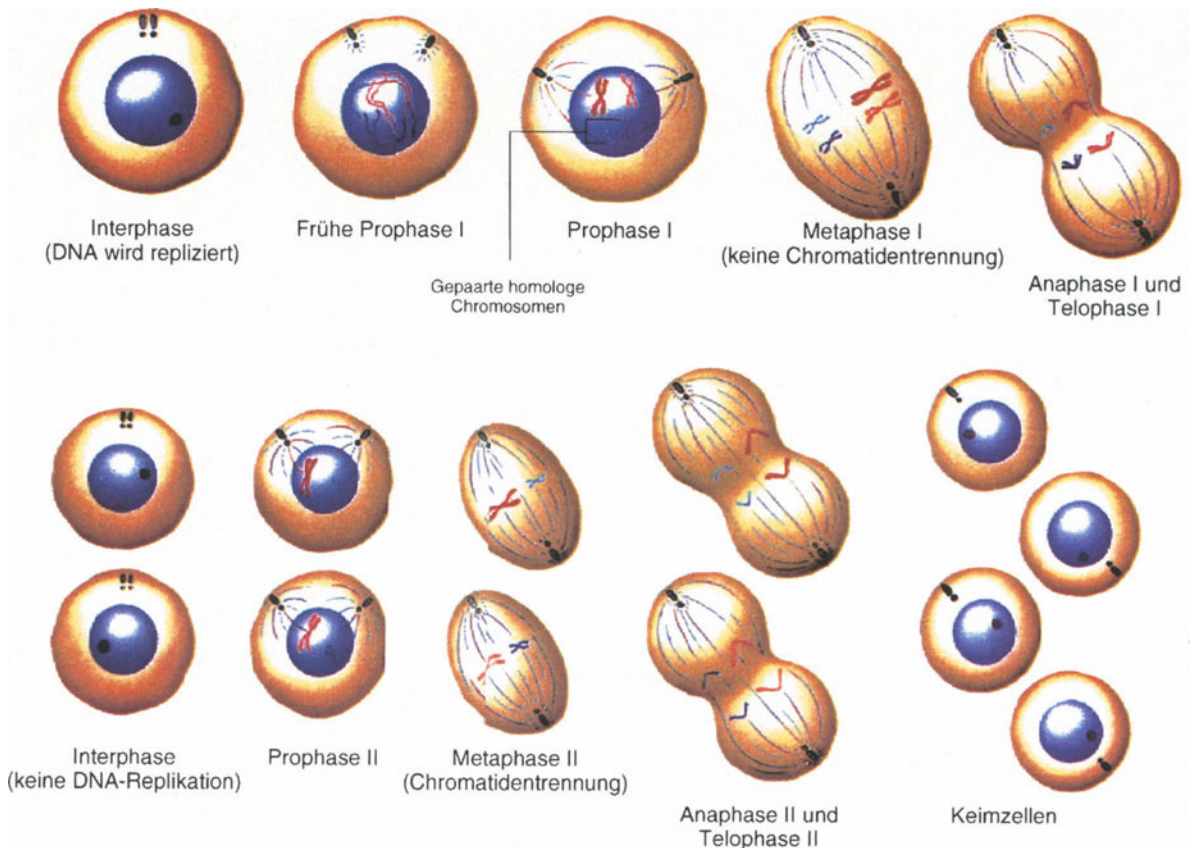


Abb. 1.1.60. Ablauf der Meiose. Die zweite Zellteilung entspricht im Ablauf der Mitose. In der Prophase I paaren die in der Interphase I replizierten homologen Chromosomen (insgesamt also vier DNA-Stränge). In Metaphase, Anaphase und Telophase I wird je ein Chromosom in jede der sich bil-

den Tochterzellen transportiert. In Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase II werden wie in einer Mitose die beiden Chromatiden eines Chromosoms in je zwei Tochterzellen aufgeteilt, so daß vier haploide Keimzellen entstehen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 184

Während ektodermale und endodermale Zellen E-Cadherin produzieren, verlieren Mesodermzellen diese Eigenschaft und können sich aus dem Verband lösen. Induziert wird die Mesodermbildung durch Wachstumsfaktoren z.B. aus der Fibroblastenwachstumsfaktor(FGF)- oder Transforming-growth-Faktor- β (TGF β)-Superfamilie.

Auch in nachfolgenden Differenzierungsprozessen sind diese und andere Hormone als Induktoren aktiv, die in Zielzellen die Expression von Matrixmolekülen und Transkriptionsfaktoren modulieren und damit die Zelle determinieren, d.h. auf eine Differenzierungsrichtung festlegen. So werden im nächsten Schritt der Ontogenese, der Neurulation, vom Mesoderm derartige Faktoren freigesetzt, die benachbarte Ektodermzellen zur Ausbildung des Neuralrohrs und der Neuralplatte veranlassen. Dieser Vorgang wird ebenfalls von Veränderungen in der Cadherinsynthese begleitet: Die betroffenen Ektodermzellen verlieren die Fähigkeit, E-Cadhe-

rin herzustellen, und beginnen die Synthese von N-Cadherin.

1.1.3.3 Gene und Differenzierung

An einigen ausgewählten Beispielen sollen im folgenden molekulare Vorgänge bei der weiteren Ausdifferenzierung des Organismus und die daran beteiligten Faktoren dargestellt werden.

1.1.3.3.1 Ausbildung von anterior-posterior-Achsen

Die Ausbildung der anterior-posterior(a.-p.)-Achse wird durch homöotische oder Hox-Gene gesteuert. Diese Gene kodieren auch für Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl nachgeschalteter Gene aktivieren und damit die Differenzierung eines bestimmten Körperabschnitts auslösen. Die Hox-Gene sind als Genfamilie nebeneinander auf dem

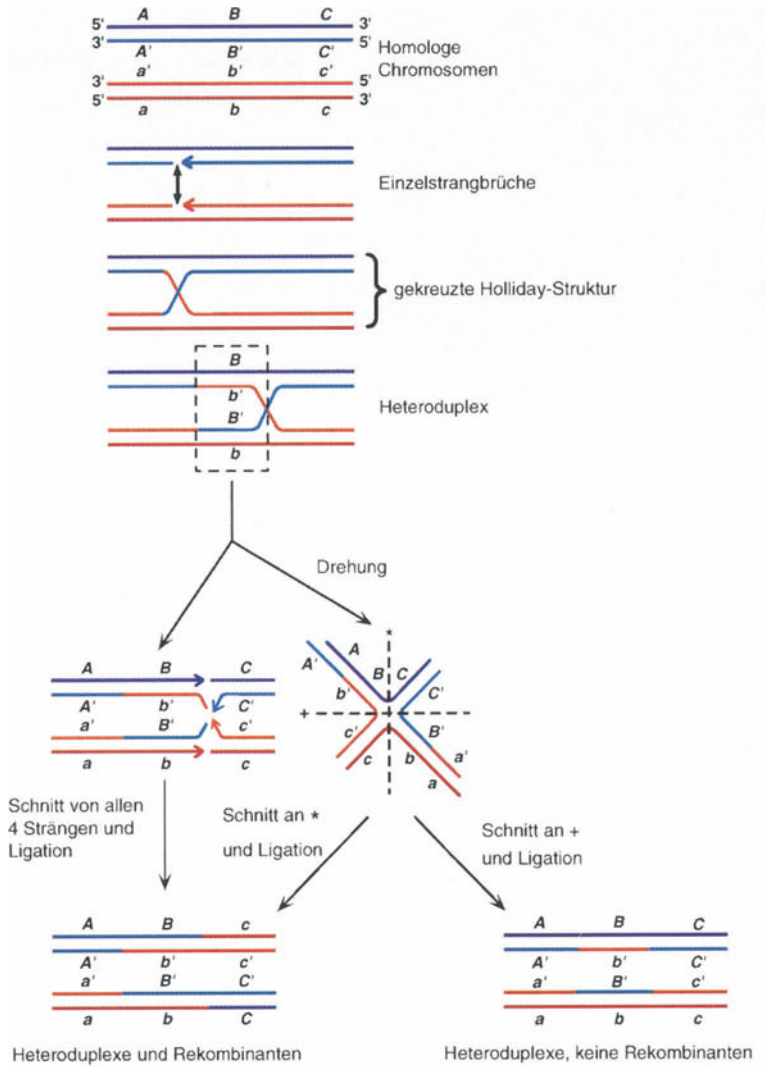


Abb. 1.1.61. Schema der Rekombination (Erläuterung s. Text), wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 390

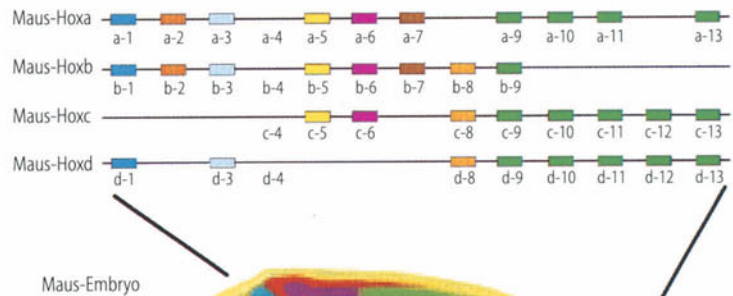


Abb. 1.1.62. Hox-Genfamilie der Maus mit in der gleichen Farbe markierten Bereichen der Aktivität einzelner Gene im Mausembryo, wiedergegeben mit Genehmigung aus Carroll [1995]

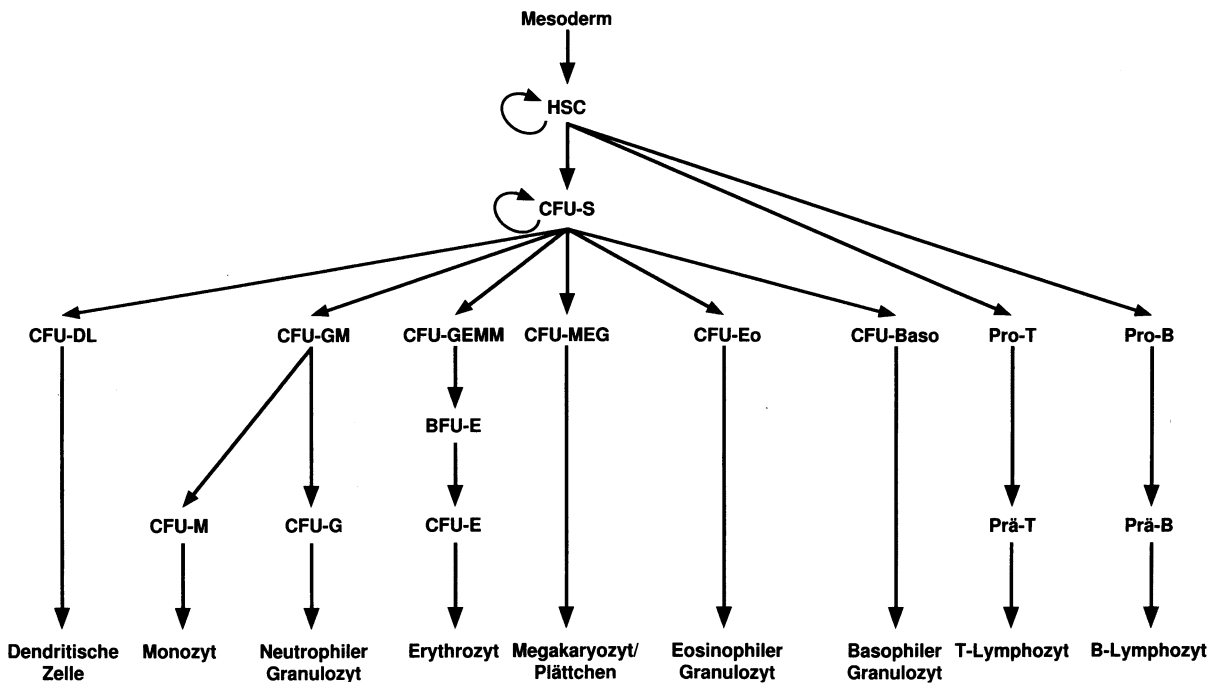


Abb. 1.1.63. Hämatopoietische Differenzierung. Aus dem Mesoderm differenzieren hämatopoietische Stammzellen (HSC) aus, die sich unter Erhaltung ihrer Pluripotenz vermehren können. Über mehrere Zwischenstufen entstehen aus diesen Zellen alle zirkulierenden Blutzellen

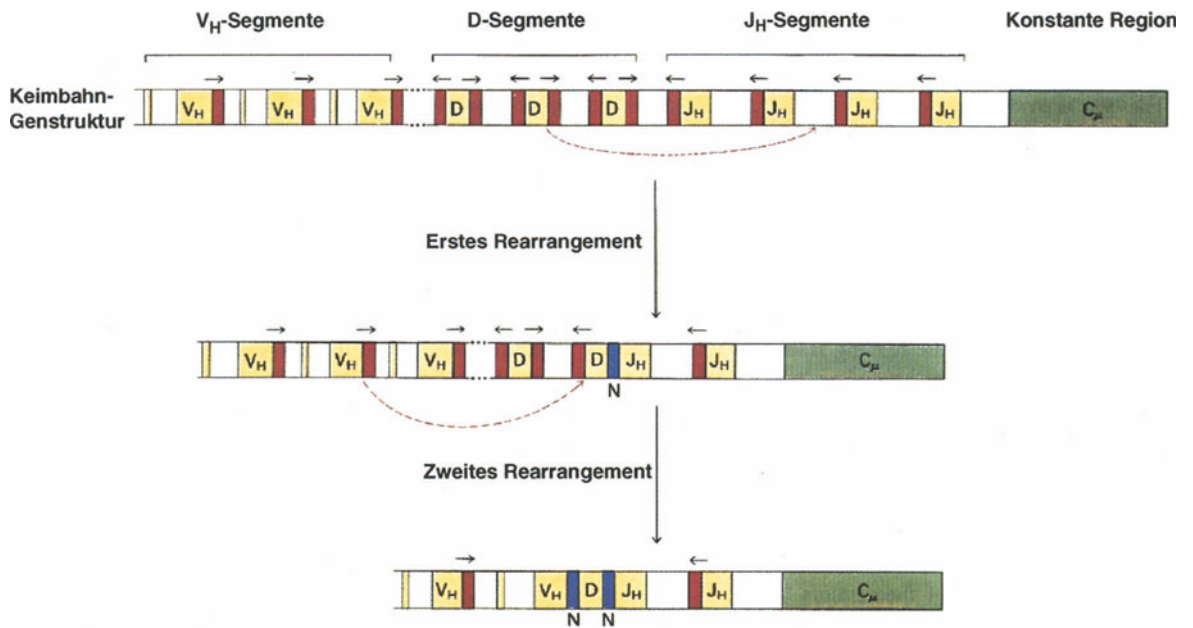


Abb. 1.1.64. Rearrangement der Immunglobulin-Schwereketten-Gene. Im Genom liegen zunächst eine große Anzahl von V_H Sequenzen gefolgt von ca. 20 D - und vier J_H -Segmenten und der konstanten Region (C) vor. In zwei Rearrangementschritten werden unter Deletion der dazwischen-

liegenden DNA-Fragmente neue Gene gebildet, die je ein dieser Segmente enthalten, wobei durch Ungenauigkeiten bei der Segmentzusammenfügung zusätzliche Nukleotidvariationen (N) entstehen, wiedergegeben mit Genehmigung aus Lodish et al. [1995], S 1320

Chromosom aufgereiht. Sie werden im Embryo in ihrer Reihenfolge auf dem Chromosom von anterior nach posterior von Morphogenen angeschaltet, die Konzentrationsgradienten über die embryonale Längsachse bilden (Abb. 1.1.62).

Die Ausbildung der a.-p.-Polarität von Gliedmaßen, also z.B. der unterschiedlichen Gestaltung von kleinem Finger und Daumen, wird wahrscheinlich durch Sonic hedgehog induziert, das von einzelnen Zellen am posterioren Ende der sich entwickelnden Gliedmaßen sezerniert wird, dadurch den benachbarten Zellarealen ihre Position mitteilt und dort Hox-Gene anschaltet, die die Differenzierung festschreiben.

1.1.3.3.2 Organentwicklung

Bei der Organentwicklung spielen Interaktionen von Nachbarzellen unterschiedlicher Herkunft durch Matrix-vermittelte Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Hormonwirkung eine entscheidende Rolle. So werden endodermale Zellen durch mesodermale Zellen, von denen sie durch eine Basallamina getrennt sind, zur Speicheldrüsenentwicklung induziert. An der Nierenentwicklung sind zwei verschiedene mesodermale Zelltypen beteiligt, wobei der direkte Zell-Zell-Kontakt für die korrekte Ausbildung der Tubuli entscheidend ist.

1.1.3.3.3 Hämatopoese

Die Hämatopoese, d.h. die Bildung aller Blutzellen, hat ihren Ursprung im Mesoderm, wobei die Signale unbekannt sind, die diese Differenzierungsrichtung induzieren. Die pluripotenten Vorläuferzellen bilden mehrere stärker differenzierte Subpopulationen von Stammzellen aus, die nur noch eine Klasse von Blutzellen bilden können (Abb. 1.1.63). Bei dieser Determinierung spielen auch wieder Transkriptionsfaktoren, z.B. aus der GATA-Familie, eine entscheidende Rolle. Dieser Vorgang findet im Embryo im Dottersack und später hauptsächlich in der Leber statt, nach der Geburt aber in ähnlicher Weise im Knochenmark. Die Stammzellen bleiben also über das gesamte Leben erhalten und sorgen für einen ständigen Nachschub an Erythrozyten und Leukozyten.

1.1.3.3.4 Genrearrangement in der Entwicklung des Immunsystems

Aus Knochenmarkstammzellen entwickeln sich die Vorläufer von B- und T-Lymphozyten. Beide Zelltypen besitzen membranständige Proteine, Anti-

körper und T-Zell-Rezeptoren, die eine Vielzahl von Antigenen erkennen können, wobei praktisch jede Zelle eine andere Spezifität trägt. Dies wird gewährleistet, indem die Gene für diese beiden Klassen von Proteinen während der Differenzierung der Zellen auf der DNA-Ebene aus modularen Elementen zusammengesetzt werden (Abb. 1.1.64). Von jedem DNA-Modul sind mehrere verschiedene Versionen im Genom vertreten, die über homologe Sequenzen mit jeder Version eines anderen Moduls durch Rekombination verbunden werden können. Da an den Verbindungsstellen Nukleotide zusätzlich ein- oder ausgebaut werden können, ergibt sich eine zusätzliche Variabilität der entstehenden rearrangierten Gene und deren Produkte, so daß ein Mensch in der Lage ist, 10^{11} verschiedene Antikörper und ähnlich viele T-Zell-Rezeptoren zu bilden.

1.1.3.4 Apoptose

Die B- und T-Zell-Vorläufer, die körpereigenes Gewebe erkennen, begehen noch während der Embryonalentwicklung Selbstmord in Form von Apoptose. Wenn sie an ihr Antigen binden wird eine Kaskade von Genen aktiviert, die letztlich zur Fragmentierung ihrer DNA und ihrer Selbstaflösung in einzelne Vesikel führt, die von Makrophagen phagozytiert werden. Dieser programmierte Zelltod wird an vielen Stellen während der Embryonalentwicklung induziert, um Zellen zu beseitigen, die in einem Gewebe überflüssig geworden sind. Korrekte Musterbildung und Differenzierung hängen also nicht nur von der induzierten Proliferation und Wanderung determinierter Zellen ab, sondern auch von der gezielten Ausschaltung zuviel gebildeter Zellen.

1.1.4 Literatur

- Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323:561–567
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D (1990) *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim
- Arents G, Moudrianakis E N (1993) The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10489–10493
- Carroll S B (1995) Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376:479–485
- Craig S W, Johnson R P (1996) Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol* 8:74–85

- Darnell J, Lodish H, Baltimore D (1990) Molekulare Zellbiologie. de Gruyter, Berlin New York
- Heuser J E, Kirschner M W (1980) Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J Cell Biol* 86:212–234
- Keller W (1995) No end yet to messenger RNA 3'processing. *Cell* 81: 829–832
- Lewin B (1994) Genes V. Oxford University Press, Oxford, p93
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipurski SL, Matsudaira T, Darnell J (1995) Molecular cell biology, 2nd edn. Scientific American Books
- Trachsel H (1991) Translation in Eukaryotes. CRC Press, Boca Raton, Fa, p110
- Woodcock C L, Horowitz R A (1995) Chromatin organization reviewed. *Trends Cell Biol* 5:272–277
- Zabel U, Hurt E C (1995) Importin oder Kariopherin – der Rezeptor für Kernlokalisationssequenzen. *Biospektrum* 4:27–29