

Gen-Mutationen und DNS-Reparatur - Mechanismen und Bedeutung

von Dr. Wolfgang Witte, Wernigerode

Mit 21 Abbildungen



Die Neue Brehm-Bücherei

A. Ziemsen Verlag · Wittenberg Lutherstadt · 1978

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 5 |
| 2. Das genetische Material, DNS und RNS | 6 |
| 2.1. Struktur | 6 |
| 2.2. Enzyme, die für Synthese und Abbau, Reparatur und Rekombination der DNS verantwortlich sind | 9 |
| 2.3. Funktionen der DNS | 10 |
| 2.3.1. Replikation | 10 |
| 2.3.2. Rekombination | 12 |
| 2.3.3. Die Realisierung der genetischen Information | 14 |
| 3. Gen-Mutationen und ihre Auswirkungen | 15 |
| 4. Systeme zur Untersuchung der Entstehung von Gen-Mutationen bei Organis- men unterschiedlicher Organisationshöhe | 19 |
| 4.1. Bakterien | 19 |
| 4.2. Bakteriophagen | 22 |
| 4.3. Pilze | 24 |
| 4.4. Drosophila | 25 |
| 4.5. Säugerzellen | 26 |
| 5. Molekulare Mechanismen der Mutationsentstehung | 29 |
| 5.1. Das experimentelle Erkennen bestimmter Mutationssysteme | 29 |
| 5.2. Mutationsentstehung infolge der direkten Veränderung von Paarungs- eigenschaften der Basen | 32 |
| 5.3. Mutationsentstehung infolge des Einbaus von Basenanaloga in die DNS | 34 |
| 5.4. Mutationsentstehung infolge struktureller Schäden am DNS-Molekül | 36 |
| 5.4.1. Das Erkennen struktureller Schäden am DNS-Molekül | 36 |
| 5.4.2. Schadenstypen am DNS-Molekül | 38 |
| 5.4.3. Mechanismen der DNS-Reparatur | 40 |
| 5.4.4. Der Zusammenhang zwischen der Reparatur von Lücken (Einzel- strangbrüchen) im DNS-Molekül und der Mutationsentstehung | 48 |
| 5.5. Spontane Mutationsentstehung, DNS-Replikation und Reparaturvor- gänge | 52 |
| 5.6. Exogene Beeinflussung von Vorgängen der DNS-Reparatur und der Muta- tionsentstehung | 56 |
| 6. Mutationsentstehung und Evolution | 57 |
| 7. Mutagene Substanzen, die in der chemischen Industrie, der Agrochemie und Chemotherapie verwendet werden | 61 |
| 8. Hinweise auf weiterführende Literatur | 68 |
| 9. Register | 69 |

1. Einleitung

Vererbung kennen wir als die Weitergabe des „Erbgutes“, d. h. die Weitergabe der genetischen Information für alle Eigenschaften eines Lebewesens, von Generation zu Generation. Jede Eigenschaft eines Lebewesens beruht auf einer oder mehreren Teilinformationen, den Genen. Die Mechanismen der Weitergabe der Gene und ihrer Um- und Neukombination sind seit der Entdeckung der grundlegenden Gesetze über Weitergabe und Verteilung von Erbmerkmalen durch Gregor Mendel im Jahre 1866 eingehend untersucht worden. Seit dieser Zeit wissen wir auch, daß Erbmerkmale eine bestimmte Konstanz haben. Bald nach der Wiederentdeckung der Mendelschen Regeln durch Correns, Tschermak und de Vries wurde von de Vries exakt formuliert, daß mit geringer Häufigkeit sprunghafte Änderungen einer bestimmten Eigenschaft eines Organismus auftreten können, die sich als verändertes Merkmal weitervererben. Diese Änderungen der Erbinformation heißen Mutationen, die von ihnen betroffenen Individuen Mutanten.

Die Weiterentwicklung der Organismen im Verlauf der Erdgeschichte beruht auf dem Auftreten neuer Merkmale. Eine der Grundlagen für die Evolution ist die Entstehung von Mutationen als Ursache qualitativer Veränderungen. Für die Züchtung von Kulturpflanzen und Nutztieren als einer durch den Menschen gelenkten Evolution im Kleinen hat die Mutationsentstehung und ihre Beeinflussung durch den Züchter einen großen praktischen Wert. Natürlich bleiben auch die Erbmerkmale des Menschen nicht unverändert, wir kennen zahlreiche menschliche Erbkrankheiten und die große Belastung der davon betroffenen Patienten. Eine wichtige praktische Aufgabe ist hier die Verhinderung des Auftretens neuer Mutationen. Dazu ist ein Erkennen von mutationsauslösenden Umweltfaktoren und die Untersuchung ihrer molekularen Wirkungsweise nötig. Die Mutationsforschung ist auch ein aktueller Aspekt des Umweltschutzes.

Die vorliegende Schrift beschäftigt sich mit den Gen-Mutationen, den Mechanismen ihrer Entstehung im Zusammenhang mit der DNS-Reparatur und mit ihrer praktischen Bedeutung. Gen-Mutationen sind nur eine Gruppe der möglichen Veränderungen des Genotyps.

In Protocaryoten (Organismen ohne echten Zellkern und Kompartimentierung der Zelle) sind ringförmige DNS-Moleküle Träger der genetischen Information, also der Gene. Bei den Eucaryoten (Organismen, deren Zellen einen echten Kern und eine Kompartimentierung aufweisen) ist die DNS in den Chromosomen und bestimmten Zellorganellen (Mitochondrien und Chloroplasten) enthalten, die Gesamtheit dieser Träger der genetischen Information bildet das Genom. Neben den Gen-Mutationen sind hier Veränderungen der Chromosomenstruktur als Chromosomenmutationen oder Veränderungen in der Anzahl der Chromosomen als Genommutationen bekannt.

Die Beschränkung auf die Gruppe der Gen-Mutationen erfolgt wegen ihrer Bedeutung, dem relativ fortgeschrittenen Wissen um ihre Natur und um die

Mechanismen ihrer Entstehung und nicht zuletzt wegen des begrenzten Umfangs dieses Büchleins.

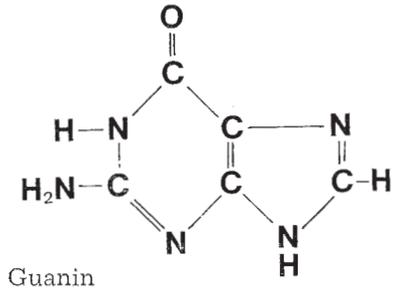
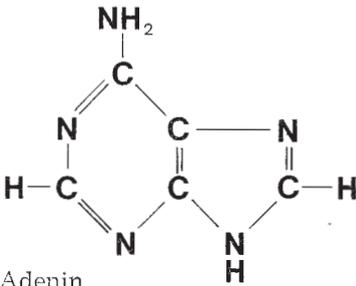
Soweit es zum Verständnis notwendig ist, wird vor dem Behandeln der eigentlichen Problematik kurz auf die Struktur der DNS und ihre Rolle als genetisches Material eingegangen.

2. Das genetische Material, DNS und RNS

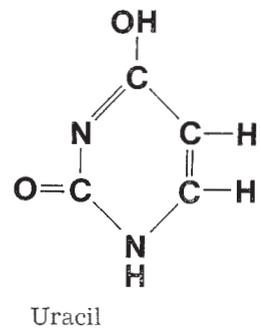
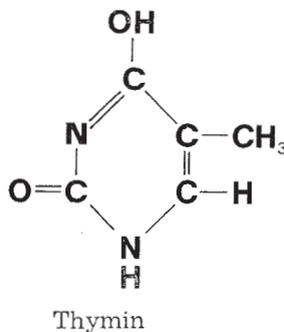
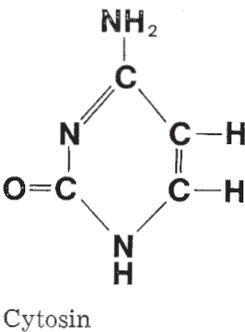
2.1. Struktur

Träger der genetischen Information sind die Nukleinsäuren DNS (Deoxyribonukleinsäure) und RNS (Ribonukleinsäure). RNS finden wir als genetisches Material nur bei bestimmten Viren. DNS und RNS sind Biopolymere, die aus Nukleotiden aufgebaut sind. Ein jedes Nukleotid besteht aus Phosphatrest, Zucker und Stickstoffbase. Die DNS enthält als Zucker Deoxyribose, die RNS Ribose. Die DNS enthält die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin, in der RNS steht an Stelle von Thymin die Base Uracil.

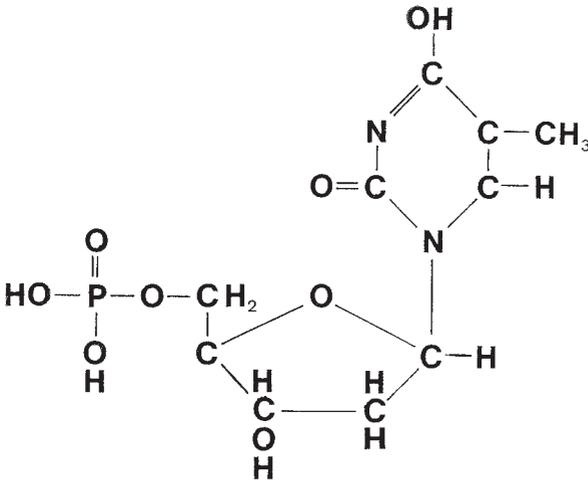
Purinbasen:



Pyrimidinbasen:



Nukleotid, z. B. Deoxythymidin-5'-monophosphat:



Bei verschiedenen Viren gibt es einsträngige DNS-Moleküle, allgemein aber tritt DNS als doppelsträngiges Molekül auf. Jeder Strang besteht aus Nucleotiden, die untereinander durch Phosphodiester-Bindungen zwischen 3'-OH-Ende und 5'-Phosphatende der Zuckermoleküle verbunden sind. Dementsprechend hat ein Nucleinsäurestrang ein 5'-Phosphat- und ein 3'-OH-Ende.

Im Doppelstrang des DNS-Moleküls bilden bestimmte Basen des einen Stranges mit bestimmten Basen des anderen Stranges gesetzmäßig Paare. So paart Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Diese Paarungen kommen durch Wasserstoffbrücken-Bindungen (kohäsive Bindung) zustande.

Beide Stränge der DNS sind schneckenförmig um eine gedachte Achse gewunden, sie bilden eine Doppelhelix. Diese Molekülstruktur ist durch die Basenpaarung und die daraus resultierenden Bindungswinkel zwischen den Basen und der Zucker-Phosphat-Kette (= Rückgrat der DNS) bedingt. Der Durchmesser eines DNS-Moleküls beträgt 20 Å, der Abstand der beiden Einzelstränge etwa 11 Å und die Ganghöhe einer Wendel der Doppelhelix 34 Å.

DNS-Moleküle sind relativ lange Polymere, so besteht z. B. die DNS des Darmbakteriums *Escherichia coli* aus etwa 2×10^6 Nucleotiden, das entspricht einem Molekulargewicht von 1×10^9 und einer Länge von 400 μm . Verbunden mit dieser Molekülgröße ist die relativ hohe Viskosität von gelöster DNS. Die Basen der DNS haben aufgrund der konjugierten Doppelbindungen im heterocyclischen System charakteristische Spektren der Absorption des ultravioletten Lichtes. Das Ausmaß der UV-Absorption durch DNS hat große Bedeutung für quantitative Bestimmungen.

Wegen der zahlreichen Phosphatgruppen mit je einem dissoziierten Ion weist das Gesamtmolekül sehr viele negative Ladungen auf. Diese negativen Ladun-

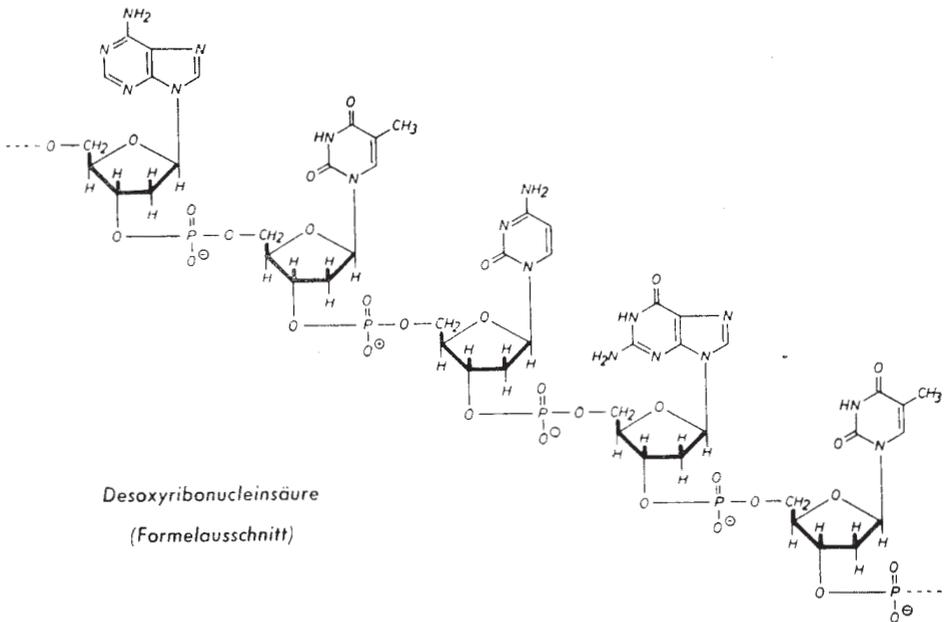


Abb. 1. Nukleotidsequenz in einem Strang der DNS

gen führen zu einer besonders festen Bindung von basischen Proteinen an die DNS, saure Proteine werden weniger fest gebunden.

Aufgrund des Ladungsverhaltens ist das DNS-Molekül *in vivo* von Wassermolekülen umhüllt, es hat eine Hydrathülle. Änderungen in der Hydrathülle führen zu Änderungen der Konformation der Doppelhelix, d. h. zu Änderungen der Winkel, in denen die Basen zur Helixachse stehen. Veränderungen dieser Winkel führen zu unterschiedlichen Ganghöhen der Helix. Nativ kommt die DNS in der sogenannten A-Konformation vor, Dehydratisierung bewirkt

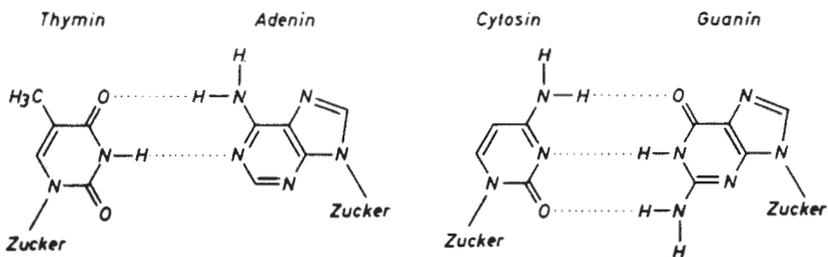


Abb. 2. Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin und zwischen Guanin und Cytosin

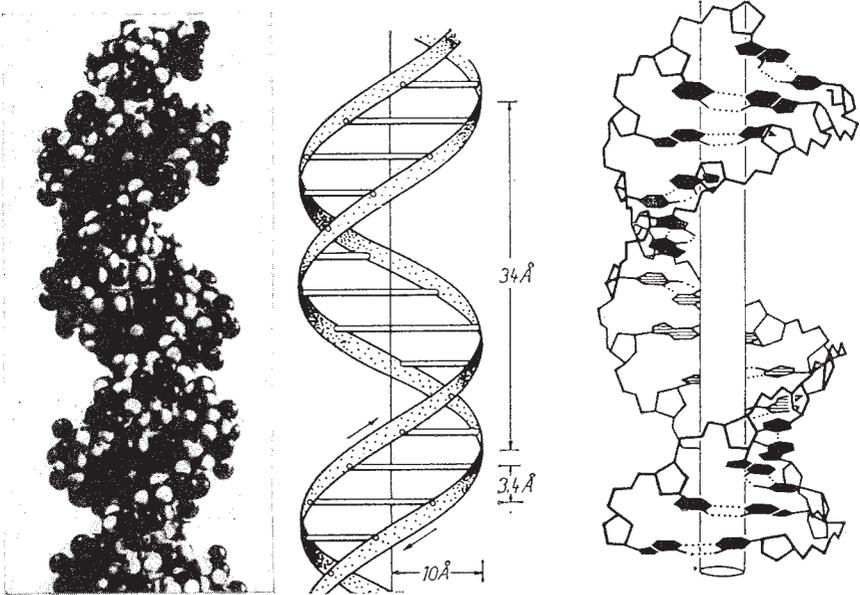


Abb. 3. Struktur der DNS-Doppelhelix, Aus Bielka 1969

eine Überführung in die B-Konformation. Wie experimentell nachgewiesen wurde, beruht die Wirkung bestimmter biologisch aktiver Substanzen, wie zweiwertiger Metallionen, Polyaminen und Proteinen, auf Konformationsänderungen am DNS-Molekül. Wir werden auf diesen Zusammenhang unter 5.6. näher eingehen.

2.2. Enzyme, die für Synthese und Abbau, Reparatur und Rekombination der DNS verantwortlich sind

Die DNS ist zwar hinsichtlich der in ihr verschlüsselten genetischen Information relativ konstant, als Biopolymer unterliegt sie aber auch Vorgängen des Abbaus und der Synthese, die mit der Replikation bei der Zellteilung, der Reparatur und Rekombination sowie mit dem Absterben der Zellen oder ihrem Befall mit Viren einhergehen. Die an diesen Vorgängen beteiligten Enzyme sollen kurz betrachtet werden. Durch Deoxyribonukleasen wird die DNS abgebaut, der Abbau erfolgt jeweils an einem Strang der Doppelhelix. Enzyme, die von den Enden eines DNS-Stranges Nukleotide oder Oligonukleotide abspalten, heißen Exonukleasen; Enzyme, die Phosphodiesterbindungen innerhalb eines Stranges spalten, heißen Endonukleasen. Die weitere Unterteilung der Nukleasen erfolgt aufgrund der durch ihre Aktivität freigesetzten Spaltprodukte. Durch DNase I werden z. B. Phosphodiesterbindungen so gespalten, daß an den freigesetzten Oligonukleotiden 3'-OH und 5'-Phosphatgruppen ent-

stehen, die Aktivität der DNase II führt zu Oligonukleotiden mit 3'-Phosphat- und 5'-OH-Gruppen.

Die DNS-Polymerasen sind für die Biosynthese der DNS verantwortlich. Bei Vorliegen einer geeigneten Matrize und den Triphosphaten der Deoxyribonukleoside werden durch eine DNS-Polymerase entsprechend der Paarung mit den Basen der Matrize Deoxyribonukleotide in den neu synthetisierten Strang eingebaut (siehe dazu Abb. 4). Die DNS-Polymerasen knüpfen also 3'-5'-Phosphodiesterverbindungen. Die Energie dafür wird durch Abspaltung des anorganischen Pyrophosphates von den Deoxyribonukleotid-Triphosphaten gewonnen.

Aus *Escherichia coli* wurden bisher drei verschiedene DNS-Polymerasen isoliert (DNS-Polym. I, II, III), die sich durch ihre Wirkungsweise voneinander unterscheiden. Essentiell für die DNS-Replikation ist offenbar die DNS-Polymerase III, während die Polymerasen I und II an der Reparatur und der Rekombination beteiligt sind.

Eine DNS-Polymerase kann nicht zwei Oligonukleotide miteinander verknüpfen, hier fehlt die Energie, die aus der Abspaltung von Pyrophosphat gewonnen wird. Zum Verknüpfen von 3'-OH und 5'-Phosphatende hat die Zelle eine DNS-Ligase. Die dafür erforderliche Energie wird durch Aktivierung der Ligase erhalten: die aus *Escherichia coli* isolierte Ligase wird durch Nicotinsäureamid-Adenosindinukleotid aktiviert, die vom Bakteriophagen T 4 kontrollierte Ligase durch Adenosintriphosphat. Wirkungsweise und Zusammenwirken von Deoxyribonukleasen, DNS-Polymerase und Ligase sind aus dem Schema zur Rekombination ersichtlich (Abb. 6).

2.3. Funktion der DNS

Die DNS hat zwei grundlegende biologische Funktionen, auf der einen Seite die Weitergabe der genetischen Information an die Tochterzellen und auf der anderen Seite die Steuerung des Zellstoffwechsels nach einem der genetischen Information entsprechenden Muster (Realisierung der genetischen Information, Ausbildung der Erbmerkmale).

2.3.1. Replikation

Protocaryoten (Viren, Bakterien, blaugrüne Algen) weisen keinen echten Zellkern auf, der durch eine Membran vom Zellplasma abgegrenzt ist. Sie haben Kernäquivalente, die bei Bakterien und blaugrünen Algen aus einem ringförmigen doppelsträngigen DNS-Molekül bestehen; die in den Viren vorhandene Nukleinsäure kann ein- oder doppelsträngige DNS oder RNS sein. Mit der Vermehrung der Viren oder der Teilung von Bakterien- und Algenzellen geht eine Vervielfältigung der Nukleinsäuremoleküle einher, die Replikation. Dadurch erhalten Virus-Nachkommenschaft oder Tochterzellen die gleiche genetische Information wie die Partikel oder Zellen von denen sie abstammen. Sie bilden gleiche Eigenschaften aus.

Bei den Eucaryoten ist die DNS Bestandteil der Chromosomen. Mit der Zellteilung ist eine Kernteilung verbunden. Die Verteilung der genetischen Information (DNS) auf die Tochterkerne in der Mitose (vegetative Zellteilung) und in der Meiose (generative Zellteilung) erfolgt durch die Chromosomen. In einem bestimmten Stadium der Zellteilung (S-Phase oder Synthese-Phase) findet die Verdopplung der DNS, ihre Replikation, statt.

Die Replikation muß so erfolgen, daß in den Tochterzellen (oder den Partikeln einer Virus-Nachkommenschaft) genau die gleiche DNS zu finden ist wie in den Elternzellen (oder den Ausgangspartikeln von Viren). Diese Forderung wird durch den semikonservativen Charakter der Replikation erfüllt: jeder der beiden Stränge der Doppelhelix dient als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges, so entstehen zwei Tochter-Helices, die je aus einem neu synthetisierten und je einem elterlichen Strang bestehen (daher die Bezeichnung semikonservativ), siehe dazu Abbildung 4.

Für die Replikation muß zunächst die Doppelhelix an einer bestimmten Stelle aufgewunden werden. Durch eine Endonuklease werden im Bereich dieser Stellen Einzelstrangbrüche gesetzt, ein Protein besorgt das weitere Auffinden der Helix. Durch die DNS-Polymerase werden dann die Tochterstränge synthetisiert (zur Tätigkeit der DNS-Polymerase siehe 2.2.). In seinen Einzelheiten ist dieser Mechanismus noch nicht genau bekannt. Nach neueren Ergebnissen, denen vor allem die experimentellen Befunde des japanischen Molekularbiologen Okazaki zugrunde liegen, ergibt sich folgendes Bild: die Tochterstränge werden nicht kontinuierlich synthetisiert, sondern diskontinuierlich. Offenbar gibt es mehrere Startpunkte für die Replikation.

An diesen Startpunkten wird zunächst eine kurze RNS-Sequenz synthetisiert, die dem DNS-Elternstrang komplementär ist (Abb. 5 a). Die DNS-Polymerase knüpft dann an das 3'-OH-Ende der RNS-Sequenz Deoxyribonukleotide an, bis der folgende Startpunkt erreicht ist (Abb. 5 b). Danach wird die RNS-Sequenz durch eine RNase (RNS abbauendes Enzym) wieder abgebaut, es sind nun DNS-Tochterstränge vorhanden, aber mit Lücken (Abb. 5 c). Durch

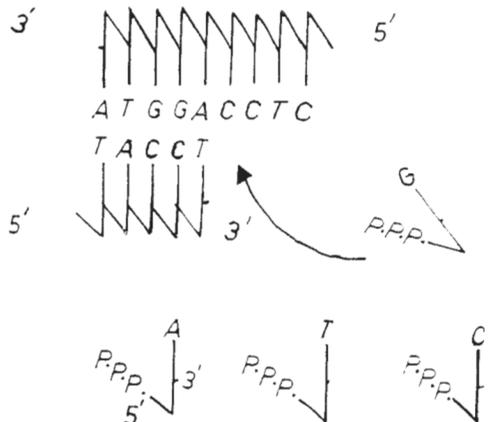


Abb. 4. Vereinfachtes Schema zur DNS-Polymerase-Aktivität

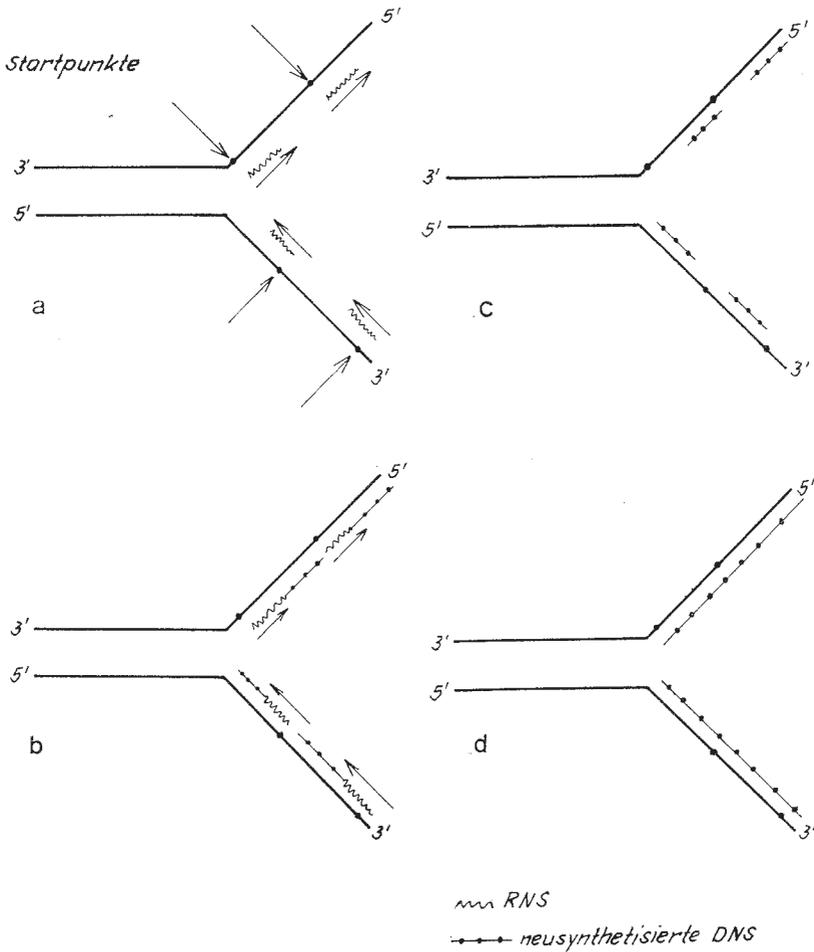


Abb. 5. Gegenwärtige Vorstellungen zu den Einzelschritten bei der Synthese der DNS-Tochterstränge

eine DNS-Polymerase werden diese Lücken gefüllt und die Ligase verknüpft dann das 3'-OH-Ende der neu synthetisierten Sequenz in der Lücke mit dem 5'-Phosphat-Ende des vorher synthetisierten Strangteiles Abb. 5 d).

2.3.2. Rekombination

Bei den Eucaryoten erfolgt durch die Zufallsverteilung der Chromosomen während der Meiose eine Umverteilung der Gene. Ebenso wichtig für Umver-