

Einleitung

DNA ist der zentrale Informationsspeicher der Zelle. Die darin enthaltene Information wird zur Steuerung des Metabolismus herangezogen und über Generationen durch Replikation tradiert. Gemäß dem zentralen Dogma der Molekularbiologie erfolgt die *Expression* oder Verarbeitung dieser Information dadurch, daß die DNA in RNA abgelesen wird und diese Transkripte der Information dann in Proteine translatiert werden. Dazu tritt DNA mit andern Komponenten des Zellkerns, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Polymerasen, Histonen oder RNA, in Wechselwirkung. Solche DNA-Liganden-Interaktionen sind die primären Schritte der von der DNA ausgehenden Informationsverarbeitung der Zelle, und ihre Untersuchung dient dem Verständnis der Mechanismen des zellulären Informationsflusses.

DNA einer eukaryoten Zelle besteht aus zwei Sätzen von 10^9 - 10^{10} Basenpaaren als kleinsten informativen Einheiten. Die Bindung der genannten Liganden erfolgt in der Regel spezifisch an bestimmten Positionen der DNA, dabei werden typischerweise zwischen 4 und 10 Basen "im Zusammenhang" erkannt. Es liegt also die gesamte Information der DNA nicht nur inhaltlich, sondern auch strukturell, in deren Sequenz.

Die DNA-Sequenz kann auf der Ebene der abstrakten Zeichenfolge der vier Basen mit linguistischen Methoden analysiert werden; diese Analyse geht davon aus, daß der gesamte Informationsgehalt der DNA in dieser Zeichenfolge enthalten ist. Eine solche Herangehensweise zieht die stoffliche Natur von DNA und deren Einfluß auf den Informationsgehalt, wenn überhaupt, nur über Umwege in Betracht. DNA hat aber als Medium der Informationsspeicherung vor allem stoffliche Natur, und die Abstraktion der Sequenz in eine Buchstabenfolge, wie weit sie auch in den bisherigen Untersuchungen praktisch geführt haben mag, muß für ein umfassendes Verständnis zellulärer Vorgänge durch eine Betrachtung der Sequenz in ihrer stofflichen Manifestation ergänzt werden. Ein wesentlicher Aspekt dabei ist die Topologie der betrachteten DNA-Sequenz, da sie die räumliche Struktur der DNA und damit ihre Fähigkeit zu Wechselwirkungen beeinflusst. Meine Arbeit stellt ein System vor, welches die Untersuchung von DNA in verschiedenen topologischen Zuständen ermöglicht.



Analogie

Wer sich jemals in einer Lehrbuchsammlung der Universität ein beliebtes Lehrbuch geliehen hat, der weiß, daß neben den in dem Buch gedruckten Texten sich im Laufe der Zeit auch Information *über* diese Texte ansammelt: durch häufiges Studium bestimmter Passagen öffnet sich das Lehrbuch leichter an einigen Stellen, und dient so als Speicher dafür, welche Texte oft von anderen gelesen wurden. Das stoffliche Medium der abstrakten Information transportiert somit eine "Meta"-Information *über* den in ihm enthaltenen Inhalt.

DNA transportiert, ähnlich einem Buch, Textinformation, die in einem Kode von vier Zeichen, den Nukleinsäurebasen, niedergelegt ist. Diese Ebene der Information kann man abstrakt und von der chemischen Struktur der Doppelhelix losgelöst betrachten, und z.B. Methoden der Linguistik oder Mathematik für die Analyse des Textes heranziehen. Wie ein Buch aber besteht DNA auch aus Materie, und analog dem Buch kann diese Materie über den Text hinaus Informationen *über* den Text enthalten. Meine Arbeit beschäftigt sich analog dem eingangs genannten Beispiel des Lehrbuchs mit einem Aspekt von DNA, der an ihren stofflichen Charakter geknüpft ist und zu ihrem Informationsgehalt beiträgt: der Topologie von DNA, worunter im Folgenden der Windungszustand der Doppelhelix verstanden wird. Es soll hier zunächst die Analogie für DNA konkretisiert, dann das abstrakte Konzept der Topologie kurz eingeführt sowie die biologische Bedeutung von topologischen Zuständen in DNA erläutert werden, soweit diese bekannt ist. Im zweiten Teil der Arbeit wird dann das System, welches das Thema dieser Arbeit bildet, vorgestellt und einige Applikationen zur experimentellen Untersuchung topologieabhängiger Fragestellungen werden diskutiert.

DNA-Sequenz ist mehr als eine abstrakte Zeichenfolge

Es gilt, daß die DNA das "Programm" ist, welches den Ablauf der Stoffwechselfunktionen der Zelle steuert. Das Bild vom Programm, so richtig es sein mag, kann irreführend sein, soweit man sich als Programm eine Folge abstrakter Informationspakete vorstellt, die unabhängig von ihrer stofflichen Manifestation wirken, wie dies bei den Programmen der elektronischen Datenverarbeitung der Fall ist. Hier soll erklärt werden, daß DNA mehr ist als nur eine abstrakte Folge von Buchstaben, und daß die Regulation der Zellfunktion direkt von der stofflichen Form der DNA abhängt.

In der Basensequenz ist zum einen die "explizite" Information enthalten, die bestimmt, welche Aminosäuresequenz die von der Zelle synthetisierten Proteine haben. Diese Information wird durch RNA-Polymerasen abgelesen und durch Ribosomen und tRNA von der transkribierten mRNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Soweit die Aminosäuresequenz die Basensequenz direkt wiedergibt, ist die abstrakte DNA-

Sequenzinformation linear übertragen worden; die meist diskontinuierliche Anordnung der kodierenden DNA in von Introns unterbrochenen Abschnitten sei hierbei unberücksichtigt.

Die Zelle muß jedoch nicht nur Proteine mit bestimmter Sequenz herstellen, sondern zum anderen auch die im Stoffwechselkontext mengen- und zeitmäßig adäquate Syntheserate gewährleisten. Die Information dazu ist implizit vor allem auf dem nichtkodierenden Teil der DNA enthalten.

Die kodierenden Abschnitte machen im Genom einer eukaryoten Zelle nur einen geringen Teil der gesamten im Zellkern enthaltenen Sequenzinformation aus; von 3×10^9 Basenpaaren (bp) im haploiden Chromosomensatz des Menschen kodieren nur ca. 3% oder $\sim 10^8$ bp für ca. 10^5 Proteine, von denen etwa ein Viertel bis die Hälfte zu den Genen des täglichen Bedarfs („housekeeping“) gehören und mit unterschiedlichen Syntheseraten ständig exprimiert werden. Der andere Teil wird nur während der Differenzierung der Zellen zu spezialisierten Subpopulationen angeschaltet. Der überwiegende Teil der Sequenzinformation, etwa 97%, ist nicht kodierend. Ein wesentlicher Teil dieser nichtkodierenden Sequenzinformation dient dazu, die RNA-Syntheserate zeitlich und mengenmäßig den Bedürfnissen des Gesamtstoffwechsels anzupassen (Bodnar 1988, Zuckerkandl 1997).

DNA-Liganden-Interaktion ist sequenz- und topologieabhängig

Die Steuerung der Syntheserate der RNA-Polymerase wird über Wechselwirkungen von Proteinen an regulatorischen DNA-Sequenzen, z.B. an Promotor- und Terminator- sowie Enhancer- und Suppressorsequenzen, vermittelt. Darüber hinaus ist auch die Verbindung der DNA mit dem Kernskelett und ihre Organisation in größere Abschnitte durch Sequenzmotive wie „Matrix-attachment-sites“ oder „Silencer“ und Isolatoren sequenzbestimmt. Neben der Proteinbindung ist auch die Transkriptionsregulation durch RNA-Bindung bekannt, das drastischste Beispiel ist dabei das Abschalten eines ganzen X-Chromosoms durch das Transkript des Xist-Gens.

DNA:Ligandenwechselwirkungen, wie z.B. bei Transkriptionsfaktoren, zeigen hohe Sequenzspezifität (Rastinejade 1995). Dabei wird die Sequenz als räumliche Struktur erkannt, zu deren Determinanten ihr Windungszustand gehört (Hippel 1994). Die Topologie der Helix kann entscheidend zur Bindungskonstanten der Ligand:DNA-Interaktion beitragen (Parvin 1995). Eine lokale, geringfügige Änderung der Helixganghöhe erleichtert z.B. die Insertion einer interkalierenden Aminosäureseitenkette (Werner 1996).

Neben solchen Mechanismen der Feinregulierung von Ligandenaffinitäten durch Biegung oder Aufdrehen der Helix kann aber auch topologieabhängig die kanonische B-DNA-Struktur vollkommen zugunsten anderer Formen, wie Z-DNA oder Kreuzform-DNA, aufgegeben werden. Die Ausbildung dieser Strukturen wird durch bestimmte Sequenzmuster und durch hohe Abweichungen von der normalen Windungsdichte begünstigt. Wie unten ausgeführt, werden solche topologieabhängigen Strukturen durch sehr hohe, transiente Abweichungen von der "normalen" DNA-Topologie transkriptionsabhängig induziert und sind daher kurzlebig.

Es soll angemerkt sein, daß das Verhalten der Zelle und ihre Differenzierungsfähigkeit nicht nur durch die auf der DNA enthaltene Sequenzinformation bestimmt wird, sondern auch von der durch Proteine und andere Zellbausteine geprägten "informativen Umgebung" der DNA; dieser Aspekt wurde hier zugunsten der Konzentration auf das grundlegende Thema der Arbeit in den Hintergrund gestellt. Außerdem muß, soweit im vorangegangenen und im folgenden Abschnitt von der DNA-Sequenzinformation nur im Zusammenhang mit Proteinsynthese gesprochen wird, in Erinnerung behalten werden, daß auch die Transkription von tRNA, rRNA oder snRNA durch Promotoren kontrolliert wird und grundsätzlich den gleichen Regelmechanismen unterworfen ist wie die Transkription von mRNA, welche als Matrize zur Synthese von Proteinen benötigt wird.

Topologie

Topologie ist eine mathematische Disziplin, die sich mit den relativen Verhältnissen geometrischer Objekte zueinander beschäftigt. Ein bekanntes Beispiel ist die Frage, ob eine Kurve im Raum verknotet ist oder nicht. Eine wichtige Anwendung topologischer Methoden liegt in der Optimierung komplexer Verbindungsmuster, etwa in der Halbleiterchipherstellung.



Zur Veranschaulichung der zugrundeliegenden Fragestellungen von DNA-Topologie kann die verknäuelte Telefonschnur herangezogen werden. Beim Gebrauch von Telefonen, deren Hörer über eine Schnur und den dazugehörigen Apparat fest mit einer Wand verbunden ist, ergibt es sich in Abhängigkeit von den Telefoniergewohnheiten der Nutzer und den lokalen Gegebenheiten häufig, daß das in die Wand führende Kabel mit der Zeit Knäuel bildet. Aus topologischer Sicht ist dabei nicht die absolute Lage der Telefonschnur im Raum interessant, sondern nur ihre Lage relativ zu sich selbst, d.h. wie oft sie sich um sich

selbst windet, oder ob man sie aufwickeln kann, ohne den Apparat vom Boden oder das Kabel aus der Wand zu nehmen.

Dieses sehr einfache Modell veranschaulicht eine Menge interessanter biologischer Phänomene, die für DNA in der Zelle eine wichtige Rolle spielen, wie etwa Rechts- oder Linksgängigkeit der Windungen, plektonemische vs. toroidale Superhelikalität, Kompaktierung und Energiegehalt der Superhelix, auf die im Folgenden für DNA näher eingegangen werden wird. Es kann zum Beispiel der Energiegehalt der im Kabel enthaltenen Windungen einfach dadurch demonstriert werden, daß man den dazugehörigen Apparat an dem verwundenen Kabel frei hängen läßt; er wird dann in eine Drehung versetzt, die von der im Kabel enthaltenen Windungsenergie angetrieben wird. Es gibt Beobachtungen, daß eine statistisch relevante Korrelation zwischen der Händigkeit des Benutzers und der Händigkeit der Helix besteht. Leider ist mit dem Aussterben fest verkabelter Telephone immer weniger Menschen die Gelegenheit gegeben, die skizzierten Modelle in eigener Anschauung nachzuvollziehen.

Konzept und Nomenklatur

Die Behandlung topologischer Fragestellungen bei DNA (Crick 1976) erfordert immer drei Begriffe, die in der Literatur mit Twist (T_w , Verdrehung), Linking Number (L_k , Verkettung) und Writhe (W_r , Krümmung, Windung) bezeichnet werden. Es sollen hier die englischen Begriffe weiterverwendet werden. Twist und Linking Number bezeichnen Eigenschaften eines Bandes, Writhe ist die Eigenschaft einer Linie im Raum. Für die im Zusammenhang mit DNA-Topologie diskutierten Begriffe wird das Molekül behandelt wie ein zweidimensionales Band; deshalb sollen einleitend die wichtigen Begriffe an diesem Beispiel erläutert werden.

Twist (Abb. 1) beschreibt die Verdrehung der Seiten eines Bandes in Bezug auf seine Mittelachse; die Einheit für T_w wird in Kreisumläufen gewählt. Rechte Windungen der Helixachse (im Uhrzeigersinn) haben für T_w ein positives Vorzeichen. Für ein ungewundenes Band gilt $T_w = 0$.



Abb. 1: Twist T_w

Die Linking Number Lk beschreibt das topologische Verhältnis zweier Linien zueinander im Raum. Man kann die beiden Ränder eines Bandes als zwei (miteinander verbundene) Linien auffassen; insofern ist der Begriff auch auf den Sonderfall eines Bandes anwendbar. Lk beschreibt, wie die Linien miteinander verknüpft sind; dabei ist L immer eine ganze Zahl. Ein $Lk = 0$ bedeutet, daß man die Linien trennen kann, ohne sie zu zerschneiden; dies ist z.B. bei dem Band der Abb. 2 a) der Fall. Ein $|Lk| > 0$ gibt an, wie oft man die eine Linie durch einen Schnitt in der anderen führen müßte, um beide Linien voneinander zu trennen.

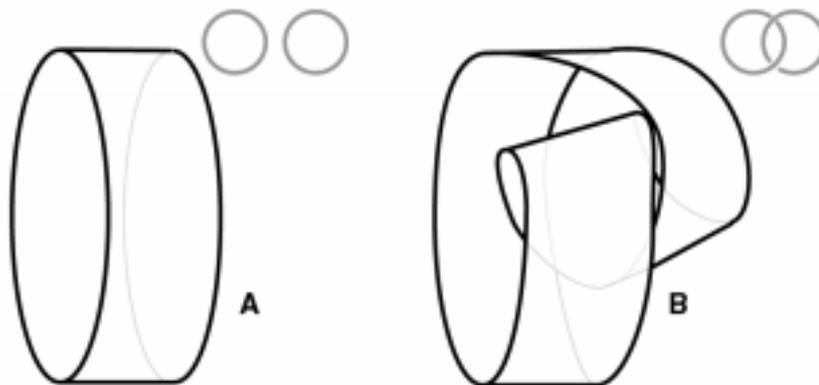


Abb. 2: Die Linking Number Lk für die Ränder eines Bandes.

Sowohl Lk wie auch Tw sind Eigenschaften eines Bandes. Es sei angenommen, daß die Enden des Bandes relativ zueinander nicht bewegt werden können; der einfachste Fall einer solchen Fixierung ist der eines kreisförmig geschlossenen Bandes. Es gilt nun, daß die topologischen Parameter Lk eines solchen geschlossenen Bandes sich ohne ein Auftrennen des Bandes nicht ändern lassen. Ein geschlossenes Band ist topologisch fixiert. Lk ist offensichtlich eine mit dem Wert von Tw zusammenhängende Größe, dennoch läßt sich aber der Twist T eines geschlossenen Bandes verändern, ohne es aufzutrennen (Abb. 3). Die Größe, die Lk und Tw miteinander verknüpft, ist Wr , das Maß für die Verwindung des Bandes im Raum. Es gilt:

$$Wr = Lk - Tw \quad \text{oder} \quad Lk = Tw + Wr$$

mit Lk : Linking-number; Tw : Twist; Wr : Writhe

Wr ist eine Maßzahl für die Windungen der Bandachse um sich selbst. Wr kann nur von außerhalb des Bandes festgestellt werden, während die beiden anderen Parameter auch aus der Perspektive der Bandränder ermittelbar sind. Lk , Tw und Wr können sowohl negative als

auch positive Werte annehmen; die Definition des Vorzeichens ist von der Drehrichtung abhängig und für beide Parameter gegensinnig. Per Konvention gibt man linken Drehungen (gegen den Uhrzeigersinn) für die Ermittlung von W_r ein positives Vorzeichen. Man kann den Betrag von W_r durch Analyse der Projektionen der Bandachse aus verschiedenen Richtungen ermitteln (Cozzarelli 1990).

Unter der Voraussetzung der topologischen Fixierung der Enden des Bandes muß die Linking number L_k konstant bleiben, auch wenn T_w und W_r fluktuieren. Dies heißt umgekehrt, daß zur Änderung von L_k ein Öffnen des Bandes erforderlich ist. Auf DNA angewendet bedeutet dies, daß zur Änderung von L_k die Fixierung der Enden aufgehoben werden muß, oder, wenn das, wie bei zirkulärer oder am Kernskelett fixierter DNA, nicht möglich ist, ein Strangbruch in die DNA eingeführt werden muß.



Abb. 3: Die Verdrehung eines geschlossenen Gummibandes ist nur möglich, wenn die beiden entstehenden Domänen gegensinnige Drehrichtung haben; die beiden Werte für T_w der Domänen sind vom Betrag gleich. Erlaubt dies die Fixierung, kompensiert sich eine Differenz in Twist T_w in globale Windungen W_r (entnommen Sinden 1994).

Eine theoretische Einführung in das für viele Y-Chromosom-tragende Individuen alltägliche topologische Problem der korrekten Knotung der Krawatte bietet ein jüngst in einer renomierten Fachzeitschrift erschienener Artikel (Fink 1999).

Die Bedeutung topologischer Grundbegriffe für DNA

Man kann DNA als gewundenes Band betrachten, wobei die antiparallelen Stränge die Kanten des Bandes darstellen. Die Windung der rechtsgängigen Doppelhelix hat bei entspannter DNA, auf die keine äußeren Kräfte einwirken, eine Ganghöhe h_0 von ca. 10,5 bp pro Windung (Watson 1953). Für solche DNA ist der Twist also

$$Tw = n / h_0$$

mit n : Anzahl Basenpaare und h_0 : Helixganghöhe = 10,5 bp

Für ein zirkuläres DNA-Molekül mit 210 bp käme man im entspannten Zustand auf einen Wert von $Tw = +20$. Nimmt man an, daß das Molekül flach auf einer Oberfläche liegt, ohne sich mit sich selbst zu kreuzen, die Projektion des Moleküls auf die Oberfläche also kreisförmig ist, so ist $Wr = 0$, und $Lk = 20$ (siehe Abb. 4 links). Entwindet man dieses Molekül nun, indem man die Kette bricht und gegen den Helixdrehsinn zwei Umdrehungen „aufdreht“, so erhält man ein Molekül mit den topologischen Parametern $Tw = 18$ und $Lk = 18$. Dreht man nun Kreissegment des DNA-Zirkels im Verhältnis zum gegenüberliegenden Segment zwei Umdrehungen gegen den Uhrzeigersinn zu einer doppelten acht, so nimmt der Molekülformparameter einen von Null verschiedenen Wert $Wr = -2$ an; da Lk sich für das geschlossene Molekül nicht ändern darf, geht Tw wieder auf den (der lokalen Konformationsenergie optimalen, s.u.) Wert $Tw = 18$ zurück, so daß die lokale Helixganghöhe wieder den Wert von 10,5 bp pro Helixwindung erreicht (siehe Abb. 4 rechts).

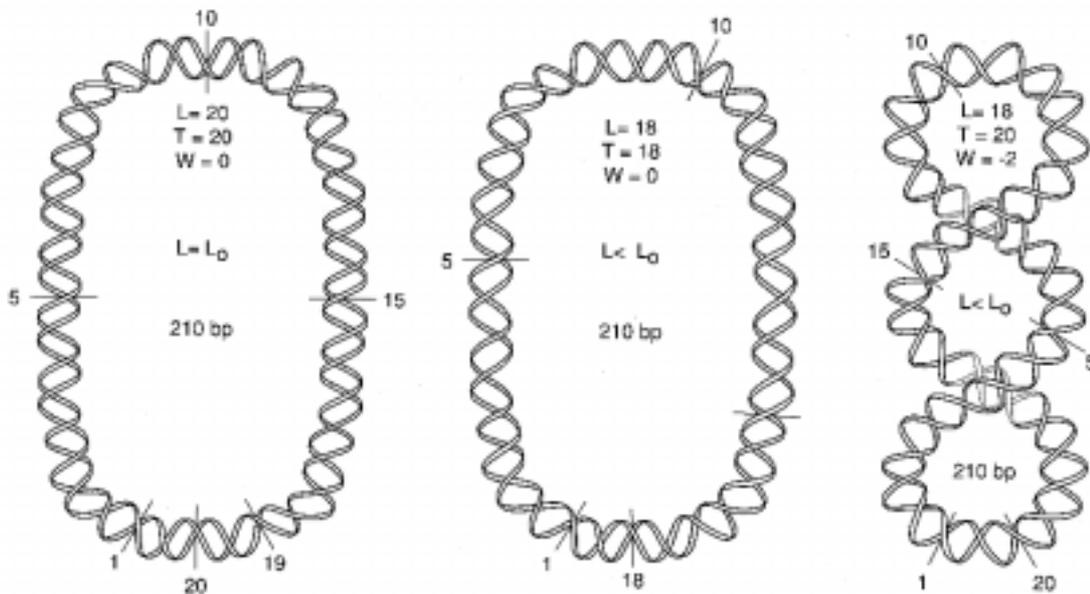


Abb. 4: Verknüpfung von Twist, Linking Number und Molekülformparameter Writhe
(entnommen Sinden 1994)

In topologisch fixierter DNA bewirkt das Einführen einer globalen Windung der Helix eine Veränderung der lokalen Helixganghöhe, umgekehrt kann eine Veränderung der Helixganghöhe durch die Einführung einer globalen Windung kompensiert werden.

Was hier "globale Windung" genannt wurde, wird in der Literatur allgemein als Supercoil, Superhelix oder als superhelikale Windung bezeichnet, um auszudrücken, daß die schon gewundene DNA mit ihrer Achse selber nochmal eine Windung im Raum beschreibt. Bei Windungen, für die die Linking Number sich verkleinert, die also einem "Entwinden" der Helix entsprechen, spricht man von negativen Superhelices, beim umgekehrten Vorgang von positiven Superhelices.

Wie am oben angeführten Beispiel bereits erkennbar, ist für die Beschreibung von DNA das Operieren mit absoluten Beträgen von T_w und L_k wenig hilfreich, da unterschiedlich lange DNA-Moleküle sehr unterschiedliche Werte für L_k und T_w haben, was den Vergleich zwischen verschiedenen Spezies von Molekülen erschwert. Aussagekräftiger ist eine Angabe, die von der Differenz zum Wert für L_k des entspannten Moleküls, also von der Differenz der Linking number

$$\Delta L_k = L_k - L_{k_0}$$

abgeleitet ist und als sogenannte relative superhelikale Dichte σ bezeichnet wird:

$$\sigma = \Delta L_k / L_{k_0}$$

Um diesen Begriff unmißverständlich zu verwenden, muß allerdings sauber definiert sein, was unter L_{k_0} verstanden werden soll. Gemeint ist immer ein "entspanntes" Molekül ohne Torsionsenergie. Dies ist einmal durch das Vorliegen des Moleküls ohne Windungen definierbar, wofür also gilt

$$W_r = 0, \quad \text{damit } L_{k_0} = T_w = n / h_0$$

Zum anderen ist vorstellbar, daß das Molekül für frei von Torsionsspannung angesehen wird, wenn $h_0 = 10,5$ bp ist. Damit wäre aber keine Aussage über den Wert von W gemacht, der Wert von h_0 kann ja dadurch erreicht worden sein, daß durch Einführen superhelikaler Windungen ($W \neq 0$) Änderungen in L kompensiert wurden.

Der Wert von h_0 für torsionsspannungsfreie DNA kann sich durch die Interkalation von Farbstoffen in die DNA dramatisch ändern; der dazugehörige Wert für L_0 ändert sich damit ebenso. Es ist also zu unterscheiden, ob man zur Bestimmung von L_0 von einem

torsionsspannungsfreien DNA-Molekül ausgeht, oder von einem h_0 mit dem Wert 10,5 bp pro Helixwindung.

Diese Formeln nun sind nicht nur bloße Strukturtheorie, sondern erhalten ihre Bedeutung dadurch, daß die Verwindung von DNA, ihr "supercoiling" eine reale Eigenschaft aller zellulären DNA ist, und eine Vielzahl biologischer Prozesse direkt oder indirekt von der Feinregulierung des lokalen topologischen Zustands der DNA abhängt. DNA in Zellen ist in den meisten beobachtbaren Zuständen unterwunden. Es sollen die möglichen Konsequenzen dieser Unterwindung kurz geschildert werden.

Die biologische Bedeutung von Superhelikalität

Struktur und Energie

Relaxierte DNA hat eine Ganghöhe von ca. 10,4 - 10,5 bp pro Windung. Diese Form ist ein Kompromiß aus den verschiedenen Anziehungs- und Abstoßungskräften, die in der Helix wirken. Die geladenen Phosphatreste in der Kette stoßen einander ab und begünstigen dadurch die Konformation mit maximalem Abstand zwischen ihnen. Gleichzeitig wechselwirken die π -Elektronensysteme in der Sequenz aufeinanderfolgender Basenpaare so miteinander, daß eine größtmögliche Überlappung zwischen ihnen energetisch günstig ist. Das Ergebnis dieser gegensätzlichen Kraftkomponenten ist die B-Form der DNA.

Wie oben gezeigt, bewirkt eine Änderung der Linking number L_k bei gleichbleibender Globalform des DNA-Moleküls ($\Delta W_r = 0$) eine Änderung der Helixganghöhe. Da Änderungen der Helixganghöhe in beide Richtungen mit einer Energieerhöhung verbunden sind, ist also die Änderung von L mit einer Erhöhung der Konformationsenergie des Gesamtmoleküls verbunden. Dreht man die DNA-Helix auf, oder zwingt man sie in eine engere Windung, so wirkt man gegen die Kräfte, welche die Trennung der Phosphatgruppen oder die Überlappung der aromatischen Ringe der Basen begünstigen. Die dabei geleistete Arbeit ist nach der Konformationsänderung in der DNA als Konformationsenergie gespeichert. Die DNA wird, wenn keine weiteren Randbedingungen vorliegen, die lokale Änderung der Helixganghöhe durch eine solche Veränderung der Globalform des Moleküls auszugleichen versuchen, daß wieder ein dem Wert $h_0 = 10,5$ möglichst naher Wert angenommen wird: das Molekül bildet superhelikale Windungen aus. Diese Windungen können zwei verschiedene Formen haben: toroidal oder plektonemisch.

Toroidale und plektonemische Superhelices

Toroidal (schleifenförmig) sind solche Helices, die aussehen, als seien sie um ein scheiben- oder zylinderförmiges Objekt, etwa ein Histonoktamer, gewickelt. Toroidale (auch: solenoide) Helices sind der Zustand, in dem die meiste DNA einer ruhenden Zelle in Nukleosomen verpackt als Chromatin vorliegt (Abb. 5).

In plektonemischen Helices ist die DNA um sich selbst gewickelt und die resultierende Superhelix ist verzweigt. Wenn Nukleosomen-gebundene solenoide DNA aus dem Nukleosomenverband gelöst wird, geht sie in den plektonemischen Zustand über. Beide Zustände liegen in der Zelle im Gleichgewicht vor; die Verpackung in Chromatin ist allerdings für einzelne Bereiche der DNA in ausdifferenzierten Zellen physiologisch kaum mehr rückgängig zu machen. (Ein wesentlicher Grund, warum die Klonierung von Tieren aus Zellkernen von offenbar ausdifferenzierten Zellen ein solches Aufsehen auch in Fachkreisen erregte, ist durch den damit demonstrierten Gegenbeweis zu eben angeführter These zu erklären.)

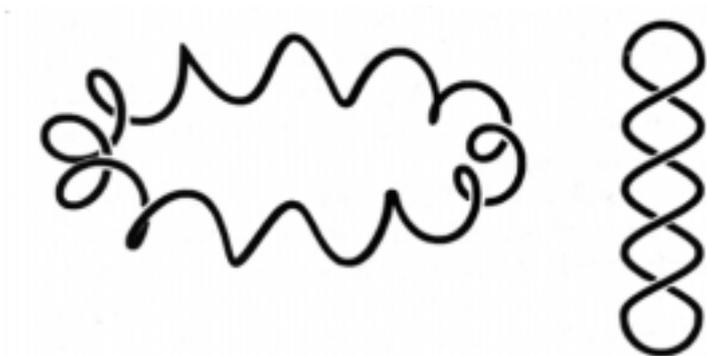


Abb. 5: Schematische Darstellung von toroidaler und plektonemischer Superhelikalität in einem ringförmigen Molekül (aus Cozzarelli 1990)

Topologisch (in Bezug auf den Parameter Lk) handelt es sich bei solenoider und plektonemischer DNA um den gleichen Zustand. Negative Superhelikalität induziert linksgängige toroidale Superhelices und rechtsgängige plektonemische Superhelices. Aufgrund der unterschiedlichen Helixganghöhe der Superhelix kompaktiert toroidale DNA das Molekül sehr effektiv, was für die Verpackung im Kern von Bedeutung ist. Ein wichtiger Aspekt von plektonemischer DNA ist, daß bei dieser Form in der Sequenz weit voneinander entfernte Abschnitte in sehr enge räumliche Nähe kommen können. So kann durch Molekülmodellierung gezeigt werden, daß die effektive radiale Konzentration eines auf der linearen Kontur der DNA einige hundert Basenpaare entfernten Abschnitts zu einem

anderen in superhelikaler DNA über zwei Größenordnungen höher ist als in relaxierter DNA (Vologodskii 1992). Sowohl für toroidale als auch für plektonemische Formen ist die Anzahl der Superhelices geringer als ΔL , die Differenz der Linking Number zwischen gespanntem und entspanntem Molekül. Dieses Phänomen wird als "linking number paradox" (Travers 1990) bezeichnet und hat seine Ursache in der Twistkomponente der Windung.

Toroidale oder plektonemische Superhelices sind zwei Strukturvarianten, die einen Teil der Unterwindungsenergie durch Ausbildung von räumlichen Überstrukturen kompensieren können. Die resultierende Kompaktierung der DNA ist sicherlich ein fundamentaler Aspekt der Superhelikalität. Daneben aber steht die im DNA-Molekül gespeicherte Torsions- oder Konformationsenergie auch für andere Phänomene zur Verfügung. Eine Reihe fundamentaler biologischer Prozesse, wie Transkription oder Replikation, verlangt die Strangtrennung der DNA. Thermisch ist dieser Vorgang erst bei sehr hohen Temperaturen zu erzwingen. In der Zelle stellt die lokale Konzentration von Konformationsenergie ein Energiereservoir für Strangtrennungsprozesse zur Verfügung, wobei nach den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen in Abhängigkeit von der Fixierung des Moleküls bzw. der freien Länge der Helix auch schon relativ geringe globale superhelikale Dichten lokale Denaturierung begünstigen. Neben dieser thermodynamischen Interpretation der topologieabhängigen Transkriptionsinitiation gibt es auch Beispiele, daß Zellen topologische Zustände zur Feinregulation der Transkription über topologieabhängige Sequenzerkennungsmechanismen benutzen. So ist z.B. die Expression bakterieller Enzyme, welche den topologischen Zustand der bakteriellen DNA regulieren, selber stark topologieabhängig (Menzel 1987). Es ist außerdem gezeigt worden, daß in Eukaryonten minimale Sets von Transkriptionsfaktoren zur Genexpression ausreichen können, wenn die Promotorregion unterwunden ist (Parvin 1993).

Es ist die Hypothese geäußert worden, daß das Auftreten von plötzlichen Amplifikationsereignissen in längeren Abschnitten von Triplet-Wiederholungen in der DNA mit der besonderen energetischen Stabilisierung des Supercoilings in diesen Abschnitten zusammenhängt (Gelliblian 1996). Diese Amplifikation von Triplet-Repeats von einer Generation zur nächsten kann zur Manifestation bestimmter neuromuskulärer Erkrankungen führen.

Alternative DNA-Strukturen

Neben der Ausbildung von superhelikalen Helices kann unterwundene DNA ihre Torsionsenergie dadurch erniedrigen, daß sie linksgängige Helixabschnitte ausbildet. Eine linksgängige Helixwindung kompensiert ein Defizit von 2 Lk. DNA kann als sog. Z-DNA in

linksgängiger Helix vorliegen (Rich 1984). Diese Struktur ist von B-DNA so verschieden, daß sie z.B. durch Antikörper von B-DNA unterschieden werden kann (Lafer 1981, Möller 1982).

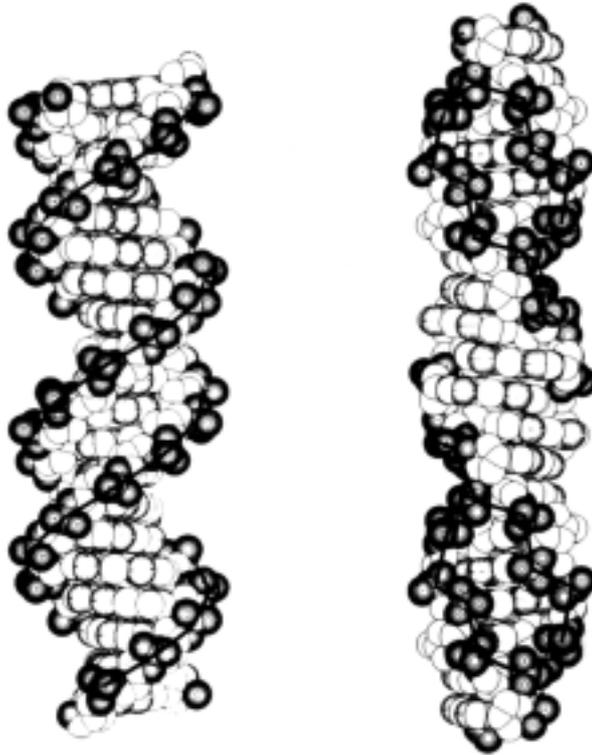


Abb. 6: B-DNA und Z-DNA (re.) (A. Rich, entnommen aus Stryer 1988)

Z-DNA hat insgesamt eine höhere Konformationsenergie als B-DNA, doch ist für Pyrimidin-Purin Dinukleotide diese Energiedifferenz vergleichsweise niedrig, so daß längere $(YpR)_n$ -Abschnitte eine erhöhte Neigung zeigen, bei Vorliegen negativer Superhelikalität Z-DNA auszubilden. Wittig et al. (Wittig 1989) konnten zeigen, daß diese Struktur auch in-vivo im Zellkern nachweisbar ist und dort vom Vorkommen von Torsionsspannung abhängt.

Eine andere Alternative ist die Ausbildung von Kreuzform-Strukturen, die ebenfalls negative Superhelices kompensieren können. Für die Ausbildung dieser Strukturen müssen wie für die Ausbildung von Z-DNA allerdings bestimmte Voraussetzungen hinsichtlich der Sequenz der betroffenen DNA-Abschnitte erfüllt sein. Da die DNA in Kreuzform-Strukturen eine doppelhelikale Struktur mit dem eigenen Strang ausbilden muß, sind palindromische Sequenzabschnitte (mit diadischer Symmetrie) Voraussetzung für diese DNA-Form. Reine $(CG)_n$ oder $(TA)_n$ -Sequenzen, die das $(YR)_n$ -Kriterium für die Ausbildung von Z-DNA erfüllen, sind auch palindromisch und können beide Formen ausbilden. Kreuzform-Strukturen

können einen Block für die Transkription darstellen, der durch das nicht-Histonprotein HMG1 aufgehoben werden kann (Waga 1990).

Neben dem "statischen" Supercoiling, welches in der Kern-DNA der Zelle immer festzustellen ist und in Kompaktierung oder Strangtrennung eine Rolle spielt, ist die Existenz zeitlich und räumlich eng begrenzter Domänen starken Abweichens von der "normalen" superhelikalen Dichte durch Transkriptions- und Replikationsprozesse postuliert und demonstriert worden. Dieses "Twin-domain-Modell" soll im übernächsten Abschnitt erläutert werden; vorher aber sei die Kompensation des Supercoiling durch Chromatinkondensation sowie die Existenz von topologisch isolierten Domänen im Genom der Zelle und deren Wirkung im Zusammenhang mit der Expressionsregulation beschrieben, da eine wesentliche Motivation für die Arbeit am hier vorgestellten System die in-vitro-Modellierung solcher topologisch fixierten Domänen war.

Histone, Nukleosomen, Chromatin

Chromosomale DNA liegt in der Interphase (zwischen Zellteilungen) als dicht gepackter Komplex mit basischen Kernproteinen vor. Die Packungsdichte übersteigt dabei die für freie DNA erreichbare Dichte um ein Vielfaches. Chromatin ist eine hoch organisierte Struktur, in welcher zelltypspezifisch verschiedene Regionen des Genoms unterschiedlich dicht verpackt sind. Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein DNA-Protein-Komplex aus zwei mal vier basischen Proteinmolekülen, den Histonproteinen, die an ca. 200 bp DNA gebunden sind (siehe Abb. 7).

Die Histonproteine H2a, H2b, H3 und H4 bilden dabei ein zylindrisches Hetero-Octamer, um die die DNA in zwei linksgängigen Windungen herumläuft. Die Nukleosomen sind ihrerseits im Chromatin zu höheren Strukturen geordnet; die nächsthöhere ist die 30 nm Faser aus einer linksgängigen Nukleosomen-Kette. Höhere Ordnungsebenen sind bekannt, aber schlechter charakterisiert. Man erhält bei Kernpräparationen, bei denen die Nukleosomen ganz oder teilweise von der DNA getrennt werden, sog. "loops" von 5-100 kb Länge, die im Elektronenmikroskop erkennbar sind und von denen man annimmt, daß ihre Enden die, oder einige der, Bindungsstellen der DNA an das Kernskelett darstellen, sog. "matrix-attachment-sites" (MAS). Demnach sind die höher geordneten Chromatinstrukturen alle 5-100 kb am Proteingerüst des Kerns aufgehängt.

Neben den genannten Histonproteinen bindet noch Histon H1 an die einzelne Nukleosomen verbindende "Linker-DNA"; daneben existieren zahlreiche "nicht-Histon-Proteine", die etwa 50% des Proteinanteils des Chromatins ausmachen, darunter die HMG

"high mobility group" Proteine sowie zahlreiche andere an Transkriptions- und Replikationsprozessen beteiligte Komponenten.

Die Histonproteine H3 und H4 gehören zu den Proteinen, die im Laufe der Evolution am wenigsten verändert wurden, Lehrbuchbeispiel ist die große Ähnlichkeit zwischen den Spezies aus Mensch und Erbse. Die Organisation der Kern-DNA in Nucleosomen ist demnach nicht nur eine sehr frühe "Errungenschaft" von kernhaltigen Zellen, sondern Teile

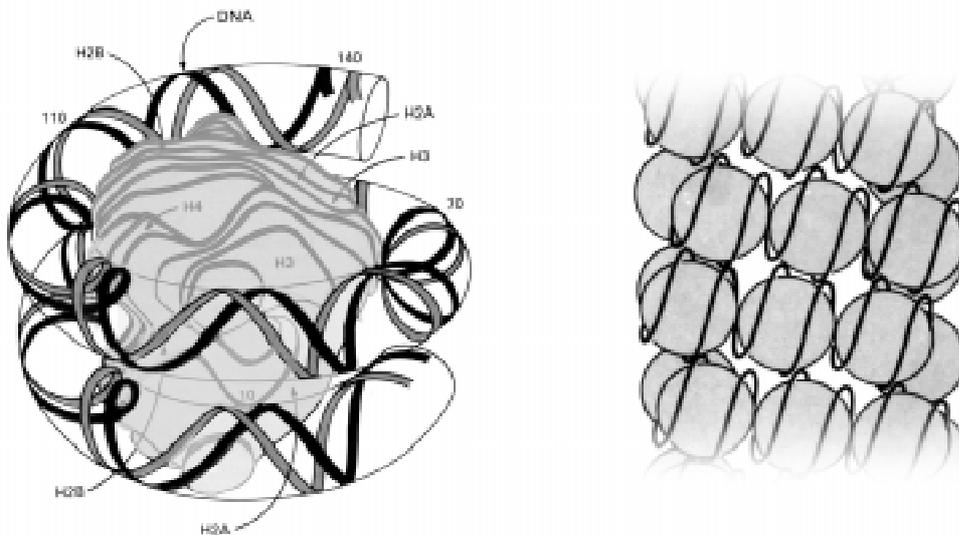


Abb. 7: Die um das Histonoktamer gewundene DNA (li) ist in Heterochromatin in höher geordnete Strukturen kompaktiert (re.) (aus Stryer 1988).

der Nucleosomen-Grundstruktur haben auch offensichtlich eine so unverzichtbare Funktion innerhalb des DNA-Informationshaushalts, daß sie in mehreren Milliarden Jahren nicht verändert wurden. Es liegt nahe, daß diese Funktion nicht lediglich auf eine passive Verpackung von DNA beschränkt ist. Eine genauere Charakterisierung des Beitrages der Histonproteine zur Genexpressionsregulierung ist allerdings immer noch Gegenstand der Forschung.

Histonproteine werden zellzyklusabhängig modifiziert. So können Lysinreste methyliert oder acetyliert und Serinreste phosphoryliert werden, was jeweils die Basizität des Histonproteins herabsetzt und die Loslösung der DNA erleichtert.

Man unterscheidet mikroskopisch und funktionell "Euchromatin" und "Heterochromatin". Heterochromatin bezeichnet eine sehr dichte Packung der Nucleosomen, vergleichbar mit der in den mitotischen Chromosomen, in der die DNA für die Transkriptionsmaschinerie der

Zelle dauerhaft unzugänglich ist. Es handelt sich somit um eine Art "reprimierten Zustands" der im Zellkern enthaltenen Information. Euchromatin hingegen ist durch eine lockerere Packung gekennzeichnet, die Transkription der so verpackten Gene ist prinzipiell möglich. Genauere Aussagen hinsichtlich der Verpackung von DNA liefert die Analyse der Chromatinstruktur durch Enzyme, welche DNA (relativ) sequenzunspezifisch zerschneiden, sogenannte DNAasen. In dicht verpackter DNA (Heterochromatin) kann die DNase nicht arbeiten, die Sequenz überdauert einen DNAase-Verdau unbeschadet. Je lockerer die Packung der DNA im Chromatin ist, desto sensitiver wird diese gegenüber dem Verdau. Sog. hypersensitive Abschnitte korrelieren gut mit einer sehr offenen, transkriptionsaktiven Struktur. In solchen Abschnitten wird die Rekonstitution von Nukleosomen offenbar durch die Assoziation von DNA-bindenden regulatorischen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren verhindert.

Die Anordnung von Nukleosomen auf der DNA ist in ihrer Lage auf der Sequenz nicht zufällig. AT-reiche Sequenzen z.B. haben größere Bereitschaft zur notwendigen Verbiegung der Helix; solche in Phasen angeordneten höheren Verteilungen bestimmter Sequenzmotive erleichtern das Winden der DNA um die Histone. Es wird immer noch diskutiert, ob die Nukleosomenpositionierung eine ausschließlich in der Sequenz liegende Ursache hat ("intrinsische Positionierung") oder durch ein an einer bestimmten Stelle liegendes, "extrinsisches" Signal, z.B. ein gebundenes Protein oder eine "Anfangs-Bindungsstelle" in einer Kette von Nukleosomen gesteuert wird. Es gibt Beispiele für beide Mechanismen (Wolffe 1994). Nukleosomenpositionierung ist ein für verschiedene Gene unterschiedlich stark ausgeprägtes Phänomen und ist als ein Mechanismus der Transkriptions- und Expressionskontrolle beschrieben (Wittig 1982). Die genaue Position eines Nukleosoms beeinflusst die Verfügbarkeit einer auf der dazugehörigen DNA oder in ihrer Nähe liegenden Bindungsstelle für DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Polymerasen. Auf diese Weise kann die erste Position eines Nukleosoms in einer Kette durch ihren Einfluß auf die Position der nachfolgenden Nukleosomen die Zugänglichkeit einer Enhancer- oder Repressorsequenz beeinträchtigen (Wittig 1979).

Lokale Domänen aktivierter Chromatinstruktur

Sowohl aus der theoretischen Betrachtung wie aus experimentellen Befunden geht hervor, daß eine funktionelle Abgrenzung zwischen Domänen unterschiedlicher Aktivität auf der Ebene der zellulären Informationsverarbeitung vorgenommen werden muß. Wie unten erläutert, scheinen sich solche Domänen u.a. immer dadurch auszuzeichnen, daß sie topologisch von den Nachbarregionen isoliert sind.

Promotoren, Enhancer

Um die Transkription eines Gens zu steuern, bedarf es eines örtlichen Startsignals für die RNA-Polymerase. Dieses Signal wird funktionell als Promotor definiert, es handelt sich dabei um eine Sequenz, an die der Multienzymkomplex mit dem TATA-Box bindenden Faktor (TBP) als Kern bindet. Die Entscheidung, ob und in welcher Menge ein Gen transkribiert wird, wird darüber hinaus von einer Vielzahl von Signalen beeinflusst, die durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA wirken; Sequenzen, an die solche regulatorischen Proteine binden können, sind funktionell als Enhancer definiert (Thompson 1992, Blackwood 1998). Diese Sequenzen haben für sich keine Promotorfunktion, sondern sind akzessorische Signale, die auf einen oder mehrere Promotoren wirken; es können auch mehrere Enhancer mit einem Promotor, oder verschiedene Enhancer gewebsspezifisch unterschiedlich mit dem selben Promotor kommunizieren. Enhancer können in beiden Richtungen mehrere tausend Basenpaare weit von der Promotorregion entfernt liegen, auf die sie wirken, oder innerhalb der kodierenden Sequenz selbst.

Isolatoren

Wie oben erläutert, ist von der Gesamtzahl an Genen eines Genoms immer nur ein Bruchteil aktiv; der inaktive Teil ist dabei als Heterochromatin dauerhaft "weggepackt". Es muß einen Übergang zwischen transkriptionsaktiven und reprimierten Sequenzabschnitten ("Domänen"), also zwischen Eu- und Heterochromatin geben. Es gibt zahlreiche experimentelle Befunde (Wolffe 1994) nach denen dieser Übergang sehr scharf, gleichsam als Grenze, definiert ist, und nach denen in funktionellem Zusammenhang stehende Gene in räumlicher Nähe auf den Chromosomen angeordnet sind und koordiniert aktiviert werden. Ein prominentes Beispiel dafür ist der Cluster der Globingene, in denen die Gene für die verschiedenen Ketten des Hämoglobins, die differenzierungsspezifisch vom Embryo bis zum Erwachsenen exprimiert werden, angeordnet sind. Solche Cluster können über hunderttausend Basenpaare Größe haben; die Aktivierung der entsprechenden DNA-Abschnitte erfolgt koordiniert und isoliert von den direkt angrenzenden Abschnitten.

Die Forderung nach einer höheren Ordnung und Abgrenzung kann auch aus einer die Architektur der Transkriptionseinheiten betreffenden theoretischen Überlegung begründet werden. Die Expression der in Clustern enthaltenen Gene wird von Enhancersequenzen gesteuert, die auf zum Teil viele tausend Basenpaare entfernt liegende Promotoren einwirken können. Bei 3×10^9 bp pro haploidem Genom und ca. 10^5 darin enthaltenen Genen liegt der durchschnittliche Abstand zwischen einem Gen und seinem "Nachbarn" bei ca. 3×10^4 , also in einer ähnlichen Größenordnung wie der mögliche Abstand eines

Enhancers von dem zugehörigen Promotor. Man erkennt, daß es einen Mechanismus geben muß, einem Enhancers eine bestimmte Zielstruktur zuzuordnen.

Diese Grenzen oder Isolatoren zwischen Domänen sind tatsächlich in einigen Fällen bis auf Sequenzebene aufgeklärt worden. Die bekanntesten Beispiele sind die sog. scs-Sequenzen (specialized chromatin structure) sowie das gypsy-retrotransposon-Element, beide aus *Drosophila*, sowie Isolatorsequenzen aus dem β -Globin-Cluster von Mensch und Huhn.

Diese Elemente wurden bei Untersuchungen gefunden, die ursprünglich dem Problem galten, daß bei gentechnischer Insertion von Testkonstrukten aus einem Reporter gen unter Kontrolle eines starken eukaryoten Promotors in zufällige Positionen auf dem Chromosom der Fliege diese Testkonstrukte sehr unterschiedliche Expressionsaktivitäten zeigten, obwohl sie in ihrer "natürlichen" Umgebung ein hohes Maß an Transkriptionsaktivität zeigten. Dieser Positionseffekt ("position effect variegation", Kellum 1991) ist abhängig davon, an welcher Stelle das Konstrukt ins Genom integriert wurde. Als Ursache dieses Phänomens wurde bisher angenommen, daß bei Insertion des Konstrukts in Bereiche von Heterochromatin sich dessen repressive Struktur in das Konstrukt hinein ausbreitet. Es gibt allerdings mindestens ein Beispiel aus dem "brown" locus von *Drosophila*, daß auch eine homologe, in Heterochromatin vorliegende Sequenz des Schwesterchromosoms diesen Effekt in *trans* bewirken kann. Es scheint hier die Sequestrierung in reprimierende Kernregionen verantwortlich zu sein (Dernburg 1996).

Die bei *Drosophila* im hsp70-Gen gefundenen scs-Elemente verhindern das „Eindringen“ von Heterochromatin in stabil integrierte Expressionstransgene (Kellum 1991). Diese Sequenzen etablieren einen vom Chromatin-Kondensationszustand umliegender Regionen unabhängigen Abschnitt, haben keine eigene Aktivierungsfunktion, isolieren aber funktionell voneinander abhängige Enhancer- und Promotorpaare, wenn sie zwischen diese insertiert werden, und verhindern deren Kooperation. Die unmittelbar an das scs-Element angrenzenden Abschnitte zeigen im Psoralen-crosslink-assay *in vivo* nach innen (zueinander) ein hohes Maß an nichtkompensierter Superhelikalität, während nach außen keine Superhelikalität detektiert wird, was dafür spricht, daß nach außen die DNA als Heterochromatin vorliegt, während innen offene, transkriptionsbereite DNA-Abschnitte vorliegen (Jupe 1995, Zhao 1995).

Locus-Kontrollregionen

Neben den funktionell über ihre negative Funktion definierten Isolatoren (Verhindern von Kondensation von Heterochromatin) sind schon früher Sequenzelemente charakterisiert

worden, die durch ihre Anwesenheit die Dekondensation von Chromatin aktiv bewirken. Diese sog. Locus-Kontrollregionen ("locus control region", LCR) wurden zuerst im humanen β -Globin-Locus charakterisiert (Grosfeld 1987). Die Anwesenheit eines LCR auf einem transgen übertragenen Konstrukt in Mäusen ruft die DNase-Hypersensibilität des ganzen übertragenen Abschnitt hervor. Die Anwesenheit der LCR kann auf über 100 kb Dekondensation des Chromatins bewirken. Funktionell wird durch die LCR-Sequenz die Insertionsstellen-unabhängige Expression von Transgenen ermöglicht. Dies wird nicht durch eine Isolatorfunktion bewirkt, sondern durch dominant positive Aktivierung von Genaktivität (Dillon 1993); die LCR-Sequenzen heben also den Effekt von *position effect variegation* auf.

Die Definition der LCR-Sequenzen ist wie die der Isolatoren, Enhancer und Promotoren rein funktionell; ein LCR ist per Definition kein Enhancer, was Fall für Fall durch transiente Expressionsstudien überprüft werden kann. Es gibt dennoch Sequenzen, in denen sich beide Funktionalitäten vereinen können. Für die Wirkung der LCR werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Da ihre Wirkung auf stabil ins Genom integrierte Sequenzen beschränkt und in auf transiente Genexpression beruhenden Assays nicht erkennbar ist, liegt die Vermutung nahe, daß sie einen Effekt auf die Chromatinstruktur haben. Manche LCR enthalten eine "Überzahl" von Protein-bindenden Sequenzen; wahrscheinlich ist ihre Funktion die, durch Störung einer etwaigen Nukleosomenkondensation den Promotor frei zu halten (Felsenfeld 1992). Wie dieser Mechanismus allerdings die Dekondensation von mehreren hundert Kilobasen erklären soll, ist nicht ohne weiteres einzusehen.

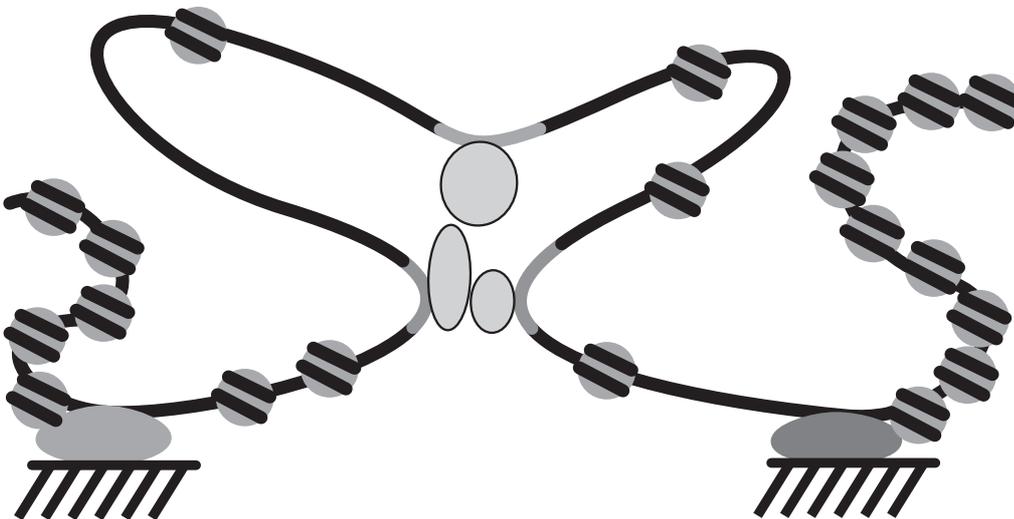


Abb. 8: Organisation des Genoms in Domänen: Die DNA ist über Proteine an der Kernmatrix gebunden (unten l.+r.); dadurch werden Domänen unterschiedlicher Kondensationsdichte durch die Anordnung der Nukleosomen definiert. In einer aktivierten Domänen (mitte) können weit voneinander entfernte liegende Sequenzabschnitte (heller) zur Genregulation zusammenwirken.

Kerngerüst

Das gesamte Kerninnere ist eine hochorganisierte Struktur, in der die Transkriptions- und Replikationsmaschinerie einen Teil des den Kern durchziehenden Proteingerüsts bildet (Cook 1999). Über die genaue Organisation des Kerns ist relativ wenig bekannt. Neben den in Relation zur Expression von Genen charakterisierten Sequenzelementen wie Promotoren, Isolatoren oder LCR lassen sich auch DNA-Abschnitte dadurch definieren, daß sie mit dem Kerngerüst (der nuklearen Matrix oder Kernskelett) in vivo verbunden sind. Solche Sequenzen bezeichnet man als MAR/SAR (matrix attachment regions, scaffold attachment regions) (Laemmli 1992). Es gibt keine große Sequenzähnlichkeit zwischen den gefundenen Sequenzen, doch handelt es sich generell um A/T-reiche Sequenzelemente.

Das Twin-Domain-Modell

Bis hierher ist dargelegt worden,

- daß der topologische Zustand von DNA einen wesentlichen Einfluß auf deren Struktur ausübt und somit zu Inhalt und Zugänglichkeit ihres Informationsgehaltes beiträgt,
- daß eine Abweichung von der relaxierten Konformation der B-DNA eine Erhöhung des Gehaltes der DNA an Konformationsenergie zur Folge hat, wobei diese Energie z.B. zur Strangtrennung oder für Kompaktierungsprozesse genutzt werden kann.

Außerdem soll noch einmal erwähnt werden, daß negative Superhelikalität ein aus allen Organismen bekanntes Phänomen ist. So sind bei der Isolierung von Plasmiden aus Pro- oder Eukaryonten diese in der Regel unterwunden, und genomische DNA wird bei Wahl einer hinreichend schonenden Methode auch in diesem Zustand isoliert. Solche Untersuchungen geben allerdings immer nur über einen zeitlich lang andauernden Zustand Aufschluß und lassen keine Aussagen über kurzfristig in der Zelle auftretende Strukturen zu, da Superhelikalität auf der Helix diffundieren kann und sich, bei Abwesenheit geeigneter Isolatoren, so weit wie möglich verteilt. (Der Grund für diese Diffusion liegt darin, daß die Konzentration von superhelikaler Energie auf kurzen Sequenzabschnitten energetisch viel ungünstiger ist als die Diffusion über einen langen Sequenzabschnitt; siehe dazu mehr weiter unten.) Die experimentell gefundene Superhelikalität ist also über einen großen Sequenzabschnitt gemittelt, etwa ein Plasmid oder einen chromosomalen Loop, und mißt die Torsionsspannung "ex post" nach Dekondensation des Chromatins oder der Dissoziation nukleinsäurebindender Proteine. Somit ist der Befund negativer Superhelikalität in Zellen nur ein anderer Ausdruck dafür, daß Chromatinkondensation Superhelikalität kompensiert

und durch diese andererseits ermöglicht wird, und daß beide in einem irgendwie gearteten Gleichgewicht vorliegen. Über das "wann", "wie" und "wie viel" dieser Gleichgewichtseinstellung wird damit keine Aussage gemacht.

Ebensowenig ist der genaue Mechanismus der Transkription im Zusammenhang mit der Nukleosomenstruktur geklärt worden; so findet man, daß auch transkribierte Gene positionierte Nukleosomen aufweisen können, was dafür spricht, daß zum Ablesen der DNA keine vollkommene Dissoziation der Histone notwendig ist. Es ist sogar demonstriert worden, daß die Histone während der Passage der Polymerase mit der DNA in Kontakt bleiben (Felsenfeld 1996).

1987 wurde ein Modell publiziert, in dem erstmals eine zeitlich und räumlich klar definierte Entstehung von Superhelikalität durch Polymeraseaktivität auf der DNA postuliert wurde (Liu 1987, Wang 1993). Durch das dort vorgeschlagene Modell zur Erzeugung von Torsionsspannung wurde es möglich, verschiedene Vorgänge im Zusammenspiel von Transkriptionskontrolle und Chromatinstruktur über topologische Mechanismen miteinander zu verknüpfen. Diesem "Twin-Domain-Modell" liegen zwei sehr einfache und plausible Annahmen zugrunde:

1. ein DNA-Molekül ist als Templat der Transkription oder Replikation in der Regel an den Enden topologisch fixiert, sei es durch Verankerung am Kernskelett oder durch Bindung an Proteine, die die freie Drehbarkeit der Enden einschränken, und
2. auch die Polymerase ist in der Regel nicht frei drehbar, da sie entweder (in Prokaryonten) durch die wachsende Kette der RNA, mit eventuell daran haftenden Ribosomen, einen zu großen hydrodynamischen Widerstand hat, um um die DNA herum zu rotieren, oder weil sie (in Eukaryonten) als Bestandteil des Kernskeletts fest verankert ist.

Aus diesen einfachen Prämissen ergibt sich eine dramatische Konsequenz: wenn beide Partner nicht rotieren können, müssen sich bei der Polymeraseaktivität, die eine relative Bewegung des Enzyms bezüglich der Helixachse darstellt, die Windungen der Helix vor der Polymerase verdichten, hinter ihr hingegen aufdrehen. Es entsteht also vor der Polymerase positive, hinter ihr negative Superhelikalität (siehe Abb 9).

Der Mechanismus ist leicht visualisierbar, wenn man z.B. einen Stift ("Polymerase") in die Windungen einer verdrehten Telefonschnur steckt und ihn in eine Richtung schiebt. Bei diesem Versuch wird auch die energetische Komponente der Superhelikalität plastisch vermittelt: während die ersten Zentimeter die "Polymerase" noch durch die Telefonschnur "lesen" kann, ohne daß nennenswert Widerstand zu spüren wäre, so wird die Bewegung bei zunehmender relativer Dichte der Überwindung vor der Polymerase immer schwerer. In DNA

leistet auch die negative Superhelikalität hinter der Polymerase einen Beitrag zu dieser Energie, der aber im Telefonschnurmodell nicht geeignet repräsentiert wird.

Es gibt Hinweise darauf, daß die Polymerase bevorzugt auf sog. "apikalen Loops", d.h. Schleifen am Ende von plektonemischen Helices lokalisiert ist und die DNA durch diesen Loop durchläuft (ten Heggeler-Bordier 1992).

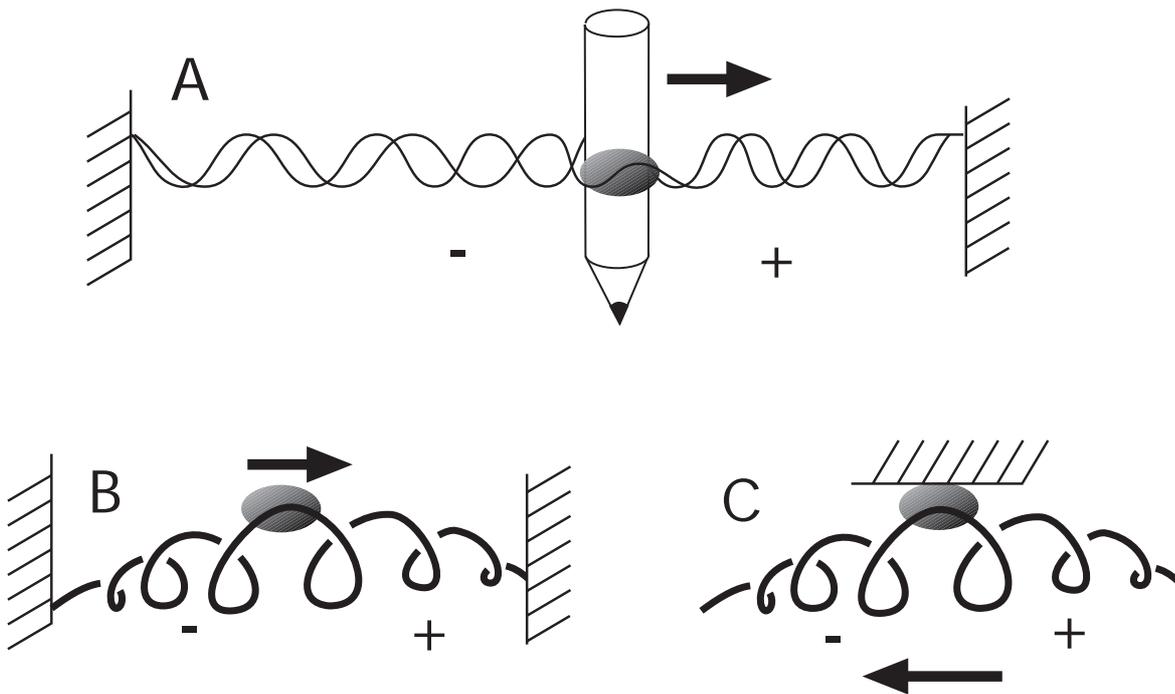


Abb. 9: Das Twin-Domain-Modell (nach Liu & Wang 1987). Die Polymerase „schiebt“ sich durch die Windungen der Doppelhelix, ohne die Rotationsbewegung der Strangachse mitzugehen (A), und schiebt deshalb vor sich superhelikale Windungen zusammen und läßt hinter sich Unterwindungen zurück (B). Gemeinhin wird im Modell eine bewegliche Polymerase dargestellt (B), doch ist wahrscheinlich die Polymerase der an der Matrix verankerte Partner, und die DNA wird an dieser vorbeigezogen (C) (siehe Text).

In Abhängigkeit der freien Länge der DNA vor und hinter der Polymerase, über die sich die Superhelikalität verteilen kann, enthalten die entstehenden superhelikalen Windungen eine immer höhere Energie, und die Polymerase läuft früher oder später auf eine Feder aus Torsionsspannung zu (und ein immer stärkerer Sog von Torsionsspannung negativen Vorzeichens baut sich hinter ihr auf). Es muß Mechanismen geben, die dadurch entstehende Energiebarriere abzubauen oder zu kompensieren. Einer dieser Mechanismen besteht offensichtlich in der Dekondensation von Nukleosomen vor und Kondensation von Nukleosomen hinter der durchlaufenden Polymerase, da diese Prozesse genau

gegenseitige Superhelikalität in der DNA erzeugen. Eine andere Lösung liegt in der Wirkung von Enzymen, sog. Topoisomerasen, die den topologischen Zustand von DNA verändern können. Bevor zu den experimentellen Fundamenten des Twin-Domain-Modells weitere Ausführungen gemacht werden, sollen diese Enzyme kurz vorgestellt werden.

DNA-Topoisomerasen

Die Topologie am Kernskelett topologisch fixierter DNA, ausgedrückt in der Linking-Number Lk , kann ohne den Bruch mindestens eines Stranges nicht geändert werden. Zur Regulierung der Torsionsspannung in DNA ist eine Änderung des Parameters Lk notwendig; dies wird in der Zelle von sog. Topoisomerasen (auch: Helicasen) bewerkstelligt. Es handelt sich dabei um Enzyme, die durch Strangbruch, Umeinanderführen der DNA-Stränge und anschließende Religation des Zucker-Phosphatrückgrates den Wert von L verändern können (zur Übersicht: Wang 1996). Man unterscheidet mechanistisch zwei Klassen von Topoisomerasen. Die Enzyme der Klasse I trennen nur einen Strang, ändern durch einen noch in der Diskussion befindlichen Mechanismus den Wert für L im Substrat um eins oder ein Vielfaches davon, und religieren den gebrochenen Strang. Typ-I Topoisomerasen arbeiten ATP-unabhängig. Topoisomerasen der Klasse II (auch gelegentlich als Gyrasen bezeichnet) lösen beide Stränge während ihrer Aktivität, wodurch typischerweise in der als Substrat dienenden DNA der Wert für L um zwei oder ein Vielfaches davon geändert wird. Topoisomerasen sind Bestandteile des Proteinrepertoires aller bekannten Pro- und Eukaryonten, sowie einiger Viren der Pockenvirus- und Bakteriophagenfamilien. Phylogenetisch können sie in drei Klassen aufgeteilt werden: die Klasse IA, deren Prototyp die Topoisomerase I aus *E. coli* (Wang (1971) ist, die aber mit dem Genprodukt des menschlichen topIII Gens Ähnlichkeit aufweist; die nur in Eukaryonten gefundene Klasse IB mit dem Hauptvertreter der eukaryoten Topoisomerase I (Champoux 1972), sowie die Familie der Klasse II Enzyme aus beiden Reichen.

Klasse I Topoisomerasen

Die beiden Gruppen der Klasse I Topoisomerasen weisen mechanistische Unterschiede auf: Die Topoisomerase IB aus Eukaryonten löst einen Strang endonukleolytisch und bindet dabei das 3'-Ende kovalent an einen Tyrosinrest. Nach Relaxation der topologisch gespannten DNA wird der Strangbruch wieder geschlossen; diese Reaktion erfordert kein ATP. Das Enzym hat eine gewisse Sequenzpräferenz, die Konsensus-Präferenzsequenz lautet (non-T)WT[^]N. ("^" markiert dabei die Bruchstelle; W = (A oder T)) (Porter 1989).

DNA-Topo-Isomerase IA aus Prokaryonten bindet das 5'-Ende der unterbrochenen Kette. Nur dieses Enzym benötigt Magnesiumionen zur Aktivität; es ist dafür auch die Isolierung kovalenter Komplexe zwischen DNA und Protein beschrieben worden, dabei wurde die Reaktion in Abwesenheit von Magnesium durchgeführt (zitiert nach Champoux 1990). Magnesium ist demnach nur für die Religationsreaktion ein notwendiger Kofaktor.

Topoisomerase IB bindet präferentiell an superhelikale DNA (Muller 1985), wobei das Vorzeichen der Superhelikalität keine Rolle spielt (Madden 1995). Dieser wegen der Unähnlichkeiten der lokalen Struktur unter- oder überwundener DNA überraschende Befund kann dadurch erklärt werden, daß Topoisomerase I präferentiell an Knoten oder Kreuzungspunkte der Duplex bindet, deren Auftreten nur von der Superhelikalität, nicht aber von deren Vorzeichen abhängt. Entsprechend dieser Hypothese wird auch elektronenmikroskopisch eine bevorzugte Lokalisation des Enzyms an solchen Stellen gefunden (Zechiedrich 1990).

Der nukleophile Angriff des Tyrosins auf den DNA-Phosphodiester ist basenkatalysiert, die Rückreaktion säurekatalysiert, wie Untersuchungen der pH-Abhängigkeiten der Einzelreaktionen zeigen (Stivers 1994). Die Kristallstruktur der an DNA gebundenen menschlichen Topoisomerase I in 2,8 Å Auflösung beschrieben worden (Redinbo 1998). Aus den gefundenen Strukturdaten konnten die Autoren ein Modell des molekularen Mechanismus der Enzymaktivität ableiten (Stewart 1999).

Topoisomerase I ist in Eukaryoten neben ihrer Topologie-modifizierenden Aktivität auch in anderen Rollen an der Signalverarbeitung im Zellkern beteiligt; so ist sie als Transkriptionsfaktor-bindender Partner bei der Suppression der basalen Transkriptionsrate und der Stimulation der GAL4-AH-induzierten Transkription identifiziert worden (Kretzschmar 1993), wobei diese Funktion unabhängig von der Relaxationsaktivität des Enzyms ist, wie durch Mutation der DNA-akzeptierenden Aminosäure von Tyrosin zu Phenylalanin gezeigt werden konnte (Merino 1993). Weiterhin phosphoryliert Topoisomerase bestimmte Serin-Arginin-reiche splicing-Faktoren (Rossi 1996, Tazi 1997) und bindet ebenfalls an mismatch-Basenfehlpaarungen und hat dort endonukleolytische Aktivität (Yeh 1994). Das Enzym wird nach DNA-Schädigung z.B. durch UV-Bestrahlung als kovalenter Komplex an der DNA gefunden (Subramanian 1998) und interagiert mit p53 (Gobert 1999), einem Schlüssel-molekül für die Zellzykluskontrolle und die Kontrolle der Genomintegrität.

DNA-Topoisomerasen der Klasse II

Topoisomerasen der Klasse II unterscheiden sich mechanistisch von den Klasse-I Enzymen dadurch, daß sie beide Stränge der DNA trennen, wodurch typischerweise in der als Substrat dienenden DNA der Wert für L um zwei oder ein Vielfaches davon geändert wird. Ebenfalls wird durch diese Aktivität die Dekatenierung von ineinander verschränkten Ringen, und damit auch die Segregation der bei der Replikation entstehenden Tochterstränge ermöglicht. Alle Klasse-II-Enzyme liegen als Dimere vor und benötigen für ihre Aktivität ATP als Kofaktor der Religationsreaktion. Die Topoisomerase II aus *E.coli* kann ATP-abhängig in relaxierte DNA *in-vitro* negative Superhelikalität einführen. Inwieweit diese Aktivität *in-vivo* von Bedeutung ist, mag fraglich sein angesichts der Tatsache, daß nach dem twin-domain-Modell die Erzeugung negativ superhelikaler DNA als Produkt anderer Triphosphat-hydrolysierender Prozesse wie der Polymeraseaktivität auftritt und auf der Ebene ihrer Relaxation durch Topoisomerase I kontrolliert werden kann. Arndt-Jovin et al. (1993, ebenfalls Glikin 1991) berichten von einer präferentiellen Bindung des Enzyms aus *Drosophila* an Z-DNA.

In Menschen findet man zwei Gene für Topoisomerase II, TOP2a und TOP2b. Die Enzyme werden zellzyklusabhängig phosphoryliert und sind Teile der nuklearen Matrix.

Topoisomeraseinhibitoren

Topoisomerasen sind, wie oben geschildert, essentiell für die Prozesse der Transkription und vor allem der Duplikation des Genoms und der Tochterstrang-Segregation, also besonders wichtig für die Zellteilung. Inhibitoren der Topoisomerase I- oder II wurden als Zielstruktur für Medikamente identifiziert, die bereits vor der Aufklärung ihres Wirkmechanismus erfolgreich klinisch eingesetzt wurden. Die Stoffklasse ist von erheblichem pharmakologischem Interesse. Topoisomerasehemmer werden bei Indikationen eingesetzt, bei denen die Hemmung der Zellteilung im Vordergrund steht: als onkotherapeutische Zytostatika und als anti-infektive Antibiotika und Antimykotika. Für beide Anwendungen wird es auch in der Zukunft Bedarf an neuen Leitstrukturen geben, da vorhandene Wirkstoffe entweder nicht optimal wirken bzw. zu nachhaltigem Heilerfolg führen, oder die Entwicklung von Resistenzen in der Natur des zu bekämpfenden Erregers liegt.

Im Rahmen eines allgemeinen Paradigmenwechsels in der pharmazeutischen Industrie gewinnen zunehmend Systeme an Bedeutung, bei welchen die Wirkstoffsuche nicht mehr rational und von bekannten, zufällig gefundenen Leitstrukturen ausgeht, sondern neue Leitstrukturen durch flächenhafte Suche und ein "Gegeneinanderlaufen" großer

vorhandener oder durch kombinatorische Chemie hergestellter Strukturbibliotheken gegen einfache und automatisierbare Testsysteme gefunden werden sollen. In diesem Zusammenhang der sog. Hochdurchsatzsuche oder "High Throughput Screening" ist das hier vorgestellte System besonders gut verwendbar.

Zu den wenigen bisher bekannten Inhibitoren der eukaryonten Topoisomerase-I gehören die vom Camptothecin abgeleiteten Strukturen. Camptothecin ist ein Alkaloid des asiatischen Baumes *Camptotheca acuminata* und wurde in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts als Zytostatikum entdeckt. Seitdem als Zielstruktur der Substanz die Topoisomerase I entdeckt wurde (Hsiang 1985, 1988), hat sich das Interesse an dieser Verbindung erhöht und es befinden sich zur Zeit mehrere wasserlösliche Derivate in der klinischen Prüfung. Wesentlich für die Wirkung der Substanz ist offenbar die Hydroxygruppe an Position 20 (s. Abb. 10) (Hertzberg 1989). Die Einführung einer Hydroxylgruppe an Pos. 10 erhöht die Stabilität des Camptothecin:DNA:TopoI-Komplexes und damit die Wirksamkeit der Substanz (Tanizawa 1995).

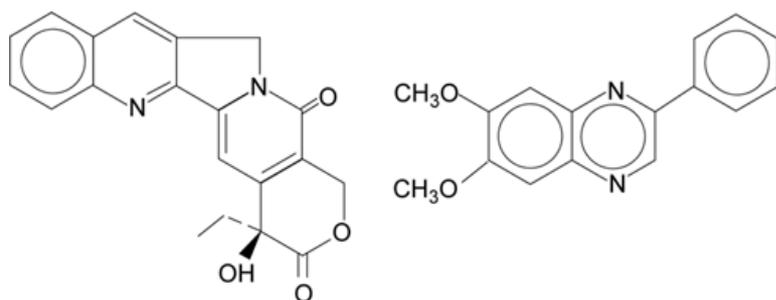


Abb. 10: Inhibitoren der Topoisomerase I: Camptothecin (I.), Tyrphostin 1295

Camptothecin bindet an den binären Komplex von DNA und Enzym und inhibiert dessen Dissoziation. Der Mechanismus der Aktivität von Topoisomerase I kann in mehrere Schritte unterteilt werden: das Enzym bindet zunächst an die DNA, hydrolysiert dann einen der Stränge, wobei das Enzym eine kovalente Bindung mit dem 3'-Ende dieses Stranges eingeht, und das 5'-Ende der entstehenden Lücke frei drehbar ist. Dadurch kann sich die Topologie der Helix (passiv) ändern. In einem letzten Schritt wird dann der hydrolysierte Strang wieder ligiert. Camptothecin inhibiert bzw. verlangsamt den Schritt der Religation (Porter 1989). Wie oben erwähnt, hat Topoisomerase I eine nicht genau definierte Konsensus-Präferenzsequenz (non-T)WTⁿN. Verschiedene Variationen dieser Sequenz zeigen (in Abwesenheit des Inhibitors) unterschiedliche Religationsgeschwindigkeiten; Camptothecin hemmt offenbar besonders die langsamen Religationsschritte (Porter 1989). Ein vorgeschlagener Mechanismus der Wirkung ist die Interkalation des Camptothecin

zwischen die die Trennstelle markierenden Basen, wobei hier die Interkalation in Stellen, in denen die 5'-Base (die +1-Position relativ zur Trennstelle) ein G bildet, bevorzugt wird (Jaxel 1991). Camptothecin bindet nicht in nennenswerter Weise an einen der beiden isolierten Reaktionspartner, ist zu keinem Moment selbst kovalent an einen der Partner gekoppelt und seine Wirkung kann durch Verdünnen der Lösung gemindert werden

Es konnte gezeigt werden, daß die toxische Wirkung des Camptothecins auf Zellen von deren gleichzeitiger Replikation abhängt und durch einen spezifischen Inhibitor der DNA-Polymerase, Aphidicolin, aufgehoben werden kann. Man geht davon aus, daß der *in-vivo* Wirkmechanismus eine Arretierung der Replikationsgabel an den Camptothecin-induzierten Topoisomerase-I-DNA-Addukten ist, durch die Strangbrüche entstehen und letztlich die Apoptose eingeleitet wird (Hsiang 1989).

Das intermediär entstehende DNA:Proteinaddukt kann durch SDS abgefangen werden. Erhöht man hingegen die Salzkonzentration auf 500 mM NaCl, so sind bei nachfolgender SDS-Behandlung keine Addukte nachweisbar: offenbar induziert die Erhöhung der Na-Konzentration die Religation und das Abdiffundieren des Enzyms. Die Anwesenheit von Camptothecin hemmt auch diesen Schritt erheblich.

Eine in der vorklinischen Prüfung befindliche Klasse von Topo-I-Inhibitoren ist vom Tyrphostin (N-(3-Phenylpropan)-2-cyano,-3-(3,4Dihydroxyphenyl)-propensäureamid) abgeleitet, einem Hemmer bestimmter Protein-Tyrosinkinaseaktivitäten. Die an die DNA bindende Aminosäure der Topoisomerase I ist ein Tyrosinrest. Interessanterweise ist der Mechanismus der Hemmung durch Tyrphostine eine Bindung an das Enzym und eine Inhibition von dessen Bindung an DNA (Aflalo 1994), also nicht die Stabilisierung des ternären Komplexes, sondern die Hemmung seiner Entstehung. Eine Reihe von Tyrphostinen sind kommerziell erhältlich, unter diesen das Tyrphostin 1295 (Kovalenko 1994).

Topoisomerase I wird von UV-geschädigter DNA in ähnlicher Weise gehemmt wie durch Camptothecin, d.h. es entstehen isolierbare kovalente Addukte, die nach Salzbehandlung reversibel sind (Lanza 1996). Daneben kann auch Thiophosphat-geschützte DNA als Suizidsubstrat wirken (Burgin 1995, Darby 1995). Phosphorthioate werden für antisense-Therapieansätze klinisch erprobt. Sollte nachgewiesen werden können, daß die gewöhnlich einzelsträngig eingesetzten Thiophosphat-ODN *in-vivo* Topoisomerase I hemmen, so ist, unabhängig von dem dadurch resultierenden Einfluß auf die Regulation der Torsionsspannung, mit einer Beeinflussung der Transkriptionskontrolle zu rechnen (siehe oben). Dies könnte teilweise die Nebenwirkungen dieser Substanzen erklären.

Der klassische experimentelle Inhibitor der eukaryonten Topoisomerase II ist das Etoposid. Die Substanz löst in Abhängigkeit von funktionierender Proteinproduktion innerhalb der Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) aus (Mizumoto 1994). Die Inhibitoren der prokaryonten Topoisomerase II sind pharmakologisch von sehr grosser Bedeutung; hierbei sind vor allem die Chinolone bekannt. Prototyp dieser Substanzklasse ist das Ciprofloxacin (siehe Abb 11).

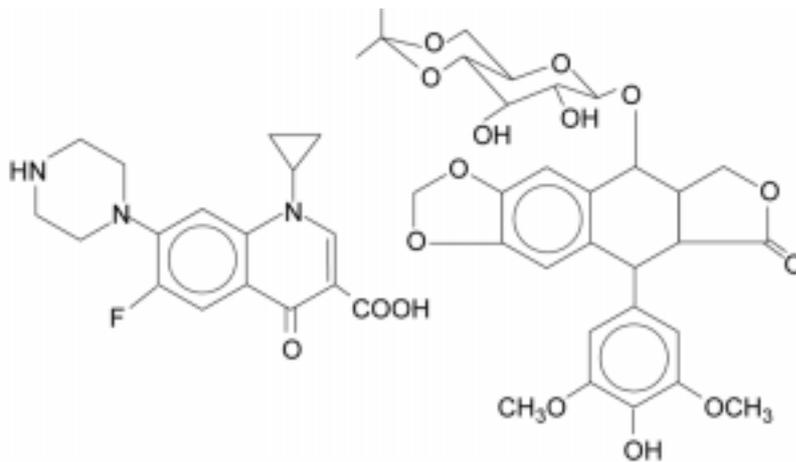


Abb. 11: Inhibitoren von Topoisomerasen der Klasse II: Ciprofloxacin (I.), ein Antibiotikum, und Etoposid, ein Zytostatikum

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in Säugetieren Topoisomerasen der Klassen I und II Superhelikalität beider Vorzeichen relaxieren kann. Die Enzyme sind in den Foci der Transkriptions- und Replikationsaktivität konzentriert und vollkommene Unterdrückung ihrer Aktivität führt zu Stillstand der Zellvermehrung oder Zelltod.

Für beide Enzymklassen findet sich in der Literatur auch immer wieder die Beschreibung einer Rolle als Unterdrücker der Rekombination und Stabilisatoren der Genomintegrität. Diese wird vor allem deshalb angenommen, weil eine Hemmung der Aktivität der Enzyme sowohl der Klasse I als auch der der Klasse II zu erheblich erhöhten Rekombinationsraten führt. Der angenommene Grund für die erhöhte Rekombinationsrate wäre danach ein höheres Niveau an Superhelikalität, was die Ausbildung von DNA-Strukturen begünstigt, die zur Rekombination benötigt werden (sog. Holliday-Junctions). Dies muß allerdings meiner Ansicht nach nicht die einzige Interpretation dieses Befundes sein. Da die Inhibitoren, wie Camptothecin oder m-AMSA, Übergangszustände des Topoisomerase-Reaktionszyklus stabilisieren, könnte es ebenfalls sein, daß diese Enzyme am Mechanismus der Rekombination beteiligt sind. Danach würde das Enzym, in Einklang mit seiner zellulären

“Umgebung”, im Verlauf der Reaktion entscheiden, ob (in der ganz überwiegenden Zahl der Fälle) eine Religation der getrennten Stränge oder aber eine Ligation an den Schwesterstrang (oder bei illegitimer Rekombination an einen anderen Strang) erfolgen solle. Eine Verlängerung der Reaktionszeit durch Stabilisierung des Übergangszustands könnte danach direkt zu einer Erhöhung der Rekombinationswahrscheinlichkeit führen. Die Feststellung, daß erhöhte Level an Superhelikalität mit erhöhten Rekombinationsraten einhergehen, widerspricht dieser These nicht, denn mit ersteren gehen auch erhöhte Level an Topoisomeraseaktivitäten einher.

Wie immer man die im vorigen Absatz geschilderte Rolle der Topoisomerase beurteilen mag, so steht außer Frage, daß Topoisomerasehemmer Rekombinationen begünstigen. Dies hat zwangsläufig die Folge, daß die Behandlung von Tumorerkrankungen mit Cytostatika letztlich die genomische Veränderung der Tumorzellen fördert, die der akuten Toxizität der Substanzen entkommen.

Es wird mittlerweile allgemein akzeptiert, daß die Prozesse der Transkription und Replikation nicht von frei diffusiblen Enzymen auf statischer DNA ablaufen, sondern daß vielmehr die Polymerasen mit den ihren jeweiligen Kofaktoren zusammen in “Fabriken”, großen Enzymkomplexen, in der nukleären Matrix organisiert sind (Cook 1999). Dabei wird die DNA im Verlauf der Polymerisationsreaktion durch den Enzymkomplex gezogen. Die Tatsache, daß Transkription wie Replikation durch Camptothecin vollkommen gehemmt werden kann, legt eine Schlüsselrolle für die Topoisomerase I bei beiden Prozessen nahe. Nach dem Twin-Domain-Modell muß bei Fixierung eines der Partner der andere rotieren, oder sich Superhelikalität in der DNA speichern. Diese mag das Entstehen von Knotenstrukturen als bevorzugte Bindungsstellen der –zweifellos auch an der Matrix befestigten- Topoisomerase I begünstigen. Da also die Topoisomerase I die DNA vor der Polymerase “sieht”, mag es evolutionär vorteilhaft gewesen sein, ein Enzym zu entwickeln, welches eine Vorkontrollfunktion auf Basenmodifikationen oder Fehlpaarungen ausübt, diese erkennt und die Polymerase zum Halten zwingt, bis der DNA-Reparaturmechanismus, rekrutiert durch die Interaktion zwischen der Topoisomerase und p53, den Schaden beseitigt hat. Wenn dieses nach einer angemessenen Zeit nicht geschah, wird Apoptose ausgelöst. Da offenbar Transkription in gewissem Maße auch nach Hemmung der Topoisomerase II stattfinden kann, diese Hemmung aber auch zum Zelltod führen kann, ist die Topoisomerase II dort wahrscheinlich eher an der Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der höheren Ordnung des Chromatins beteiligt. Eine Schlüsselrolle kommt ihr vor allem in der Segregation der Tochterstränge zu.

Es wird aus dem oben Gesagten klar, daß Superhelikalität sowohl als statischer Zustand, wie etwa in dauerhaft transkriptionsreprimiertem Chromatin, als auch dynamisch, wie in der Nachbarschaft von DNA ablesenden Polymerasen, auftreten kann. Im Zusammenhang mit der Regulation der Transkription ist diese dynamische Superhelikalität wenig untersucht, wahrscheinlich aber von großer Bedeutung für das Verständnis der Transkriptionsvorgänge.

Ähnlichkeit von Topoisomerasen aus verschiedenen Organismen

Eine Gemeinsamkeit aller Topoisomerasen ist, daß die im Reaktionsintermediat kovalent mit der DNA verbundene Aminosäure Tyrosin ist (Tse 1980, Champoux 1981). Die Typ IA und IB-Topoisomerasen weisen beide im katalytischen Zentrum fünf Aminosäuren auf, welche für die jeweilige enzymatische Funktion essentiell und zwischen beiden Klassen, bei weitgehender Unähnlichkeit in anderen Bereichen, konserviert sind (Cheng 1998). Es wird vermutet, daß die Typ-I Topoisomerasen aus Eukaronten phylogenetisch mit den Rekombinasen verwandt sind. Da der Mechanismus der Topoisomerase die Bildung eines Phosphorsäure-Tyrosinesters beinhaltet, kann auch eine – entferntere - mechanistische Verwandtschaft zu den Tyrosinkinase konstruiert werden. Die Tatsache, daß ein Inhibitor der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors auch Topoisomerase I hemmt, könnte ein Hinweis auf vorhandene strukturelle Ähnlichkeiten zwischen diesen Enzymen sein (Aflalo 1994).

Experimentelle Belege für die Annahmen des Twin-Domain-Modells

Die ersten Belege für das Twin-Domain-Modell wurden durch die Analyse von Topoisomerase-defizienten Mutanten in *E. coli* oder Hefe gewonnen. Diesen Mutanten fehlt eine oder beide der Topoisomeraseklassen, die für die Entfernung von negativer oder positiver Superhelikalität während des Transkriptionsvorganges verantwortlich sind, oder diese Enzyme können durch die Kontrolle ihrer Expression durch temperatursensitive Promotoren selektiv ausgeschaltet werden (Tsao 1989, Gartenberg 1993). Im Rahmen des Twin-Domain-Modells kommt Topoisomerasen die Aufgabe zu, entstehende superhelikale Spannung vor und hinter der Polymerase abzubauen. In Abhängigkeit von der Transkriptionshäufigkeit eines Gens sollte bei Fehlen eines der Enzyme entweder negative oder positive Superhelikalität im als Matrize dienenden Molekül akkumulieren. Eben dies wurde bei der Transkription von plasmidbasierten Genen gefunden (Giaever 1988, Wu 1988). Dabei ist in Bestätigung der ersten Annahme des Modells die Verankerung, oder topologische Fixierung, der DNA von Bedeutung. Der Effekt ist ungleich stärker, wenn zwei divergierende Promotoren mit für membranständige Proteine kodierenden Genen transkribiert wurden. Es kann auch die Polymerase als Fusionsprotein mit einem in *cis* bindenden Proteinanteil selber die topologische Fixierung "mitbringen" (Ostrander 1990,

Cook 1992). Dröge und Nordheim (1991) konnten das Phänomen auch für nicht verankerte Polymerase aus T7 in einem Plasmid demonstrieren. Wahrscheinlich ist hier die Länge des im Umlauf transkribierten RNA-Moleküls, welche über 10 kb erreichen kann, von Bedeutung.

Eine elegante Demonstration dafür, daß RNA-Polymerase transiente Superhelikalität hinterläßt, lieferten Dunaway und Ostrander (Dunaway 1993) mit Mikroinjektionsversuchen in *Xenopus*: sie wählte ein Promotor/Reportergenkonstrukt, welches nur dann aktiv ist, wenn der Promotor negativ superhelikal vorliegt. Als lineare DNA in *Xenopus*-Oocyten injiziert, wurde das Konstrukt nicht abgelesen. Wenn ein gegenläufiger Promotor für T7-RNA-Polymerase auf dem selben Konstrukt vorlag, und die normalerweise in *Xenopus* nicht vorkommende Polymerase des Bakteriophagen T7 als Protein mit injiziert wurde, kam es zur Transkription des Reportergens. Die im "Fahrwasser" der T7-Polymerase hinterlassene, transiente Superhelikalität reichte also aus, den Promotor anzuschalten.

Es gelang Wöfl et al. (Wöfl 1995) der Nachweis, daß auch in einem der *in-vivo*-Situation sehr nahekommenden Modell, das sich permeabilisierter, stoffwechselaktiver Zellkerne bediente, Z-DNA spezifisch in transkribierten Genen nachweisbar ist.

Die Z-DNA-affine Domäne des RNA-Edierungsenzyms ds-RAD

Es sind mehrere Enzyme gefunden worden, die posttranslational den Sequenzinhalt der kodierenden Bereiche von mRNA modifizieren, und zwar durch Desaminierung von Adenosin zu Inosin, welches von der Translationsmaschinerie als Guanosinäquivalent interpretiert wird. Allen bekannten Mitgliedern dieser Enzymgruppe ist gemeinsam, daß sie doppelsträngige RNA-Abschnitte als Substrat benötigen. Diese gezielte Veränderung des Inhalts der im Genom gespeicherten Information auf Transkriptionsebene erhöht die Komplexität des Informationsgehaltes und ermöglicht die Variation von Proteinstrukturen, für die nur ein Gen zur Verfügung steht. Möglicherweise hat die Aktivität allerdings auch ihre evolutionäre Herkunft in einem Verteidigungsmechanismus gegen RNA-Viren, deren Genom während des Replikationszyklus intrazellulär zumindest kurzfristig als doppelsträngiges RNA-Molekül vorliegt. Das zuerst entdeckte dieser Enzyme wird als ds-RAD1 bezeichnet und hat eine Domäne, die *in-vitro* auch Z-DNA bindet ($Z\alpha$). Es ist nicht klar, ob diese Aktivität auch physiologisch von Bedeutung ist. Eine Röntgenkristallstruktur des $Z\alpha$: Z-DNA Komplexes ist veröffentlicht worden (Schwartz 1999). Im Zusammenhang mit dem Twin-Domain-Modell ist es naheliegend anzunehmen, daß eine funktionelle Verbindung zwischen der Z-induzierenden Transkription und der Edierung besteht.

Es sind Ansätze bekannt, durch iterativ-selektive Methoden ("Selex") Partner in Rezeptor-Ligandenpaaren zu charakterisieren, indem aus einer großen Population potentieller Partner

eine Unterpopulation selektiert wird und diese wiederum einer Selektionsrunde ausgesetzt wird usf. Dieser Ansatz wurde benutzt um solche Sequenzen zu identifizieren, die in Z-Form besonders gut an die Z-bindende Domäne von ds-RAD binden (Alfken 1999). Dabei wurden DNA-Ringe, die eine kurze randomisierte Sequenz enthalten, unter stringenten Bedingungen an die matrixfixierte Z-DNA-bindende Domäne von dsRAD1 gebunden. Gebundene Spezies wurden abgelöst, amplifiziert und weiteren Bindungsrunden ausgesetzt. Solange solche Ansätze allerdings davon ausgehen, Plasmid zu binden, welches Z-bildende Sequenzen enthält, leiden sie unter einem schwer eliminierbaren konzeptionellen Problem: Neben der gewollten Selektion diskreter Z-Form-bindender Sequenzen aus einer Z-DNA-Population wählt ein zweiter Selektionsmechanismus aus der Population aller Sequenzen die aus, die überhaupt Z bilden. Die Neigung (die thermodynamische Energiebarriere) verschiedener DNA-Sequenzen, von B nach Z überzugehen, ist sehr unterschiedlich. Soweit der Unterschied der Übergangswahrscheinlichkeit von B- zur Z-Form innerhalb des Beobachtungssystems (d.h. bei der gewählten Torsionsspannung und Salzkonzentration) größer ist als der Unterschied der Bindung dieser Sequenzen in Z-DNA-Form an das Z- α -Protein, kann das System nicht effektiv zwischen beiden diskriminieren. Man wird also nur das Optimum einer gemeinsamen Selektion nach zwei Kriterien erhalten: dem Kriterium der Bindung an bestimmte Sequenzmotive in Z-Form, und dem Kriterium der Bildung von Z-DNA durch diese Sequenz. Es gibt zwei Extremwerte dieser Betrachtung: es kann die Bindung des Proteins vollkommen unabhängig von der Sequenz sein, so daß nur die Bildung der Z-Form eine Rolle für die Bindung der DNA spielt, oder es kann die DNA unter solche Spannung gesetzt werden, daß die in ihr enthaltene Konformationsenergie für jede Sequenz den Übergang nach Z herbeiführt. Der erstere Fall ermöglicht eine "vorurteilsfreie" Suche nach idealen Sequenzmotiven für den B-Z-Übergang, der letztere ermöglichte theoretisch die Suche nach Sequenzpräferenzen innerhalb der Z-Konformation. Es sollte im Rahmen des hier vorgestellten Systems auch untersucht werden, ob eine durch Torsionsspannung induzierte Bindung an DNA beobachtet werden kann, und ob damit Sequenzpräferenzen feststellbar sind.