



bio
biologie

James D. Watson

Baker • Bell • Gann • Levine • Losick

Watson Molekularbiologie

6., aktualisierte Auflage

Benjamin Cummings

PEARSON
Studium

bio
biologie



James D. Watson

Baker • Bell • Gann • Levine • Losick

Watson Molekularbiologie

6., aktualisierte Auflage

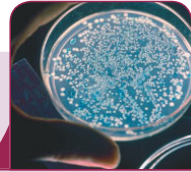
Aus dem Amerikanischen von Carsten Biele et al.

Deutsche Bearbeitung von Mario Mörl und Stefan Vörtler

Mit über 640 Abbildungen

PEARSON
Studium

ein Imprint von Pearson Education
München • Boston • San Francisco • Harlow, England
Don Mills, Ontario • Sydney • Mexico City
Madrid • Amsterdam

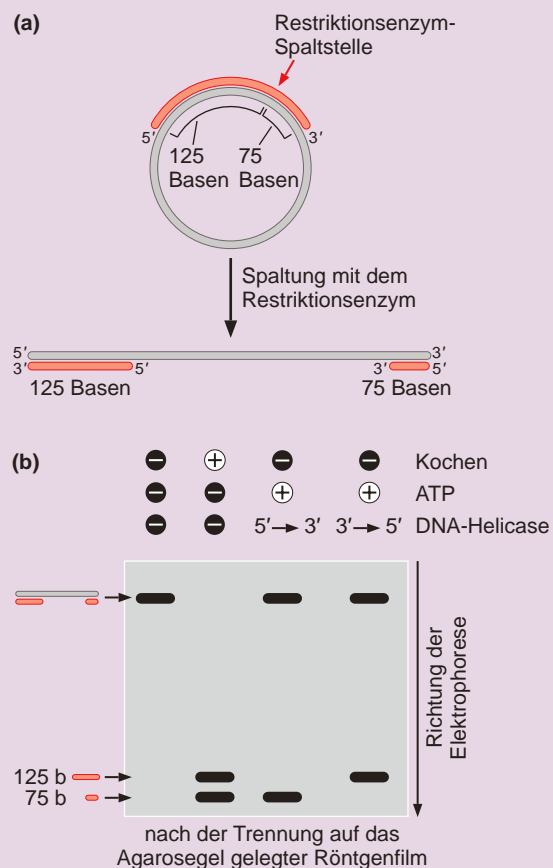


die Helicase von der langen ringförmigen DNA getrennt worden ist, wandert die wesentlich kürzere ssDNA entsprechend ihrer Länge (200 Basen) erheblich schneller durch das Gel.

Eine modifizierte Version dieses einfachen Experiments kann zur Bestimmung der Polarität einer DNA-Helicase genutzt werden. Angenommen, in der basengepaarten Region befindet sich die spezifische Spaltstelle für ein Restriktionsenzym, welche die kurze ssDNA in zwei unterschiedlich lange Abschnitte unterteilt (► Abbildung 2). Wenn der DNA-Doppelstrang an dieser Stelle geschnitten wird, entsteht ein lineares, überwiegend einzelsträngiges DNA-Molekül mit zwei unterschiedlich langen doppelsträngigen Endabschnitten. Bedenken Sie, dass DNA-Helicase mit ssDNA assoziiert, aber nicht mit dsDNA. Somit kann eine DNA-Helicase nur zwischen den beiden dsDNA-Endabschnitten an das beschriebene lineare DNA-Substrat binden. Infolge der jeweils für eine bestimmte DNA-Helicase charakteristischen Polarität

kann jede Helicase immer nur einen der beiden kurzen ssDNA-Abschnitte vom langen ssDNA-Strang ablösen. Weil die beiden kurzen ssDNA-Abschnitte unterschiedliche Längen aufweisen, offenbart die Größe des freigesetzten ssDNA-Fragments, in welche Richtung die DNA-Helicase auf dem langen ssDNA-Abschnitt des linearen Substrats entlanggewandert ist.

Abbildung 2: Ein biochemischer Test zur Bestimmung der Polarität einer DNA-Helicase. (a) Das gleiche DNA-Substrat wie in Abbildung 1 wird mit einem Restriktionsenzym im doppelsträngigen Bereich gespalten, so dass ein lineares DNA-Produkt mit zwei doppelsträngigen Enden entsteht. Dabei wird das Restriktionsenzym so ausgewählt, dass der kurze radioaktiv markierte DNA-Strang asymmetrisch in zwei unterschiedlich lange Abschnitte geteilt wird. In diesem Fall bleiben im linearen DNA-Produkt an einem Ende ein 125 Basen und am anderen Ende ein 75 Basen langes, radioaktiv markiertes ssDNA-Fragment zurück, beide sind mit dem 5000 Basen langen, unmarkierten ssDNA-Strang hybridisiert. Die 5'- und die 3'-Enden der verschiedenen beteiligten DNA-Stränge sind in der Abbildung jeweils gekennzeichnet. (b) Schematische Darstellung eines Röntgenfilms, der einem Agarose-Gel ausgesetzt wurde, in dem zuvor die Produkte der Behandlung des linearen DNA-Produkts aus (a) mit verschiedenen DNA-Helicasen elektrophoretisch getrennt wurden. Aus der Länge der freigesetzten, radioaktiv markierten kurzen ssDNA kann auf die Polarität der jeweiligen Helicase geschlossen werden. Hier sind die Ergebnisse für eine 5'→3'-DNA-Helicase und eine 3'→5'-DNA-Helicase dargestellt. Das Kochen des Substrats liefert zum Vergleich das Ergebnis im Fall der vollständigen Denaturierung aller basengepaarten dsDNA-Abschnitte.



8.3.5 DNA-Helicase zieht einzelsträngige DNA durch eine zentrale Pore

Wie nutzt eine hexamere DNA-Helicase die Energie aus der Hydrolyse von ATP, um auf der DNA entlangzuwandern? Die Aufklärung der Struktur einer viralen

hexameren Helicase, die an ein einzelsträngiges DNA-Substrat gebunden ist, hat einen großen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage geleistet. In dieser Struktur liegt die ssDNA von den sechs Untereinheiten der Helicase ringförmig umschlossen vor (► Abbildung 8.14). Jede Untereinheit der Helicase weist einen engen Loop auf, der an eine Phosphatgruppe und die beiden

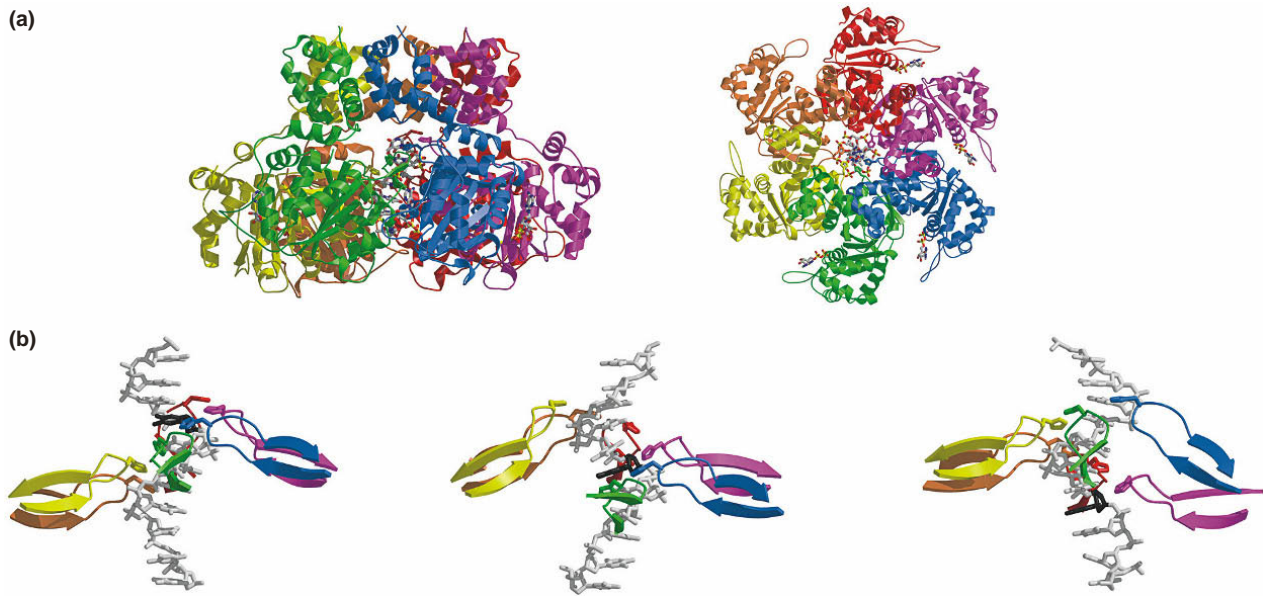


Abbildung 8.14: Struktur und vorgeschlagener Mechanismus einer DNA-Helicase. (a) Modell der Gesamtstruktur der hexameren DNA-Helicase E1 aus dem Rinder-Papillomvirus mit gebundenem ssDNA-Substrat. Jede Untereinheit ist durch eine andere Farbe hervorgehoben und der Komplex einmal von der Seite (links) und einmal in Blickrichtung des zentralen Kanals des Hexamers (rechts) abgebildet. Die Protein-Untereinheiten sind als Bändermodell und die ssDNA als Stabmodell dargestellt. (b) Veranschaulichung der vorgeschlagenen Bewegungen der DNA-bindenden Loops. In diesen Ansichten sind jeweils nur die ssDNA im zentralen Kanal der Helicase sowie die entscheidenden Loops der Helicase gezeigt, die an diese ssDNA binden. Die drei Darstellungen zeigen, wie der Loop, der mit der Phosphatgruppe des schwarz gezeichneten Nucleotids wechselwirkt, von einer oberen Position in eine mittlere Position schwenkt, wobei er in beiden Stellungen an das Nucleotid gebunden ist. Ganz rechts ist das schwarz gekennzeichnete Nucleotid durch die Bewegung des blauen Loops schließlich im Bild von oben nach unten befördert worden, während sich der blaue Loop von diesem Nucleotid gelöst hat und in seine Ausgangslage zurückgekehrt ist. Diese Rückkehr in die Ausgangslage wird vermutlich durch die erneute Bindung von ATP an die blaue Untereinheit angetrieben, nachdem die Produkte der ATP-Hydrolyse in der unteren Position freigesetzt wurden. Außerdem ermöglicht sie die Bindung des Loops an eine neue Phosphatgruppe, so dass der Bewegungszyklus des Loops erneut beginnen kann. Beachten Sie, dass die anderen fünf, in anderen Farben dargestellten Loops die gleiche Bewegung mit den gleichen Zwischenzuständen vollziehen und dabei den ssDNA-Strang durch den zentralen Kanal der Helicase befördern. Allerdings finden die Bewegungen der sechs Loops zeitlich leicht versetzt, aber koordiniert statt, wobei die verschiedenen Loops an verschiedene Phosphatgruppen binden.

benachbarten Riboseeinheiten im DNA-Rückgrat bindet. Interessanterweise sind die Loops der verschiedenen Untereinheiten in Form einer rechtsgängigen Spirale angeordnet, wobei aufeinanderfolgende Loops jeweils im ssDNA-Rückgrat benachbarte Phosphatgruppen binden. Wie in Abbildung 8.14 dargestellt, ist der Loop am oberen Ende der Spirale mit dem 5'-Ende und der am unteren Ende mit dem 3'-Ende des Helicase-gebundenen ssDNA-Abschnitts assoziiert.

Eine einzelne Struktur stellt immer nur einen Schnappschuss dar, der nur die Konformation der Helicase zu einem bestimmten Zeitpunkt zeigt. Allerdings befinden sich die sechs verschiedenen Untereinheiten alle in einer anderen Phase der Bewegung der Loops im DNA-Translokationsprozess. Zusammen offenbaren die Wechselwirkungen der verschiedenen Untereinheiten mit der DNA und mit ATP/ADP zu einem festen Zeitpunkt deswegen trotzdem, wie

die ssDNA mithilfe der koordinierten Bewegung der Helicase-Loops durch die zentrale Pore der Helicase gezogen werden kann. Der Loop einer Untereinheit bindet zunächst an das obere Ende der Struktur der ssDNA (Abbildung 8.14b) und schwenkt anschließend über mehrere Konformationen sukzessive nach unten. Dabei wird der gebundene ssDNA-Strang mitgezogen. Jede dieser Konformationen ist mit einem anderen Zustand des an die Untereinheit gebundenen ATP/ADP assoziiert. Befindet sich der Loop in der oberen Position, liegt ein ATP-Molekül an die Untereinheit gebunden vor. In der mittleren Position ist das ATP zu gebundenem ADP hydrolysiert worden und in der unteren Position wurde das ADP freigesetzt und die ATP/ADP-Bindungsstelle ist leer. Mit anderen Worten: Während der Loop einer einzelnen Untereinheit von oben nach unten schwenkt, wird ATP an die Untereinheit gebunden, hydrolysiert und das entstehende

ADP und Phosphat freigesetzt, bevor erneut ein ATP-Molekül gebunden wird und der Loop in die obere Position zurückkehrt. Die Bewegung des Loops aus der oberen in die untere Position wird dabei durch die ATP-Hydrolyse angetrieben. Betrachtet man alle Loops der Helicase, kann man sich die Loops als Hände vorstellen, die ein Seil (die ssDNA) durch die Pore ziehen und dabei immer wieder einander vorgreifen.

Zusätzlich zur gerichteten Wanderung entlang der ssDNA muss die Helicase außerdem den komplementären Strang der jeweils vor ihr liegenden dsDNA von ihrem ssDNA-Substrat ablösen, um eine Entwindung der DNA-Doppelhelix zu verursachen und weiter voranschreiten zu können. Im Fall der hier vorgestellten hexameren DNA-Helicase zeigt die Struktur des zentralen Kanals, dass die Ablösung des komplementären Strangs unbedingt erforderlich ist, wenn die DNA durch die Pore der Helicase befördert werden soll. An seiner engsten Stelle weist der Kanal nämlich nur einen Durchmesser von 13 Å auf. Damit ist der Kanal für die Durchschleusung einer ssDNA groß genug, für das Durchführen einer dsDNA mit ihrem Durchmesser von 20 Å aber zu klein.

8.3.6 Einzelstrangbindeproteine stabilisieren ssDNA direkt vor der Replikation

Hinter der DNA-Helicase muss verhindert werden, dass die neu erzeugten ssDNA-Stränge wieder Basenpaarungen bilden, bis sie als Matrize für die DNA-Synthese gedient haben. Um die ssDNA-Stränge zu stabilisieren und von erneuten Basenpaarungen abzuhalten,

binden deswegen schnell nach ihrer Trennung ssDNA-bindende Proteine, die so genannten **Einzelstrangbindeproteine (SSBs)**, engl. *single-strand binding proteins*, an die einzelnen DNA-Stränge. Dabei erleichtern und fördern bereits gebundene SSBs die Bindung weiterer SSBs in unmittelbarer Nachbarschaft (► Abbildung 8.15). Diese Art der Assoziation, bei der die Bindung weiterer Moleküle durch bereits gebundene Moleküle gefördert wird, nennt man **kooperative Bindung**. Im Fall der Einzelstrangbindeproteine beruht die Kooperativität ihrer Bindung an ssDNA darauf, dass SSBs, die an unmittelbar benachbarte Abschnitte der ssDNA binden, auch untereinander assoziieren. Durch die SSB/SSB-Wechselwirkung wird die Bindung der SSBs an die ssDNA erheblich stabilisiert. Infolgedessen stellen Positionen der ssDNA, die unmittelbar neben bereits einem oder mehreren gebundenen SSBs liegen, bevorzugte Bindungsstellen für weitere SSBs dar.

Durch die Kooperativität der Bindung der SSBs an die ssDNA wird eine schnelle Umhüllung der ssDNA sichergestellt, nachdem sie aus der DNA-Helicase ausgetreten ist. (Viele DNA-bindende Proteine zeigen die Eigenschaft der kooperativen Bindung; siehe ► Box 16.4.) Durch die Besetzung mit den SSBs wird die ssDNA in einer gestreckten Konformation gehalten, die ihre Verwendung als Matrize für die Synthese eines DNA- oder RNA-Primers erleichtert.

Die Wechselwirkung der SSBs mit der ssDNA erfolgt sequenzunspezifisch. Die Kontakte zwischen den SSBs und der ssDNA bestehen hauptsächlich in elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und Stapelwechselwirkungen mit

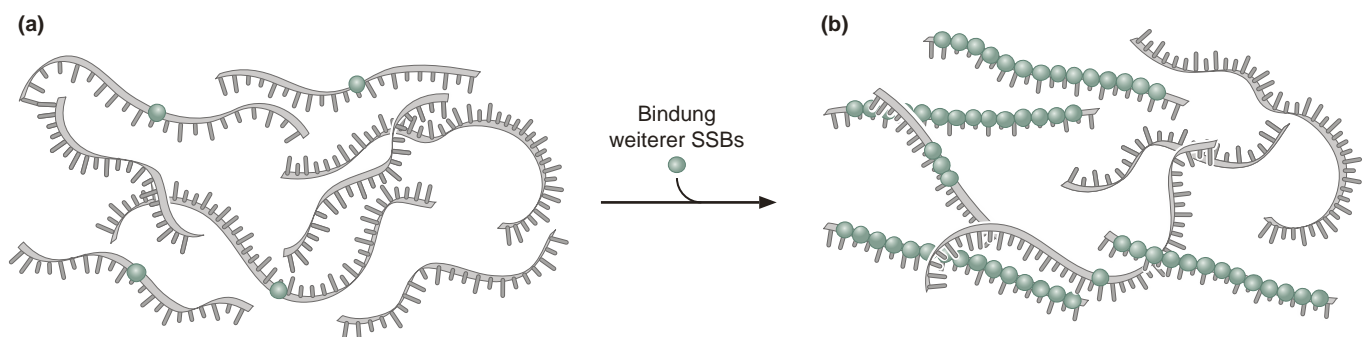


Abbildung 8.15: Bindung von Einzelstrangbindeproteinen (SSBs) an ssDNA. (a) Eine begrenzte Menge von SSBs liegt an vier der neun dargestellten ssDNAs gebunden vor. (b) Werden weitere SSBs hinzugefügt, binden diese bevorzugt in unmittelbarer Nachbarschaft der bereits zuvor an die vier ssDNAs gebundenen SSBs. Erst wenn die zu Beginn bereits mit einem SSB besetzten ssDNAs vollständig mit SSBs belegt sind, erfolgt auch die Bindung von SSBs an die anderen ssDNAs. Beachten Sie, dass die ssDNAs infolge der Bindung der SSBs eine gestrecktere Konformation einnehmen, welche die Bildung intramolekularer Basenpaare zusätzlich erschwert.

den DNA-Basen. Im Gegensatz zu sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteinen bilden SSBs, wenn überhaupt, nur wenige Wasserstoffbrücken zu den Basen der ssDNA.

8.3.7 Topoisomerasen entfernen Supercoilings, die durch die Entwindung an der Replikationsgabel entstehen

Die Entwindung und Trennung der Stränge der DNA-Doppelhelix durch die DNA-Helicase an der Replikationsgabel führt zu einem zunehmend positiven Supercoiling in der dsDNA vor der Replikationsgabel (► Abbildung 8.16). Die Anhäufung von superhelikalen Windungen ist eine Folge der Auftrennung von Basenpaaren zwischen den beiden Strängen und

der darauffolgenden Entwindung der Stränge durch die DNA-Helicase. Solange kein Strangbruch in den Strängen erzeugt wird, kann die Verwindungszahl Lk der DNA (die Summe aus helikaler und superhelikaler Windungszahl: $Lk = Tw + Wr$) nicht verringert werden, um die Entwindung der Doppelhelix an der Replikationsgabel auszugleichen (siehe Abschnitt 6.2). Mit dem Voranschreiten der DNA-Helicase muss somit eine gleichbleibende Verwindungszahl in einer immer kürzeren dsDNA, die vor der Helicase liegt, erhalten werden. Tatsächlich muss nach jedem etwa zehn Basenpaare langen dsDNA-Abschnitt, der durch die Helicase entwunden worden ist, eine Windung aus der DNA entfernt werden, um die dsDNA vor der Helicase in einem entspannten Zustand zu halten. Gäbe es keinen Mechanismus, um die Anhäufung superhelikaler Windungen abzubauen, würde die Replikationsma-

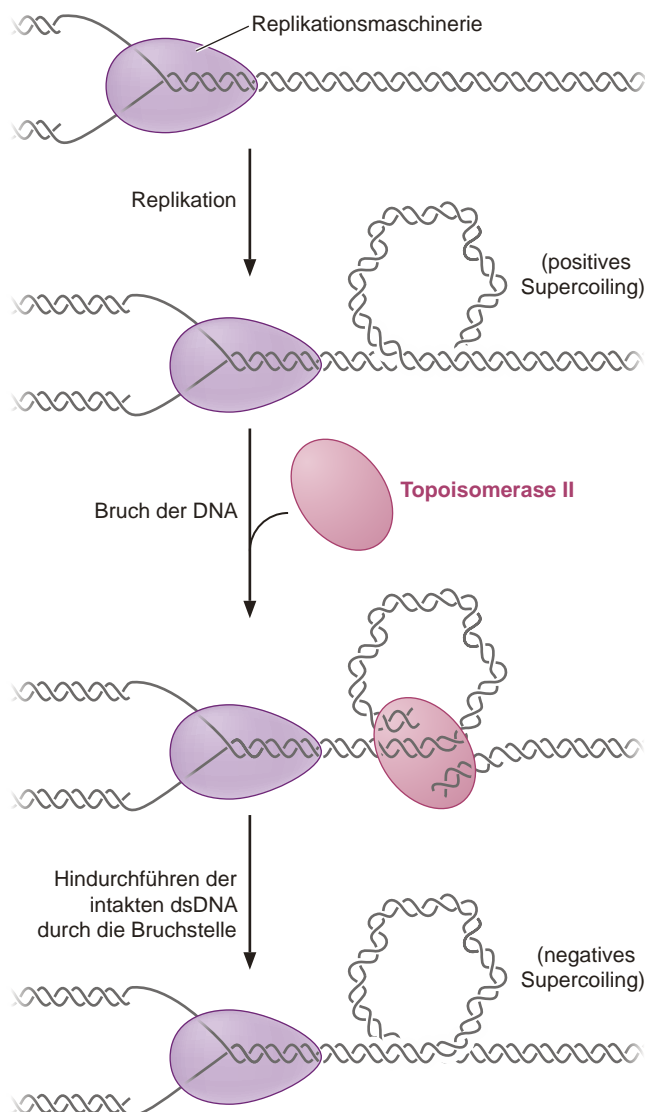


Abbildung 8.16: Die Aktivität von Topoisomerasen an der Replikationsgabel. Sobald vor der Replikationsgabel positive superhelikale Windungen akkumulieren, werden diese durch die Aktivität von Topoisomerasen schnell wieder entfernt. Die Abbildung zeigt die Entfernung des positiven Supercoilings aus der dsDNA vor einer Replikationsgabel durch die Aktivität einer Typ-II-Topoisomerase. Positive superhelikale Windungen können eliminiert werden, indem ein Abschnitt der noch nicht replizierten dsDNA durch einen nahegelegenen Doppelstrangbruch in derselben unreplizierten dsDNA geführt wird. Es ist erwähnenswert, dass die Verwindungszahl durch diesen Vorgang um 2 und nicht nur um 1 verringert wird und somit nur nach jeweils 20 replizierten Basenpaaren stattfinden muss. Hier wird zwar die Wirkung einer Typ-II-Topoisomerase veranschaulicht, aber auch eine Typ-I-Topoisomerase kann das positive Supercoiling vor einer Replikationsgabel entfernen. Beachten Sie, dass die positive Superhelizität vor der Replikationsgabel als rechtsgängige toroidale Windung dargestellt ist – dabei entspricht eine vollständige Umdrehung einer positiven superhelikalen Windungszahl von +1. Die Passage eines dsDNA-Strangabschnitts auf die andere Seite der Windung liefert eine ganze linksgängige toroidale Windung – in diesem Fall entspricht eine vollständige Umdrehung einer negativen superhelikalen Windungszahl von -1. Diese Betrachtung macht deutlich, wie die Verwindungszahl durch *einen* Reaktionszyklus einer Typ-II-Topoisomerase um 2 verringert werden kann. Ausführlichere Informationen zur Topologie und Superhelizität der DNA finden Sie in Abschnitt 6.2 sowie in Box 7.2.

Enzym- / Proteintyp	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mensch
Primase	DnaG	Primase (PRI I / PRI 2)	Primase
DNA-Helicase	DnaB	MCM-Komplex	MCM-Komplex
SSB	SSB	RPA	RPA
Topoisomerasen	Gyrase, Topo I	Topo I, II	Topo I, II

Tabelle 8.1: Enzyme (Proteine) aus verschiedenen Organismen, die ihre Aktivität an Replikationsgabeln entfalten.

schinerie relativ schnell zum Stillstand kommen, weil sie die enorme Spannung in der dsDNA vor der Replikationsgabel nicht mehr überwinden könnte.

Dieses Problem ist im Fall ringförmiger Chromosomen von Bakterien offensichtlich, aber es tritt ebenso bei den langen linearen Chromosomen der Eukaryonten auf. Da eukaryotische Chromosomen keine kovalent geschlossenen Ringe sind, könnten sie sich prinzipiell um ihre Längsachse in sich verdrehen und so durch eine DNA-Helicase erzeugte Supercoils abbauen. Das geschieht allerdings nicht: Es ist einfach nicht möglich, ein lineares DNA-Molekül, das eine Länge von Millionen von Basenpaaren aufweist, nach jeder Entwindung einer Windung der Doppelhelix entsprechend ausgleichend zu verdrillen.

Die Supercoils, die infolge der Aktivität der DNA-Helicasen auftreten, werden durch Topoisomerasen entfernt, die auf die unreplizierte DNA vor der Replikationsgabel einwirken (siehe Abbildung 8.16). Topoisomerasen erreichen dieses Ziel, indem sie in einem oder beiden Strängen der dsDNA einen Strangbruch erzeugen, einen intakten Strangabschnitt durch die Bruchstelle hindurchführen und die Bruchstelle schließlich wieder versiegeln, wobei sie während des gesamten Prozesses mit ihrem DNA-Substrat assoziiert bleiben (siehe Abschnitte 6.2.9 und 6.2.10). Durch diesen von Topoisomerasen katalysierten Prozess werden superhelikale Windungen aus DNA-Molekülen entfernt. Auf diese Weise bewirken Topoisomerasen die schnelle Entspannung von vor einer Replikationsgabel angehäuften Supercoils.

8.3.8 Enzyme an der Replikationsgabel erweitern die Bandbreite von Substraten für DNA-Polymerasen

Allein kann eine DNA-Polymerase nur Primer, die mit einer ssDNA-Matrize hybridisiert vorliegen, ausgehend von deren 3'-OH-Ende verlängern. Das Hinzufü-

gen von Primase, DNA-Helicase, DNA-Topoisomerase und RNase H führt zu einer dramatischen Erweiterung der Bandbreite möglicher Substrate für die Replikationsmaschinerie. Primase steuert die Fähigkeit bei, mit der Synthese eines ganz neuen DNA-Strangs an einer beliebigen ssDNA-Matrize zu beginnen, ohne einen Primer zu benötigen. Natürlich ist die Nutzung der Primase auch mit der Notwendigkeit verbunden, zur Vollendung der Replikation die RNA-Primer mithilfe von RNase H wieder zu entfernen und durch DNA zu ersetzen. Ähnlich sind die Entwindung der Doppelhelix und die Trennung der Stränge durch DNA-Helicasen sowie der Abbau des positiven Supercoilings durch Topoisomerasen erforderlich, um dsDNA replizieren zu können. Auch wenn sich die exakten Namen der einzelnen Proteine von Organismus zu Organismus unterscheiden (► Tabelle 8.1), werden selbst in so verschiedenen Organismen wie Bakterien, Hefen und Menschen im Prinzip die gleichen enzymatischen Aktivitäten für die Replikation der chromosomalen DNA verwendet.

Bemerkenswerterweise erfüllen DNA-Helicasen und Topoisomerasen ihre Funktion, ohne die chemische Struktur (genauer: die Konfiguration, also das kovalente Bindungsmuster) der DNA dauerhaft zu verändern oder irgendein neues Molekül zu synthetisieren. Die Aktivität der DNA-Helicase führt nur zum Lösen von Wasserstoffbrücken, welche die beiden Stränge zusammenhalten, ohne eine kovalente Bindung aufzubrechen. Topoisomerasen spalten zwar eine oder mehrere kovalente Bindungen, aber alle kovalenten Bindungen werden exakt wiederhergestellt, bevor die jeweilige Topoisomerase von ihrem DNA-Substrat dissoziiert (siehe Abbildung 6.25). Statt die chemische Struktur beziehungsweise Konfiguration der DNA zu verändern, verursachen die Aktivitäten dieser Enzyme Konformationsänderungen in DNA-Molekülen. Allerdings sind diese Konformationsänderungen für die Duplikation der großen dsDNA-Moleküle, welche die