

**bio**  
biologie



**James D. Watson**

Baker • Bell • Gann • Levine • Losick

# Watson Molekularbiologie

6., aktualisierte Auflage

Benjamin Cummings

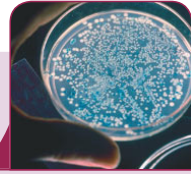
PEARSON  
Studium

Unser Online-Tipp  
für noch mehr Wissen ...

**informit.de**

Aktuelles Fachwissen rund um die Uhr  
– zum Probelesen, Downloaden oder  
auch auf Papier.

[www.informit.de](http://www.informit.de) 

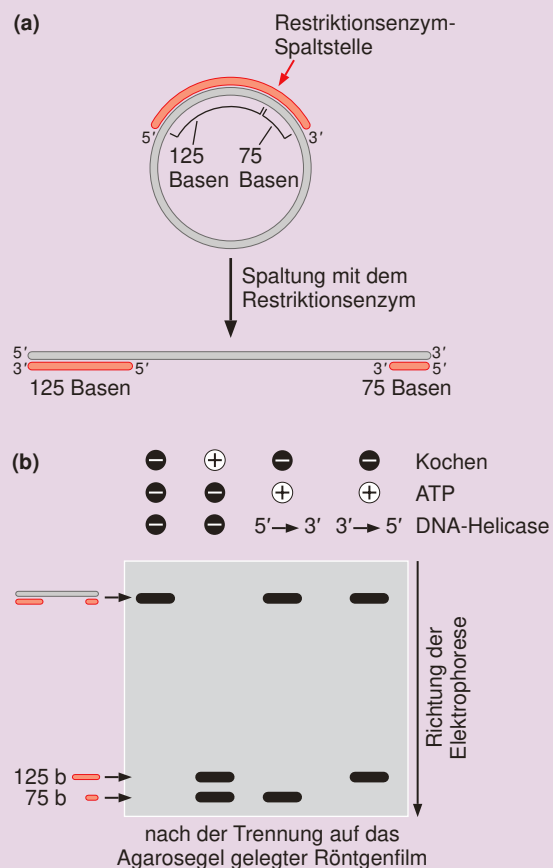


die Helicase von der langen ringförmigen DNA getrennt worden ist, wandert die wesentlich kürzere ssDNA entsprechend ihrer Länge (200 Basen) erheblich schneller durch das Gel.

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.

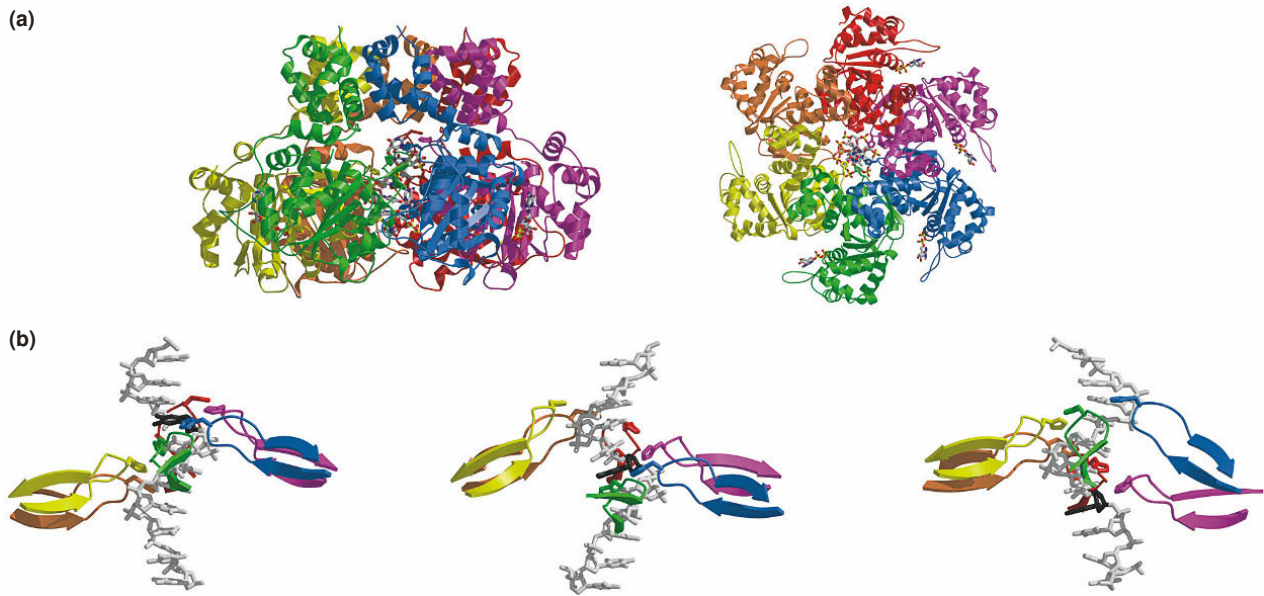
**Abbildung 2: Ein biochemischer Test zur Bestimmung der Polarität einer DNA-Helicase.** (a) Das gleiche DNA-Substrat wie in Abbildung 1 wird mit einem Restriktionsenzym im doppelsträngigen Bereich gespalten, so dass ein lineares DNA-Produkt mit zwei doppelsträngigen Enden entsteht. Dabei wird das Restriktionsenzym 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.

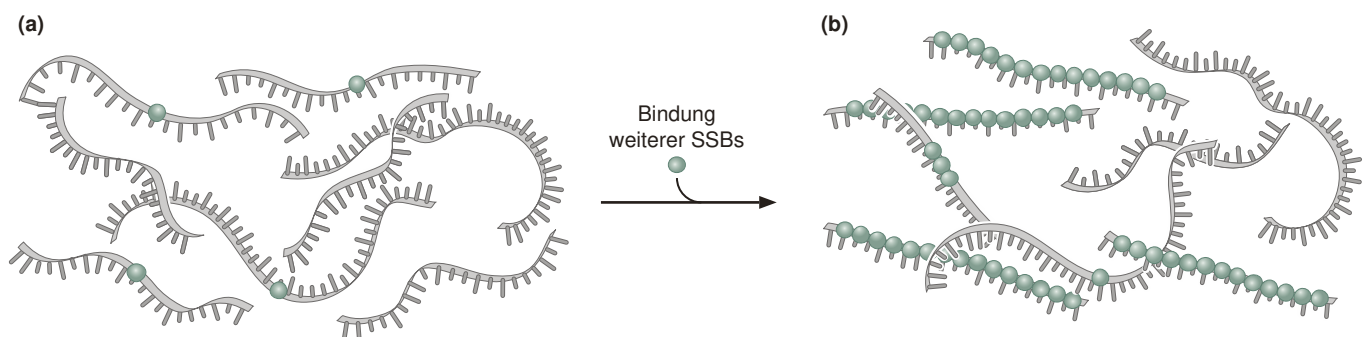
### 8.3.6 Einzelstrangbindeproteine stabilisieren ssDNA direkt vor der Replikation

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.

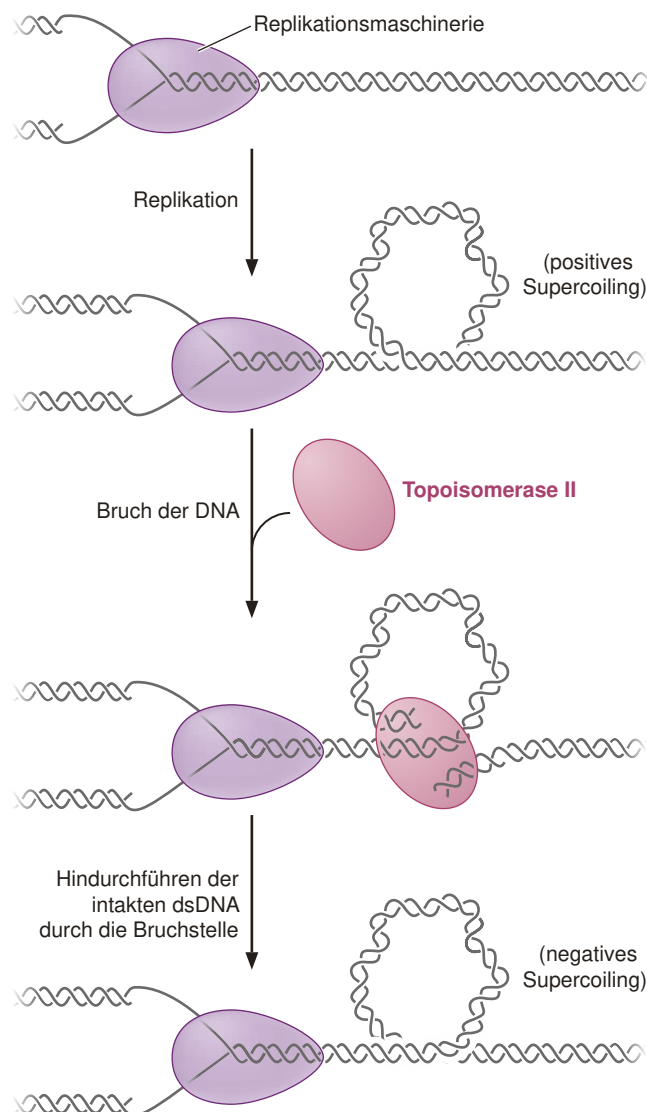


den DNA-Basen. Im Gegensatz zu sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteinen bilden SSBs, wenn überhaupt, nur wenige Wasserstoffbrücken zu den Basen der ssDNA.

### 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 verdrehen.

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

Basis sowohl von prokaryotischen als auch von eukaryotischen Chromosomen bilden, von essenzieller Bedeutung.

Die Proteine, die ihre Wirkung an der Replikationsgabel entfalten, treten in enge, aber sequenzunspezifische Wechselwirkungen mit der DNA. Dabei nutzen sie Merkmale der DNA, die *nicht* von bestimmten Basenpaaren beziehungsweise Sequenzen abhängen, wie zum Beispiel die negativen Ladungen und die Struktur des Zucker-Phosphat-Rückgrats (beispielsweise die Daumendomäne der DNA-Polymerase), die Wasserstoffbrücken bildenden Reste in der kleinen Furche (zum Beispiel die Handflächendomäne der DNA-Polymerase) sowie die hydrophoben Stapelwechselwirkungen zwischen den Basen (zum Beispiel die SSBs). Außerdem sind die Strukturen einiger dieser Proteine darauf spezialisiert, hochgradig prozessiv zu arbeiten, indem sie ihr DNA-Substrat entweder vollständig, wie DNA-Helicasen, oder zumindest teilweise, wie DNA-Polymerasen, ringförmig umschließen.

## Die Spezialisierung von DNA-Polymerasen

## 8.4

### 8.4.1 DNA-Polymerasen sind auf verschiedene Rollen in der Zelle spezialisiert

Wegen der zentralen Rolle von DNA-Polymerasen für die effiziente und genaue Replikation des Genoms mussten die Zellen eine ganze Reihe spezialisierter DNA-Polymerasen entwickeln. *E. coli* besitzt zum Beispiel mindestens fünf DNA-Polymerasen, die sich in ihren enzymatischen Eigenschaften, in der Anzahl und Art ihrer Untereinheiten und in ihrer Häufigkeit unterscheiden (► Tabelle 8.2). DNA-Polymerase III (DNA-Pol III oder kurz Pol III) ist das wichtigste an der Replikation des Chromosoms von *E. coli* beteiligte Enzym. Weil das gesamte 4,6 Mb lange Genom von *E. coli* durch nur zwei Replikationsgabeln repliziert wird, muss die DNA-Pol III hochgradig prozessiv arbeiten. Diese hohe Prozessivität wird im Allgemeinen durch die Assoziation des Enzyms mit anderen Proteinen zu einem größeren Proteinkomplex erreicht, welcher der DNA-Pol III ihre sehr hohe Prozessivität verleiht. Dieser große Proteinkomplex wird als **DNA-Polymerase-III-Holoenzym** bezeichnet.

**DNA-Polmerase I (DNA-Pol I)** ist dagegen auf den Ersatz der RNA-Primer, die für die Initiation der DNA-Synthese genutzt wurden, durch DNA spezialisiert. Aus diesem Grund enthält die DNA-Pol I eine 5'-Exonuclease, durch deren Aktivität sie die RNA oder DNA abbauen kann, die jeweils unmittelbar *stromaufwärts* der Stelle ihrer DNA-Synthese liegt. Anders als das DNA-Polymerase-III-Holoenzym weist die DNA-Pol I keine besonders hohe Prozessivität auf. Sie fügt jedesmal, wenn sie an ein DNA-Substrat bindet, nur etwa 20 bis 100 Nucleotide hinzu. Diese Eigenschaften sind ideal auf die Entfernung der RNA-Primer und die Auffüllung der dabei entstehenden ssDNA-Lücken abgestimmt. Die 5'-Exonucleaseaktivität der DNA-Pol I kann auch die Verknüpfung zwischen einem Ribonucleotid und einem Desoxyribonucleotid spalten, die gegen RNase H resistent ist (siehe Abbildung 8.12). Die kurze Länge der DNA-Abschnitte, welche die DNA-Pol I synthetisiert, ist für die Auffüllung der kleinen Lücken, die zuvor noch durch die RNA-Primer (kleiner als zehn Nucleotide) besetzt waren, ausgezeichnet geeignet.

Da sowohl die DNA-Pol I als auch die DNA-Pol III an der DNA-Replikation beteiligt sind, müssen beide Enzyme sehr genau arbeiten und weisen deswegen auch eine korrekturlesende Exonucleaseaktivität auf. Die verbleibenden drei DNA-Polymerasen in *E. coli* sind auf die DNA-Reparatur spezialisiert und zeigen keine Korrekturleseaktivität. Diese Enzyme werden in Kapitel 9 noch näher beschrieben.

Auch Eukaryonten besitzen mehrere verschiedene DNA-Polymerasen – in einer typischen eukaryotischen Zelle kommen mehr als 15 DNA-Polymerasen vor. Von diesen sind drei für die Duplikation des Genoms essenziell: DNA-Pol  $\delta$ , DNA-Pol  $\epsilon$  und DNA-Pol  $\alpha$ /Primase. Jede dieser drei eukaryotischen DNA-Polymerasen besteht aus mehreren Untereinheiten (siehe Tabelle 8.2). DNA-Polymerase  $\alpha$ /Primase ist spezifisch an der Initiation neuer DNA-Stränge beteiligt. Es handelt sich um einen Proteinkomplex aus vier Untereinheiten, einer DNA-Pol  $\alpha$  aus zwei Untereinheiten und einer Primase aus zwei Untereinheiten. Nachdem die Primase einen RNA-Primer synthetisiert hat, wird das dabei gebildete Primer-Matrize-Hybrid direkt an die assoziierte DNA-Pol  $\alpha$  weitergereicht, um die DNA-Synthese zu starten.

Wegen ihrer geringen Prozessivität wird die DNA-Pol  $\alpha$ /Primase schnell durch die hochgradig prozes-



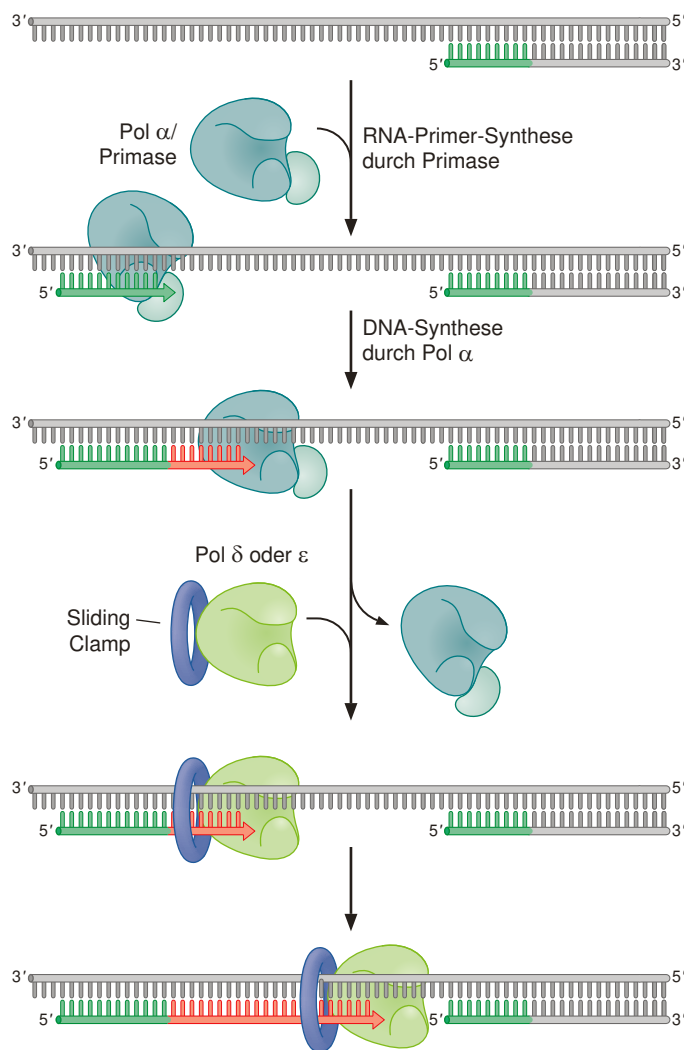
Prokaryotische Polymerasen ( <i>E. coli</i> )	Anzahl der Untereinheiten	Funktion
Pol I	1	Entfernung von RNA-Primern, DNA-Reparatur
Pol II (Din A)	1	DNA-Reparatur
Pol-III-Kernenzym	3	Chromosomenreplikation
Pol-III-Holoenzym	9	Chromosomenreplikation
Pol IV (Din B)	1	DNA-Reparatur, Transläsionssynthese (TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' <sub>2</sub> C)	3	TLS
Eukaryotische Polymerasen	Anzahl der Untereinheiten	Funktion
Pol α	4	Primersynthese während der DNA-Replikation
Pol β	1	Basenexzisionsreparatur
Pol γ	3	Mitochondriale Replikation und Reparatur von DNA
Pol δ	2–3	Folgestrang-DNA-Synthese; Nucleotid- und Basenexzisionsreparatur
Pol ε	4	Leitstrang-DNA-Synthese; Nucleotid- und Basenexzisionsreparatur
Pol θ	1	Reparatur von Quervernetzungen in der DNA
Pol ζ	1	TLS
Pol λ	1	Meiose-assoziierte DNA-Reparatur
Pol μ	1	Somatische Hypermutation
Pol κ	1	TLS
Pol η	1	Relativ genaue TLS nach <i>cis</i> /syn-Cyclobutan-Dimeren
Pol τ	1	TLS, somatische Hypermutation
Rev 1	1	TLS

Tabelle 8.2: Aktivitäten und Funktionen von DNA-Polymerasen.

siven Enzyme DNA-Pol δ und DNA-Pol ε ersetzt. Den Prozess, bei dem die DNA-Pol α/Primase gegen DNA-Pol δ und DNA-Pol ε ausgetauscht wird, bezeichnet man als **Polymerase-Switching** (► Abbildung 8.17). Somit arbeiten drei verschiedene DNA-Polymerasen an eukaryotischen Replikationsgabeln. Die Ergebnisse jüngerer Untersuchungen deuten darauf hin, dass die DNA-Pol ε und die DNA-Pol δ auf die Synthese unterschiedlicher Stränge an der Replikationsgabel spezialisiert sind – demnach synthetisiert DNA-Pol ε den Leitstrang und DNA-Pol δ den Folgestrang. Wie in Bakterienzellen besteht die Funktion der meisten verbleibenden eukaryotischen DNA-Polymerasen in der DNA-Reparatur.

### 8.4.2 Sliding Clamps erhöhen die Prozessivität von DNA-Polymerasen dramatisch

Durch eine hohe Prozessivität an der Replikationsgabel wird eine schnelle Duplikation der Chromosomen sichergestellt. Wie wir bereits diskutiert haben, verlängern DNA-Polymerasen einen wachsenden DNA-Strang an der Replikationsgabel um Tausende bis Millionen von Nucleotiden, ohne sich vom Matrizenstrang zu lösen. Wären die Polymerasen an der Replikationsgabel allerdings allein und würden sie nicht durch andere Proteine bei ihrer Arbeit unterstützt, könnten sie nur etwa 20 bis 100 Nucleotide hinzufügen, bevor sie wieder von der Matrize dissoziierten.



**Abbildung 8.17: DNA-Polymerase-Switching während der eukaryotischen DNA-Replikation.** Die Abbildung zeigt die Reihenfolge, in der die verschiedenen eukaryotischen DNA-Polymerasen im Verlauf der DNA-Replikation ihre Aktivität entfalten. Aus Illustrationsgründen sind die dargestellten DNA-Abschnitte kürzer als in Wirklichkeit. Das typische Gesamtprodukt der DNA-Pol α/Primase besitzt eine Länge zwischen 50 und 100 Nucleotiden. Dieses wird durch die Pol ε beziehungsweise Pol δ anschließend um 100 bis 10.000 Nucleotide verlängert. DNA-Pol α/Primase kann zwar sowohl gegen Pol ε als auch gegen Pol δ ausgetauscht werden, jüngere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass Pol ε mit der Leitstrangmatrize und Pol δ mit der Folgestrangmatrize assoziiert.

Folglich stellt sich die Frage, wie genau die Prozessivität von DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel durch andere Proteine erhöht werden kann.

Ein Schlüssel zu der hohen Prozessivität von DNA-Polymerasen an Replikationsgabeln besteht in ihrer Assoziation mit speziellen Proteinen, die als **Sliding Clamps** (gleitende Klammern) bezeichnet werden. Diese Proteine sind aus mehreren identischen Untereinheiten zusammengesetzt. Ihre Gesamtstruktur ähnelt einem Schwimmreifen. Das Loch in der Mitte ist groß genug, um eine DNA-Doppelhelix hindurchzuführen und bietet zusätzlich ausreichend Platz für eine ein oder zwei Moleküle dicke Schicht aus Wassermolekülen zwischen dem DNA-Molekül und dem Protein (► Abbildung 8.18a). Diese strukturellen Eigenschaften ermöglichen den Sliding Clamps, auf der DNA entlangzugleiten, ohne sich von ihr zu lösen. Sliding Clamps binden außerdem fest an DNA-Polymerasen an Replikationsgabeln (siehe Abbildung 8.18b).

Der resultierende Komplex zwischen der Polymerase und der Sliding Clamp wandert während der DNA-Synthese effizient und auf hoch prozessive Weise auf der DNA-Matrize voran.

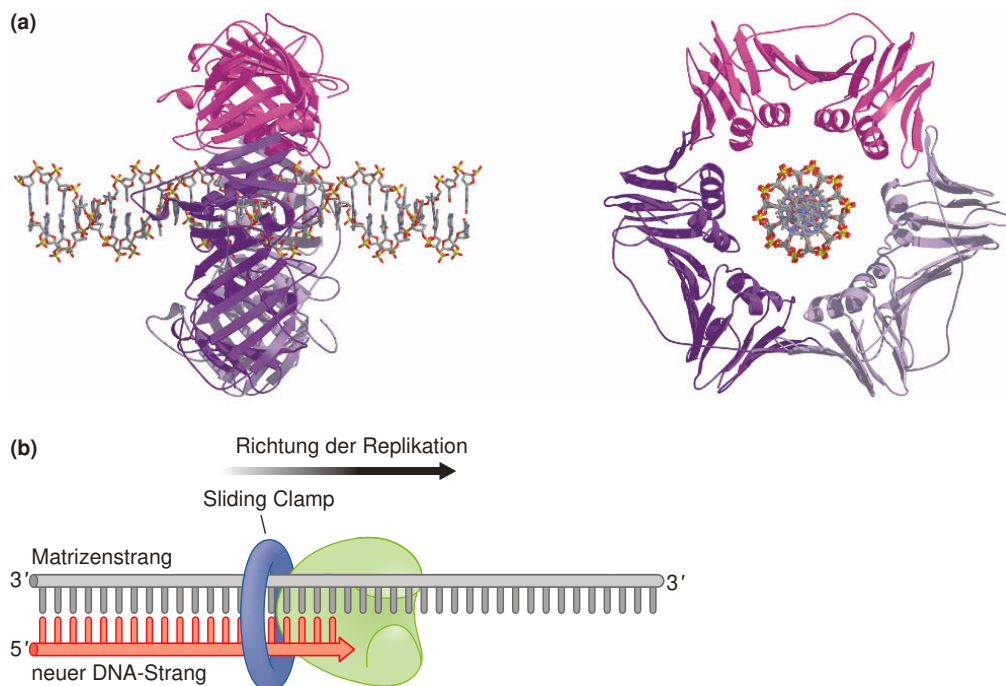
Wie verändert die Assoziation mit der Sliding Clamp die Prozessivität der DNA-Polymerase? In Abwesenheit einer Sliding Clamp dissoziiert und entfernt sich eine DNA-Polymerase von ihrer DNA-Matrize, nachdem sie im Mittel jeweils etwa 20 bis 100 Nucleotide an den wachsenden DNA-Strang angehängt hat. Ist sie jedoch an eine Sliding Clamp gebunden, löst sich das aktive Zentrum der DNA-Polymerase zwar immer noch häufig vom 3'-OH-Ende des wachsenden DNA-Strangs, aber die Assoziation mit der Sliding Clamp verhindert ihre vollständige Dissoziation und Entfernung von der DNA-Matrize (► Abbildung 8.19). Durch die Aufrechterhaltung einer engen Nähe zum DNA-Substrat stellt die Sliding Clamp sicher, dass die DNA-Polymerase schnell wieder an *dasselbe*

Primer:Matrize-Hybrid bindet und erhöht die Prozessivität der Polymerase auf diese Weise dramatisch.

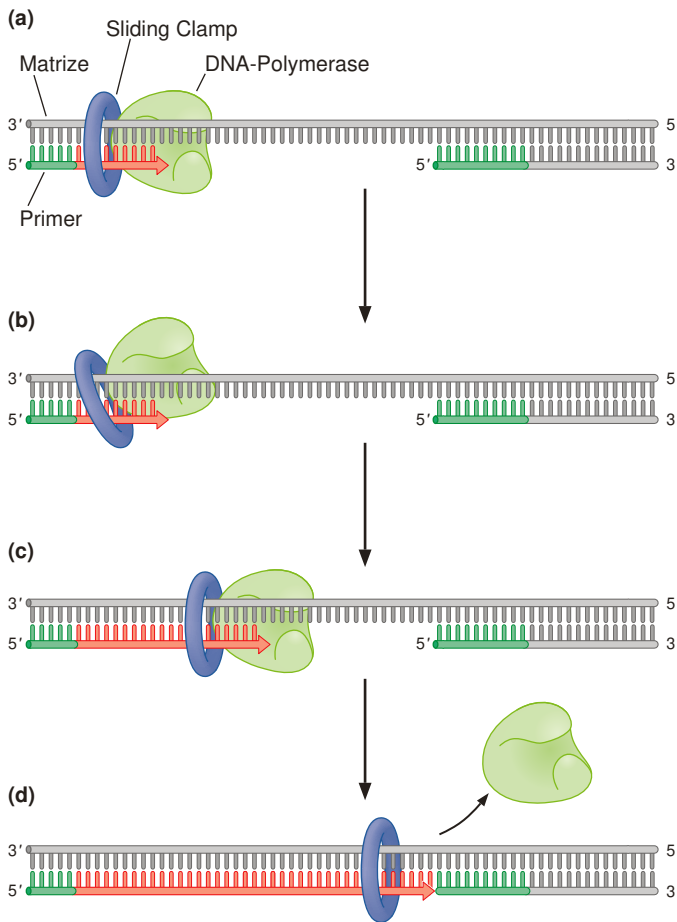
Nachdem die Synthese einer komplementären Kopie des Matrizenstrangs vollendet ist, muss sich die DNA-Polymerase von der vollständigen dsDNA und der Sliding Clamp lösen, um an ein neues Primer:Matrize-Hybrid binden und einen neuen DNA-Strang synthetisieren zu können. Die Freisetzung der Polymerase findet infolge einer veränderten Affinität zwischen der Sliding Clamp und der DNA-Polymerase statt, die von der Natur der gebundenen DNA abhängt. DNA-Polymerase, die an ein Primer:Matrize-Hybrid mit einzelsträngiger Matrizenregion gebunden ist, weist eine hohe Affinität bezüglich der Sliding Clamp auf. Wenn die DNA-Polymerase dagegen das Ende einer ssDNA-Matrize erreicht, wie zum Beispiel am Ende eines Okazaki-Fragments, verursacht die Anwesenheit von dsDNA im aktiven Zentrum eine Konformationsänderung der DNA-Polymerase, die zu einer verminderten Affinität der Polymerase bezüglich der Sliding Clamp und der DNA führt (siehe Abbildung 8.19). Nach der Vollendung der Replikation eines

DNA-Abschnitts löst sich die DNA-Polymerase deswegen von der Sliding Clamp und der DNA, so dass sie an ein anderes Primer:Matrize-Hybrid binden und einen weiteren DNA-Strang synthetisieren kann.

Im Anschluss an die Freisetzung der DNA-Polymerase wird eine Sliding Clamp nicht sofort von der replizierten DNA entfernt. Stattdessen treten andere Proteine, die ihre Wirkung an der frisch synthetisierten DNA entfalten müssen, mit dem Clamp-Protein in Kontakt. Wie wir in Abschnitt 7.6.2 beschrieben haben, werden beispielsweise Enzyme, welche die Bildung von Chromatin in eukaryotischen Zellen katalysieren, durch Wechselwirkungen mit der eukaryotischen Sliding Clamp namens PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, Kernantigen proliferierender Zellen) zur frisch replizierten DNA dirigiert. Ähnlich assoziieren Proteine, die an der Reparatur von Okazaki-Fragmenten beteiligt sind, mit Sliding Clamps. In all diesen Fällen akkumulieren die Proteine durch die Wechselwirkung mit Sliding Clamps an Orten frisch synthetisierter DNA – also dort, wo sie am meisten benötigt werden.



**Abbildung 8.18: Struktur einer Sliding Clamp .** (a) Dreidimensionales Strukturmodell einer Sliding Clamp, die eine DNA-Doppelhelix vollständig ringförmig umschließt. Die Öffnung im Zentrum der Sliding Clamp weist einen Durchmesser von etwa 35 Å auf, während der Durchmesser der DNA-Doppelhelix etwa 20 Å beträgt. Somit steht zusätzlich genügend Raum für eine ein oder zwei Moleküle dicke Schicht aus Wassermolekülen zwischen der DNA und der Sliding Clamp zur Verfügung. Vermutlich erleichtert die Schicht aus Wassermolekülen das Entlanggleiten der Sliding Clamp auf der DNA. (b) Die Sliding Clamp umringt den neuen DNA-Doppelstrang, der durch die mit dem Protein assoziierte DNA-Polymerase synthetisiert worden ist. Die Wechselwirkung der Sliding Clamp mit der Polymerase erfolgt mit dem Bereich der Polymerase, der den Austrittskanal des neuen DNA-Doppelstrangs umgibt.



**Abbildung 8.19: Sliding Clamps erhöhen die Prozessivität der mit ihnen assoziierten DNA-Polymerasen.** (a) Die Sliding Clamp umschließt den frisch synthetisierten DNA-Doppelstrang ringförmig und bindet gleichzeitig an die DNA-Polymerase. (b) Infolge ihrer relativ geringen Prozessivität löst sich die DNA-Polymerase häufig von ihrem DNA-Substrat, aber die Assoziation mit der Sliding Clamp verhindert, dass sie von der DNA weg diffundiert. (c) Die Assoziation der DNA-Polymerase mit der Sliding Clamp führt somit schnell zu einer erneuten Bindung der Polymerase an dasselbe DNA-Substrat und zur Fortsetzung der DNA-Synthese. (d) Nach der Vervollendung der Synthese einer komplementären Kopie des Matrizenstrangs erfolgt infolge des Fehlens einer einzelsträngigen Matrize eine Konformationsänderung der DNA-Polymerase, die zum Ablösen der Polymerase von der Sliding Clamp und der DNA führt.

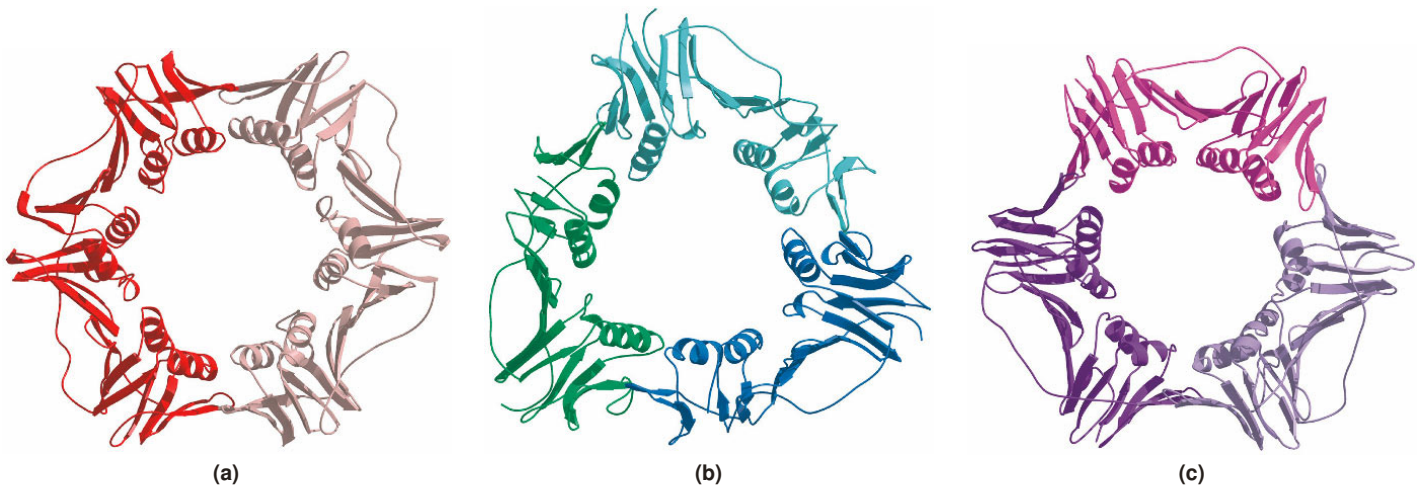
Sliding Clamps sind ein funktionell hochgradig konservierter Bestandteil der DNA-Replikationsmaschinerien aus so verschiedenen Organismen wie Viren, Bakterien, Hefen und dem Menschen. Im Einklang mit ihrer konservierten Funktion steht auch die hochgradig konservierte Struktur der Clamp-Proteine aus den verschiedenen Organismen (► Abbildung 8.20). In allen Fällen besitzt die Sliding Clamp die gleiche sechszählige Symmetrie und den gleichen Innendurchmesser. Trotz ihrer ähnlichen Gesamtstruktur weisen die Sliding Clamps allerdings teilweise unterschiedlich viele Untereinheiten auf.

### 8.4.3 Sliding Clamps werden durch Clamp Loader geöffnet und auf die DNA gesetzt

Sliding Clamps treten in Lösung als geschlossene Ringe auf. Damit die Klammer mit einer DNA-Doppelhelix geladen werden kann, muss der Ring deswegen zunächst geöffnet werden. Eine spezielle Klasse von Proteinkomplexen, die als **Clamp Loader** (Klammerlader)

bezeichnet werden, katalysieren die Öffnung und das Laden von Sliding Clamps mit DNA-Molekülen. Dabei koppeln sie die Platzierung der Sliding Clamp rund um einen DNA-Doppelstrang mit der Bindung und Hydrolyse von ATP (siehe ► Box 8.4). Clamp Loader entfernen Sliding Clamps auch von DNA-Molekülen, wenn diese nicht mehr genutzt werden. Wie DNA-Helicasen und Topoisomerasen verändern Clamp Loader die Konformation, aber nicht das kovalente Bindungsmuster – die Konfiguration – ihres Substrats (der Sliding Clamp).

Auf welche Weise werden die Zeitpunkte gesteuert, an denen Sliding Clamps auf DNA-Moleküle geladen und wieder von diesen entfernt werden? Das Laden einer Sliding Clamp findet immer dann statt, wenn in der Zelle ein Primer:Matrize-Hybrid anwesend ist. Diese DNA-Strukturen werden nicht nur während der DNA-Replikation, sondern auch im Verlauf verschiedener DNA-Reparaturprozesse gebildet (siehe Kapitel 9). Die Entfernung einer Sliding Clamp von einer DNA ist nur möglich, wenn diese gerade nicht mit einem anderen Protein assoziiert ist. Ein Clamp Loader und eine DNA-Polymerase können nicht gleichzeitig mit



**Abbildung 8.20: Dreidimensionale Struktur von Sliding Clamps aus verschiedenen Organismen.** Sliding Clamps kommen in allen Organismen vor und weisen alle eine ähnliche Struktur auf. (a) Die Sliding Clamp aus *E. coli* besteht aus zwei Kopien des  $\beta$ -Proteins. (b) Die Sliding Clamp des Phagen T4 ist ein Trimer aus drei Exemplaren des Proteins gp45. (c) Die eukaryotische Sliding Clamp stellt ein Trimer des Proteins PCNA dar.

einer Sliding Clamp wechselwirken, weil sie überlappende Bindungsstellen auf derselben Seite der Sliding Clamp nutzen. Eine Sliding Clamp, die mit einer DNA-Polymerase assoziiert vorliegt, kann deswegen nicht als Substrat zur Entfernung von der DNA dienen. Ähnlich treten zum Beispiel auch Faktoren für den Zusammenbau von Nucleosomen, Proteine zur Reparatur von Okazaki-Fragmenten und andere DNA-Reparaturproteine mit der gleichen Region der Sliding Clamp in Kontakt wie der Clamp Loader. Sliding Clamps werden deswegen erst dann von der DNA entfernt, wenn alle Proteine, die mit der jeweiligen Sliding Clamp wechselwirken, ihre Arbeit vollendet haben – und die Bindungsstelle für den Clamp Loader somit nicht mehr blockiert wird.

## Die DNA-Synthese an der Replikationsgabel

## 8.5

An der Replikationsgabel werden der Leitstrang und der Folgestrang simultan synthetisiert. Diese Strategie bringt den wichtigen Vorteil, dass während der Replikation nur eine begrenzte Menge von ssDNA in der Zelle vorkommt. Ein Einzelstrangbruch in einem ssDNA-Bereich hinter der Replikationsgabel verursacht einen vollständigen Bruch im betroffenen Chromosom, dessen Reparatur viel schwieriger ist als die Reparatur eines Einzelstrangbruchs in einer dsDNA. Darüber hinaus führt die Reparatur eines solchen

Schadens häufig zu einer Mutation in der DNA (siehe Kapitel 9). Somit besitzt die Begrenzung der Zeitspanne, in der DNA in einzelsträngiger Form vorliegt, große biologische Bedeutung. Um die Replikation der beiden DNA-Stränge zu koordinieren, arbeiten mehrere DNA-Polymerasen an der Replikationsgabel.

In *E. coli* wird die Koordination der Aktivitäten dieser Polymerasen durch ihre Assoziation in einem großen Multiproteinkomplex erleichtert. Bei diesem Komplex handelt es sich um das in Abschnitt 8.4.1 bereits erwähnte DNA-Polymerase-III-Holoenzym (►Abbildung 8.21). *Holoenzym* stellt eine allgemeine Bezeichnung für einen Multiproteinkomplex dar, in dem eine enzymatische Kernaktivität mit zusätzlichen Komponenten assoziiert vorliegt, welche die Funktion des Kernenzymes unterstützen. Das DNA-Polymerase-III-Holoenzym besteht aus zwei Kopien des DNA-Polymerase-III-Kernenzymes und einem Exemplar des pentameren  $\gamma$ -Komplexes (dem Clamp Loader von *E. coli*). Im Holoenzym bindet der einzelne  $\gamma$ -Komplex an beide DNA-Polymerase-III-Moleküle und besitzt somit eine essenzielle Bedeutung für die Bildung des Holoenzymes (siehe Abbildung 8.21). Die gleichen Untereinheiten des  $\gamma$ -Komplexes, die mit den beiden DNA-Polymerase-III-Molekülen assoziieren, treten etwas schwächer auch mit der DNA-Helicase in Wechselwirkung (siehe Abschnitt 8.5.1).

Wie können zwei DNA-Polymerase-III-Kernenzyme an der Replikationsgabel gekoppelt bleiben, während sie sowohl auf der Leitstrangmatrize als



# Copyright

Daten, Texte, Design und Grafiken dieses eBooks, sowie die eventuell angebotenen eBook-Zusatzdaten sind urheberrechtlich geschützt. Dieses eBook stellen wir lediglich als **persönliche Einzelplatz-Lizenz** zur Verfügung!

Jede andere Verwendung dieses eBooks oder zugehöriger Materialien und Informationen, einschließlich

- der Reproduktion,
- der Weitergabe,
- des Weitervertriebs,
- der Platzierung im Internet, in Intranets, in Extranets,
- der Veränderung,
- des Weiterverkaufs und
- der Veröffentlichung

bedarf der **schriftlichen Genehmigung** des Verlags. Insbesondere ist die Entfernung oder Änderung des vom Verlag vergebenen Passwort- und DRM-Schutzes ausdrücklich untersagt!

Bei Fragen zu diesem Thema wenden Sie sich bitte an: **info@pearson.de**

## Zusatzdaten

Möglicherweise liegt dem gedruckten Buch eine CD-ROM mit Zusatzdaten oder ein Zugangscode zu einer eLearning Plattform bei. Die Zurverfügungstellung dieser Daten auf unseren Websites ist eine freiwillige Leistung des Verlags. **Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.** Zugangscode können Sie darüberhinaus auf unserer Website käuflich erwerben.

## Hinweis

Dieses und viele weitere eBooks können Sie rund um die Uhr und legal auf unserer Website herunterladen:

**<https://www.pearson-studium.de>**