

# GRUNDLAGEN DER MOLEKULARBIOLOGIE

Prof. Dr. Anne Müller



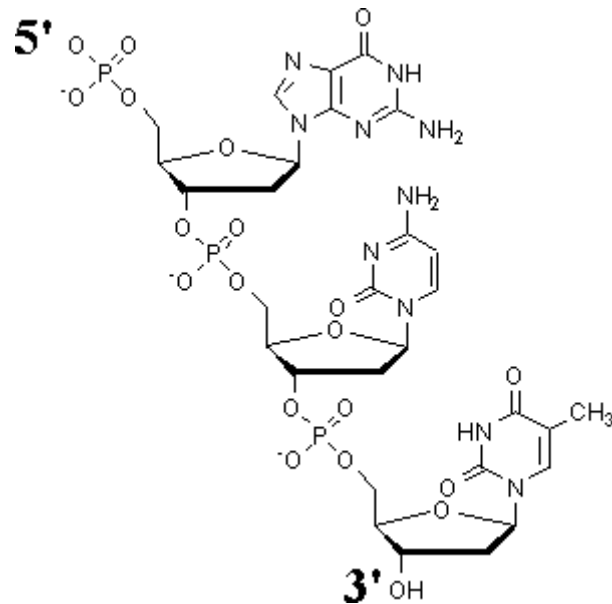
## 2 Polynucleotide (DNA und RNA)

- 2.1 Entdeckungsgeschichte und Raumstruktur
- 2.2 Spezifität der Basenpaarung, Hybridisierung
- 2.3 DNA-Schmelztemperatur ( $T_m$ )
- 2.4 Verschlüsselung der genetischen Information

Nucleinsäuren sind Polymere, die aus Ketten von Mononucleotiden bestehen, welche untereinander durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft sind.

### Desoxyribonucleinsäure (DNA):

Ähnlich wie bei den Proteinen bestehen die Polynucleotidstränge aus einer Hauptkette mit periodischer Struktur (-Phosphat-Pentose-Phosphat-Pentose-), die das Rückgrat des Moleküls bildet, und variablen Seitenketten (Basen), welche mit den variablen Seitenketten eines Polypeptids vergleichbar sind. Aus der Verknüpfungsart der Bausteine ergeben sich zwei definierte Enden des Nucleinsäure-Moleküls, das somit eine Polarität erhält. Nach einer Übereinkunft schreibt man die Kette so, dass das 5'-Phosphat-Ende links und das 3'-OH-Ende ohne Phosphat rechts steht. Diese direktionelle Reihenfolge der Nucleotide in der Nucleinsäure ist die sogenannte Nucleotidsequenz. Die Sequenz der abgebildeten DNA-Kette lautet d (GCT).



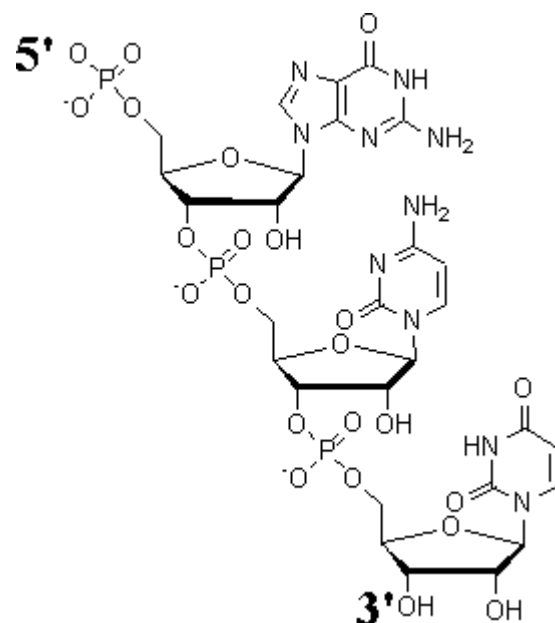
### Ribonucleinsäure (RNA):

Weil DNA aus einer Kette von 2'-Desoxynucleosid-5'-Monophosphaten besteht, ist RNA aus Nucleosid-5'-Monophosphaten zusammengesetzt.

Die Nucleotidsequenz des abgebildeten RNA-Moleküls lautet GCU.

### NB: In RNA ist Thymin durch Uridin ersetzt!

Polynucleotide (vor allem RNA-Moleküle) bilden als Makromoleküle definierte Raumstrukturen, welche Ähnlichkeiten mit denen der Proteine besitzen.



## 2.1 Entdeckungsgeschichte und Raumstruktur

**1871:** Friedrich Miescher isolierte und charakterisierte als erster die Nucleinsäuren aus Eiter und Fischsperma.

**1943:** Oswald Avery entdeckte, dass die DNA das verantwortliche Agens bei der Pneumokokkentransformation ist. Sein Experiment ist ein Meilenstein in der Entwicklung der Biochemie. Vorher wurde allgemein angenommen, dass chromosomale Proteine die genetische Information in sich tragen und dass die DNA eine zweitrangige Rolle spielt.

**1950:** Erwin Chargaff zog aus den Resultaten seiner Untersuchungen der Basenzusammensetzung der DNA wichtige Schlussfolgerungen:

- Die Basenzusammensetzung der DNA variiert von einer Spezies zur anderen.
- Die Anzahl der Adeninreste ist bei allen DNAs, unabhängig von der Spezies, gleich der Anzahl der Thyminreste, und die Anzahl der Guaninreste ist immer gleich der Anzahl der Cytosinreste.

$$A=T \quad G=C$$

- Aus diesen Beziehungen folgt, dass die Summe der Purinreste gleich der Summe der Pyrimidinreste ist.

$$A+G = T+C$$

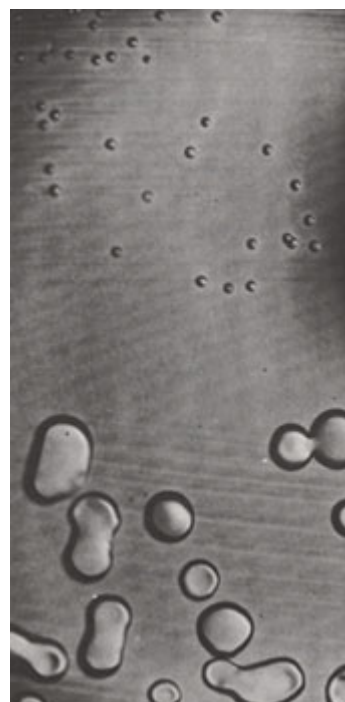
- DNA aus verschiedenen Geweben derselben Spezies hat dieselbe Basenzusammensetzung, die sich für ein und dieselbe Spezies weder mit dem Alter, noch mit dem Ernährungszustand, noch mit den Umweltbedingungen ändert. (z.B.: Der Adeningehalt der menschlichen DNA ist eine konstante Grösse und ist der gleiche in allen Zellen des menschlichen Organismus.)

In den folgenden Jahren erbrachten die von Rosalind Franklin und Maurice Wilkins durchgeführten Röntgenstrukturanalysen an DNA-Fasern charakteristische Beugungsmuster. Aus diesen Mustern konnten für die DNA-Fasern zwei Periodizitäten entlang der Längsachse abgeleitet werden, eine primäre von 0.34 nm und eine sekundäre von 3.4 nm. Daraus ergab sich das Problem, ein dreidimensionales Modell zu formulieren, welches nicht nur diese zwei Periodizitäten berücksichtigte, sondern auch die von Chargaff gefundene Basenkomplementarität (A=T und G=C).

**1953:** James Watson und Francis Crick postulierten eine dreidimensionale DNA-Struktur, die beide Bedingungen erfüllte, und leiteten daraus unmittelbar deren Replikationsmechanismus ab.

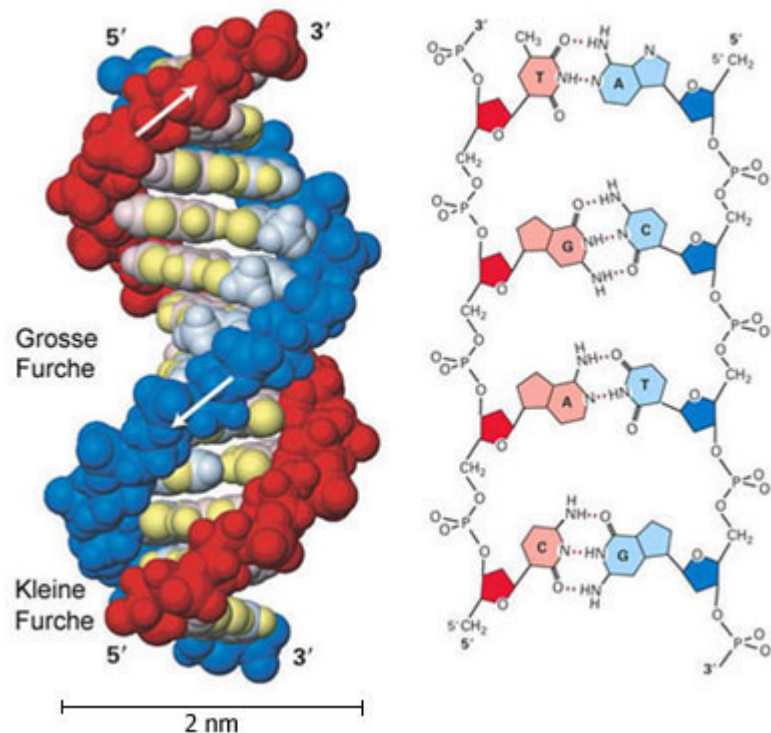
**Bild:** DNA aus hitzegetöteten S-Pneumokokken kann nichtpathogene R-Pneumokokken (kleine Kolonien) in pathogene S-Pneumokokken (grosse, glänzende Kolonien) transformieren.

**Warum?** Dem R-Stamm fehlt ein Gen, das für ein Polysaccharid codiert, das für die Pathogenizität des Bakteriums erforderlich ist. Beim Transfer von DNA des S-Stammes in den R-Stamm wird die funktionelle (wild type) Kopie des Gens ins Genom des R-Bakteriums integriert (dank Homologe Rekombination, siehe Kapitel 6). Damit wird der „transformierte“ R-Stamm auch pathogen.



### B-DNA (Watson-Crick-Doppelhelix)

- Zwei helikale, antiparallele Polynucleotidstränge winden sich rechtshändig um eine gemeinsame Achse (Doppelschraube).
- Die Basen sind zum Innern der Helix gekehrt, während sich die Phosphat- und Desoxyriboseereste aussen befinden. Die Ringebenen der Basen stehen senkrecht zur Helixachse.
- Der Helixdurchmesser beträgt 2 nm. Benachbarte Basen sind auf der Helixachse 0.34 nm voneinander entfernt. Nach 10 Basen wiederholt sich die Helixstruktur, d.h. in Intervallen von 3.4 nm.
- Die Basenpaarung ist spezifisch. Adenin ist immer mit Thymin über zwei H-Bindungen, Guanin stets mit Cytosin über drei H-Brücken verbunden.
- Die Doppelhelix wird stabilisiert durch die H-Bindungen zwischen den Basen der komplementären Stränge, aber auch durch hydrophobe Effekte zwischen aufeinandergestapelten Basen. Die hochpolare Zucker-Phosphat-Hauptkette befindet sich an der Aussenseite, dem wässrigen Milieu ausgesetzt.



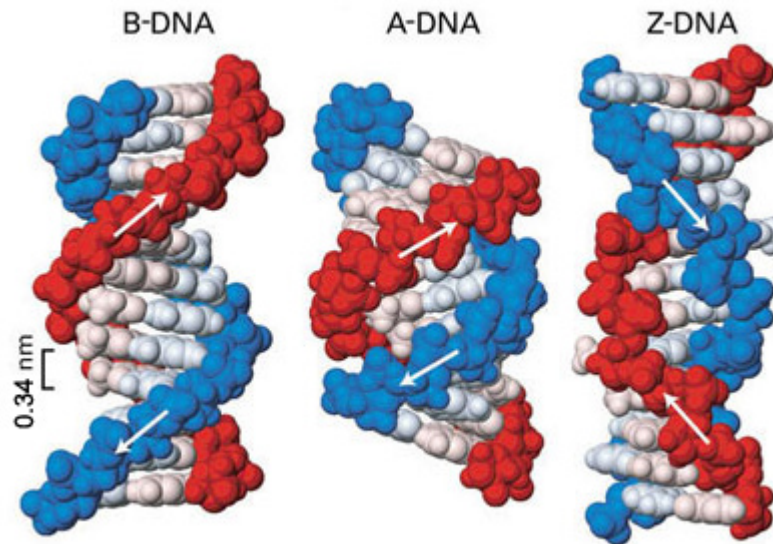
### A-DNA

Eine weitere Form der DNA, A-DNA, tritt auf, wenn die relative Feuchtigkeit unter ungefähr 75% absinkt. Die A-DNA ist wie die B-DNA eine rechtshändige Helix aus antiparallelen Strängen, die durch Watson-Crick Basenpaarung zusammengehalten wird. Die A-Helix ist aber breiter und kürzer als die B-Helix. Diese Strukturunterschiede entstehen primär aus der unterschiedlichen Faltung der Zuckereinheiten: die A-DNA besitzt Zuckereinheiten mit einer 3'-endo-, die B-DNA dagegen solche mit 2'-endo-Konformation. Die 3'-endo-Anordnung in der A-DNA führt zu einer Neigung der Basenpaare um 19° zur Helixachse. Darüberhinaus verschwindet die kleine Furche nahezu vollständig. Die Phosphatgruppen der A-DNA binden weniger H<sub>2</sub>O-Moleküle als die in der B-Helix. Eine Dehydratisierung begünstigt demnach die A-Form.

**Doppelsträngige Regionen der RNA und RNA-DNA-Hybride nehmen eine doppelhelikale Form an, die der A-DNA sehr ähnlich ist. Aufgrund einer sterischen Behinderung durch die 2'-OH-Gruppe der Ribose kann die RNA keine B-Helix bilden.**

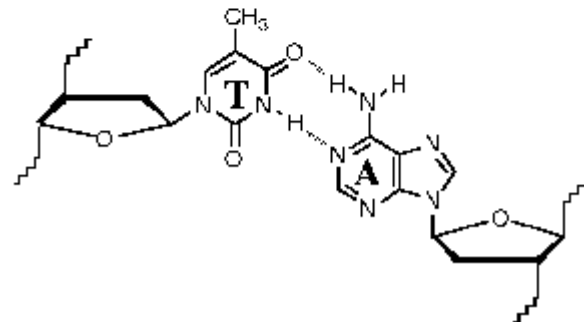
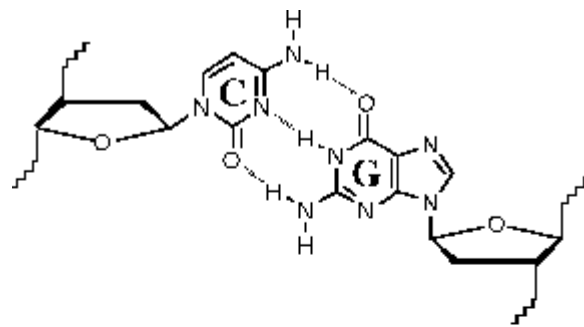
### Z-DNA

Die Z-DNA ist eine linkshändige Doppelhelix, in der die Phosphatgruppen des Rückgrats im Zickzack verlaufen. Sequenzen von alternierenden Pyrimidinen und Purinen können in hohen Salzkonzentrationen die Z-Form annehmen. Während über die biologische Bedeutung der Z-DNA noch Unklarheit herrscht, belegt ihre Existenz sehr deutlich, dass die DNA ein flexibles, dynamisches Molekül ist.



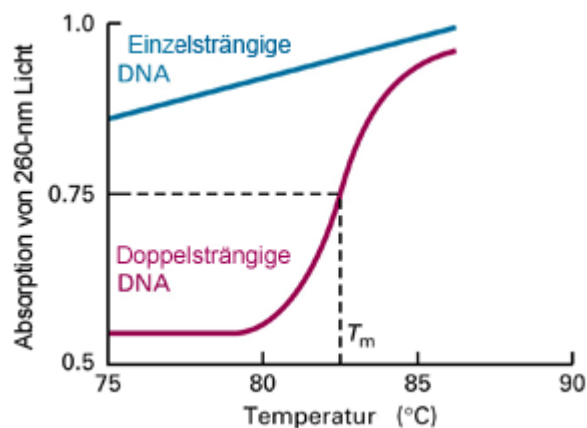
## 2.2 Spezifität der Basenpaarung, Hybridisierung

- Es ergibt sich eine sterische Beschränkung der Basenpaarung durch die regelmässige Helixstruktur der Zucker-Phosphat-Hauptkette. Die glykosidischen Bindungen der Purin-Pyrimidin-Basenpaare sind immer gleich weit voneinander entfernt. Diese Distanz würde für zwei Purinbasen nicht ausreichen. Zwei Pyrimidinbasen wären hingegen zu weit voneinander entfernt, um H-Bindungen (Wasserstoffbrücken) zu bilden.
- Die Voraussetzungen zur Ausbildung von H-Bindungen sind optimal bei der Paarung von Adenin mit Thymin bzw. Guanin mit Cytosin (Donor jeweils gegenüber einem Akzeptor).



## 2.3 DNA-Schmelztemperatur ( $T_m$ )

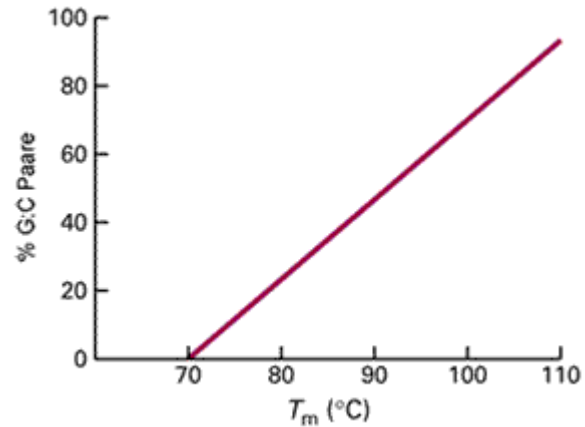
Die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren können gebrochen werden. Dies kann durch Erwärmen einer DNA-Lösung geschehen oder durch Säure bzw. Alkalizugabe, was eine Ionisation der Basen zur Folge hat. Das Aufwinden der Doppelhelix wird Schmelzen genannt. Die Schmelztemperatur ist definiert als diejenige Temperatur, bei der die Helixstruktur zur Hälfte verloren geht. Die Stabilität der Doppelhelix hängt sowohl von der Basenpaarung als auch von der Basenstapelung ab. Das Schmelzen lässt sich durch Messung der Extinktion bei 260 nm verfolgen: Infolge des Zusammenbruchs der Basenpaarung nimmt die Extinktion zu – ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird (siehe Bild rechts).



**Bild:** Der Schmelzpunkt hängt stark von der Basenzusammensetzung ab. DNA mit vielen GC-Basenpaaren besitzt einen höheren  $T_m$ -Wert als AT-reiche DNA. Deshalb schmelzen die AT-reichen DNA-Bezirke zuerst.

Getrennte komplementäre DNA-Stränge lagern sich spontan wieder zusammen, wenn die Temperatur unter den  $T_m$ -Wert gesenkt wird.

Diese Renaturierung bezeichnet man als „annealing“. *In vivo* wird die Doppelhelix von DNA-Helikasen geöffnet (z.B. DnaB im Abschnitt 3.1).



## 2.4 Verschlüsselung der genetischen Information

Die Sequenz der Aminosäuren (As) ist in der Basenfolge der DNA verschlüsselt.

In Proteinen ist die Reihenfolge von 20 verschiedenen As festzulegen:

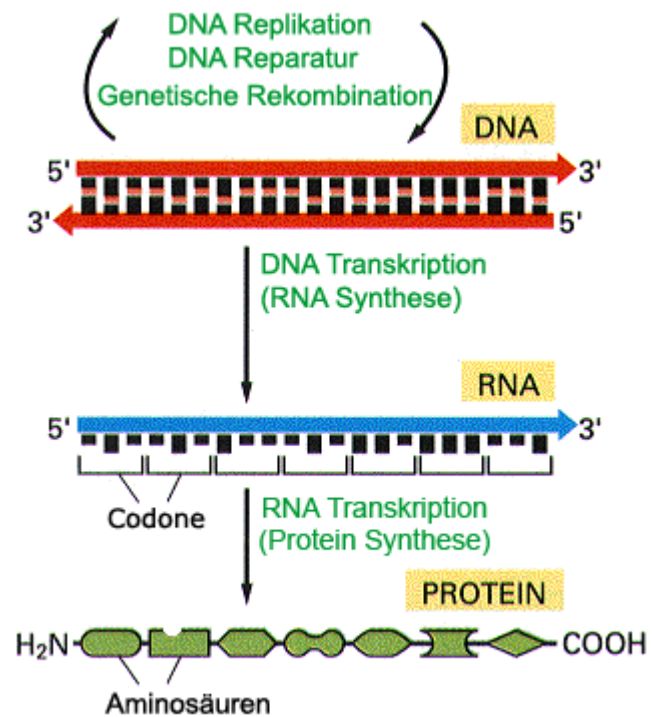
4 verschiedene Basen:	4 Buchstaben
Pro As je 2 Basen:	$4^2 = 16$ Wörter
Pro As je 3 Basen (Triplet):	$4^3 = 64$ Wörter

Für die Proteinbiosynthese wird durch den Schritt der Transkription die mRNA als Arbeitskopie des Gens (DNA) hergestellt. Sie enthält die Information über die As-Sequenz in Form der Dreiergruppen von Basen, die jeweils ein Codon bilden. Ein Codon der mRNA hat die gleiche Basensequenz (mit U statt T) wie das entsprechende Basentriplett auf dem codogenen Strang der DNA.

Von dem Prinzip, wie die genetische Information gespeichert wird, leitet sich auch die Art der Übertragung genetischer Information ab. Die drei Hauptschritte des genetischen Informationsflusses sind Replikation, Transkription und Translation.

Bei der Replikation wird Eltern-DNA kopiert unter Bildung von Tochter-DNA-Molekülen mit Nucleotidsequenzen, die mit denen der Eltern-DNA identisch sind.

In der Transkription werden Teile der genetischen Information der DNA in die Basenfolge der RNA umgeschrieben. Während der Translation wird die in der RNA codierte genetische Information mit Hilfe von Ribosomen in das 20-Buchstaben-Alphabet der Proteinstruktur übersetzt.



### Lernziele

- “Chargaff’s Rules” kennen (Basenzusammensetzung des einen Stranges aufgrund der Zusammensetzung des anderen Stranges berechnen können)
- Prinzipien der Watson-Crick-Basenpaarung verstehen (Sequenz des einen Stranges von der Sequenz des anderen ableiten können)
- Schmelzkonzept der DNA verstehen (wie wird dieses bei DNA/DNA- bzw. DNA/RNA-Hybridisierung angewandt ? Was ist  $T_m$  ?)