

Nucleinsäuren

1869 isolierte Friedrich Miescher, ein Mitarbeiter von Felix Hoppe-Seyler, dem Begründer der Biochemie, im Tübinger Schlosslabor das „Nuclein“ aus den Zellkernen von Leukozyten, die er aus eitrigen Verbänden gewann.

Er erkannte, dass sich das „Nuclein“ aufgrund seines Phosphorgehalt von Proteinen unterschied und stellte erste Überlegungen zur möglichen Bedeutsamkeit als Erbsubstanz an.



DNA...

- DNA (Desoxyribonucleinsäure) ist in allen Prokaryonten und Eukaryonten das Molekül der Vererbung.
- Die DNA besteht aus langen, in Helixform gewundenen Polynucleotidsträngen (Doppelhelix). Die Stränge verlaufen antiparallel.
- DNA-Moleküle sind sehr lang (Chromosom von *E.coli*: 4×10^6 Basenpaare , Länge: 14×10^5 nm).
- DNA-Moleküle können ringförmig sein und Superhelices ausbilden.
- Die beiden Ketten werden durch Wasserstoffbrücken zwischen Basenpaaren zusammengehalten.
- Die genetische Information ist in der Basensequenz des Stranges enthalten.

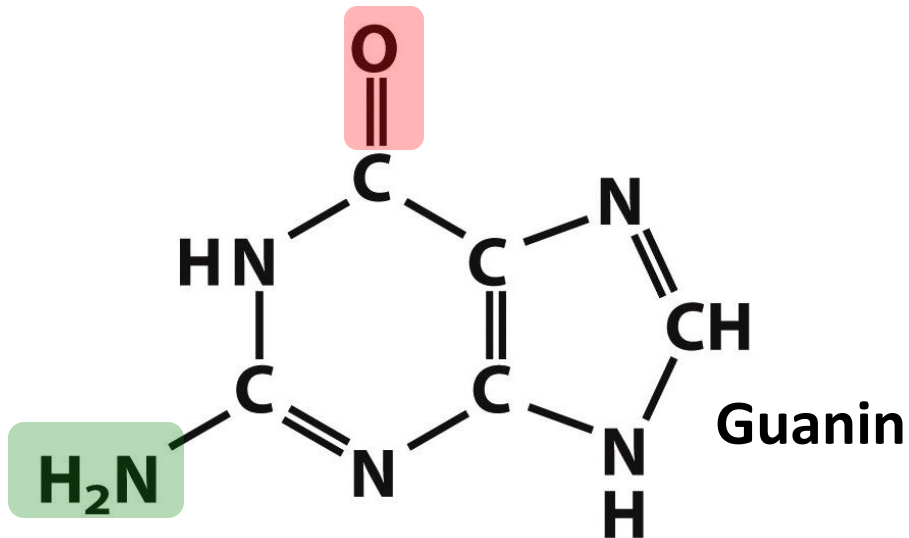
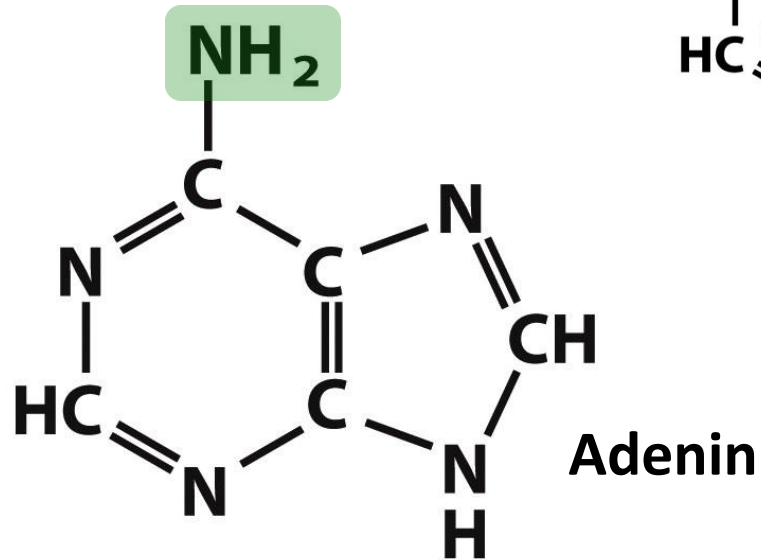
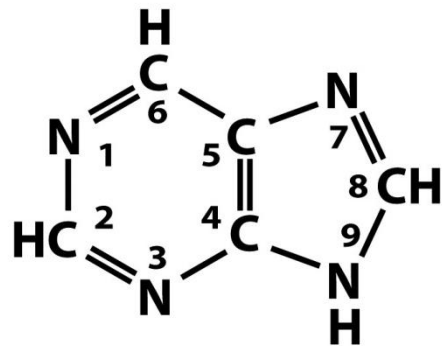
Was ist ein Nucleotid ?

Ein Nucleotid besteht aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, die über eine N-glykosidische Bindung mit einer in 5'-Stellung phosphorylierten Ribose (RNA) oder Desoxyribose (DNA) verknüpft ist .

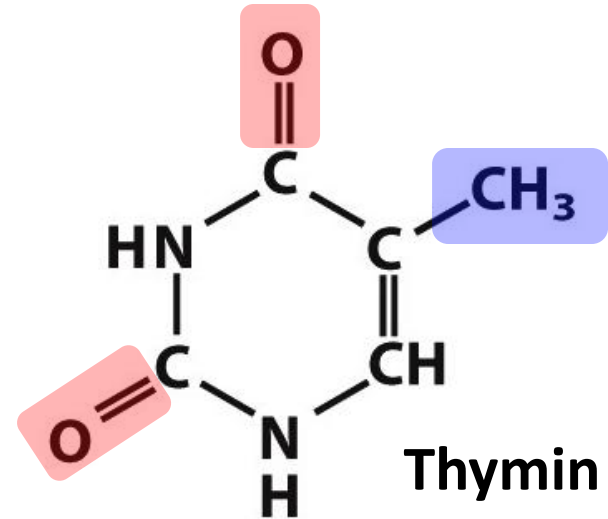
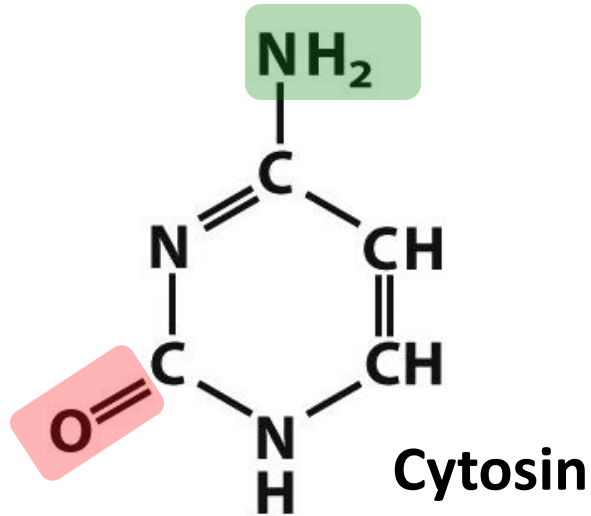
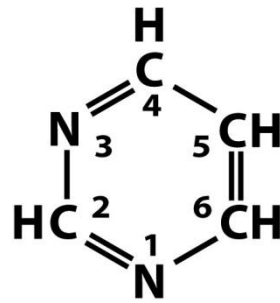
...und was ein Nucleosid ?

Ein Nucleosid besteht nur aus Base und Zucker.

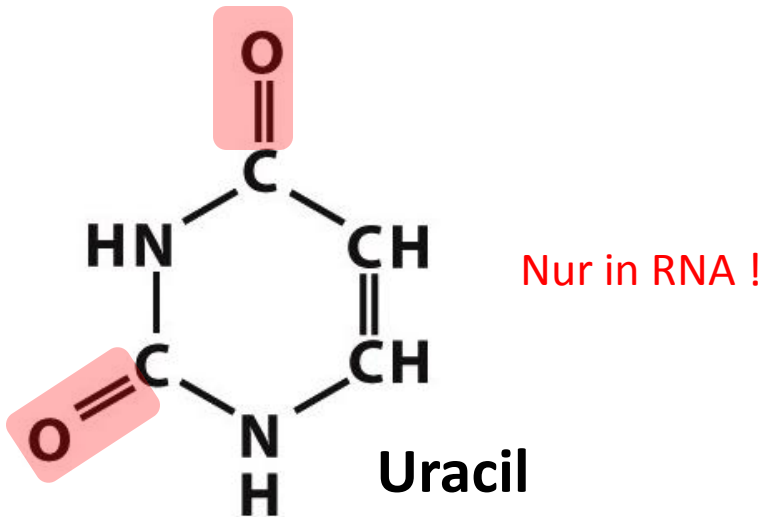
Purin-Basen

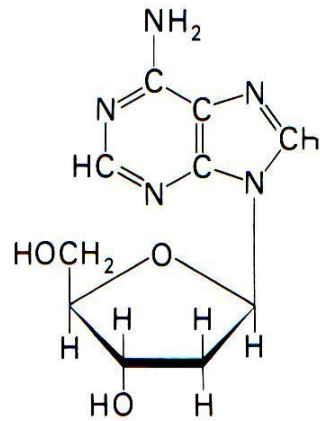


Pyrimidin-Basen

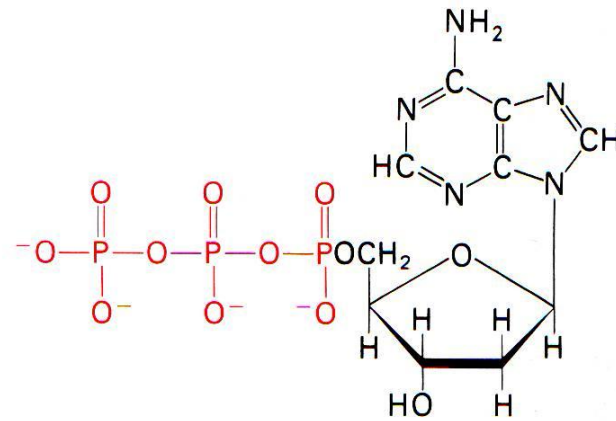


Nur in DNA !





Desoxyadenosin
(ein Nucleosid)



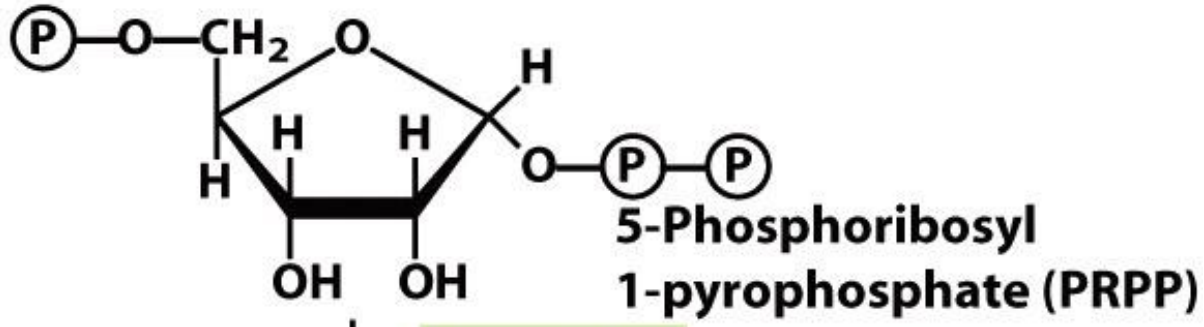
Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)
(ein Nucleotid)

Wie kommen wir an die Nucleotide ?

1. Möglichkeit: de-novo-Biosynthese
2. Möglichkeit: Recycling-Biosynthese (salvage-pathway)

Was ist zuerst da – der Zucker oder die Base ?

Purinnucleotid-Biosynthese beginnt mit PRPP



Woher stammen die Atome?

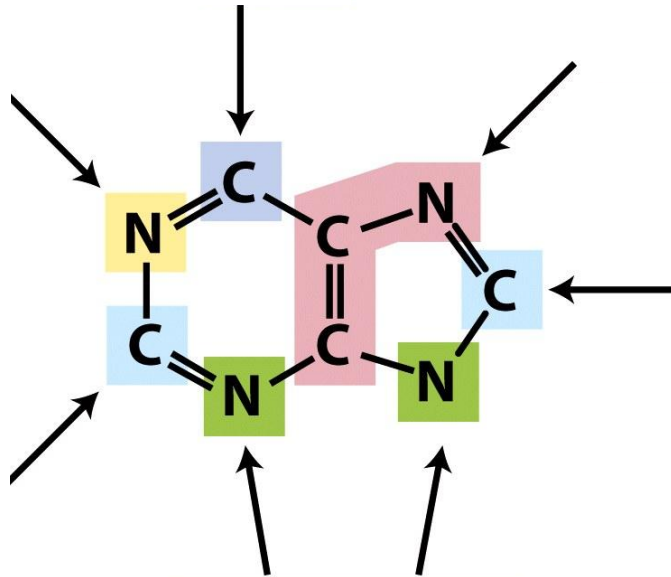
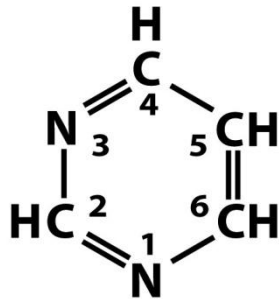


Figure 22-32
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Pyrimidinnucleotid-Biosynthese



1. Biosynthese der Ringstruktur
2. Fusion des fertigen Pyrimidinrings an PRPP

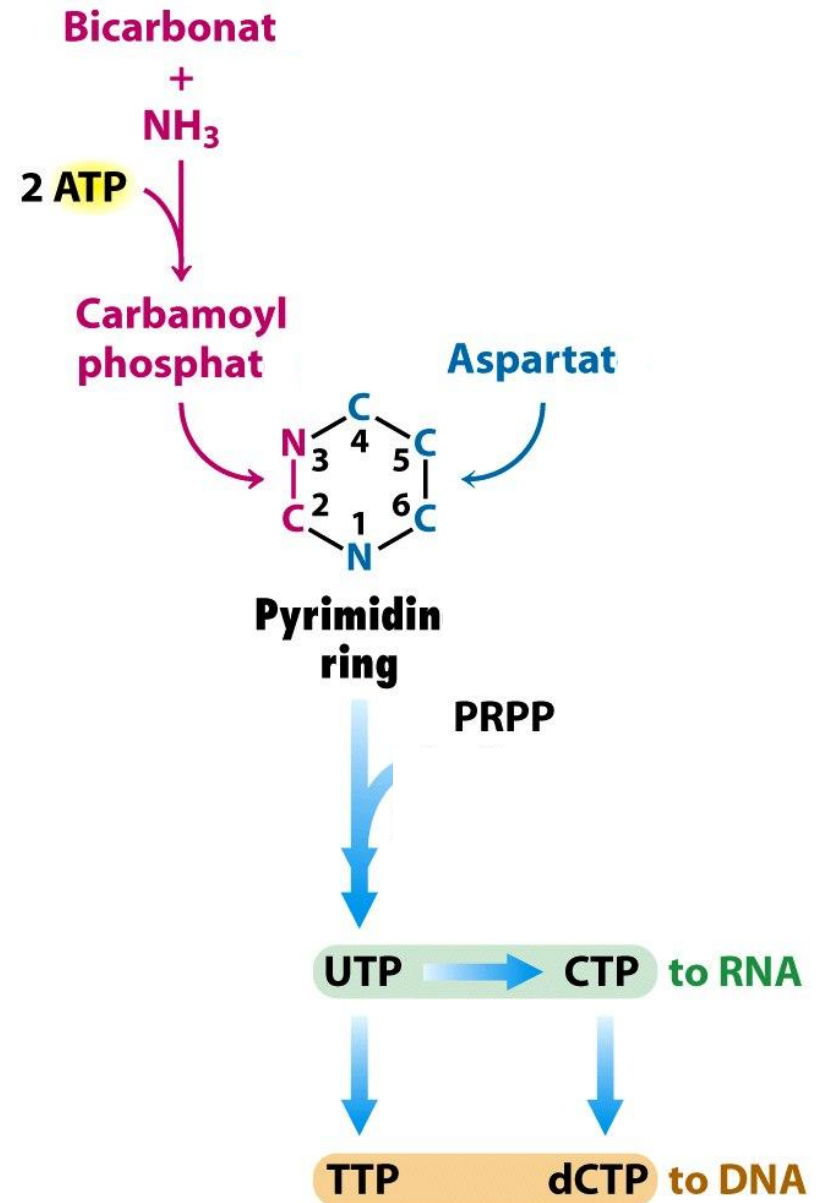
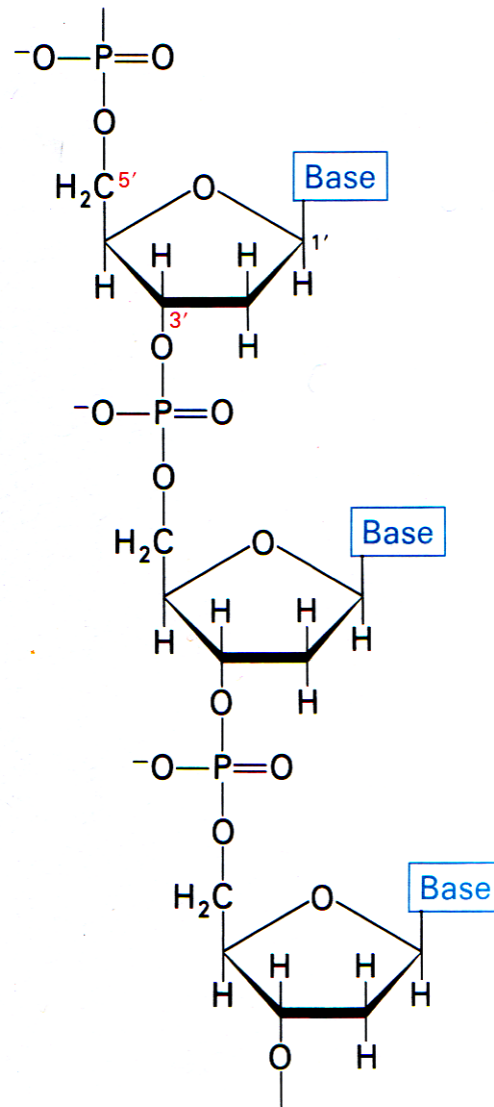


Figure 25-2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Ausschnitt aus einem DNA-Molekül



Wie stellt man DNA-Sequenzen dar ?

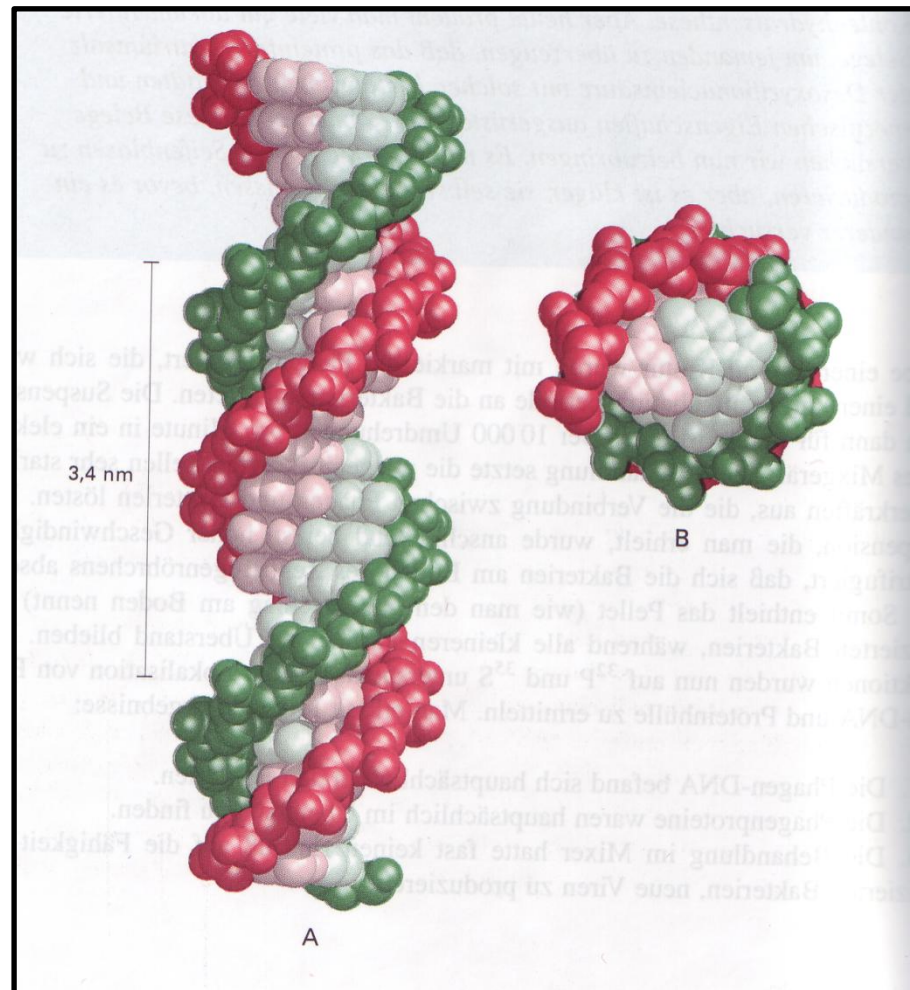
Freie 5'-OH-
Gruppe

ACATTTGCTTCTGACACAACTGTGTGTTCACT

Freie 3'-OH-
Gruppe

Darstellung in 5' → 3'-Richtung

1953: Entdeckung der DNA-Doppelhelix durch James Watson und Francis Crick



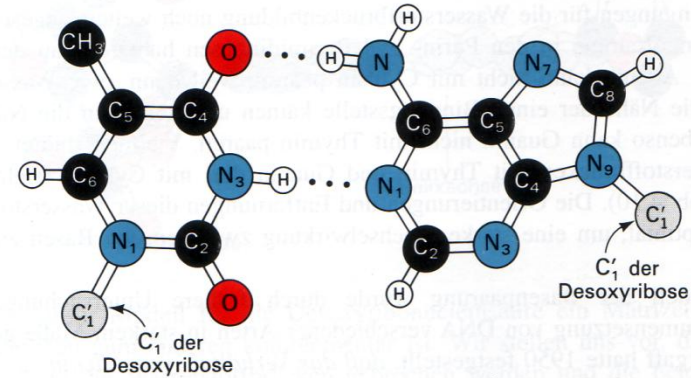
Eigenschaften des DNA-Modells von Watson und Crick:

- 2 helikale Polynucleotidstränge sind um eine gemeinsame Achse gewunden
- Die Stränge verlaufen antiparallel
- Die Basen sind zum Inneren gedreht, Zucker- und Phosphatreste befinden sich außen
- Die Ringebenen der Basen stehen senkrecht auf der Helixachse, die Zucker stehen fast im rechten Winkel zu den Basen
- Die Ganghöhe der Helix beträgt 3,4 nm
- Die Ketten werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zusammengehalten
- In der Basensequenz liegt die genetische Information

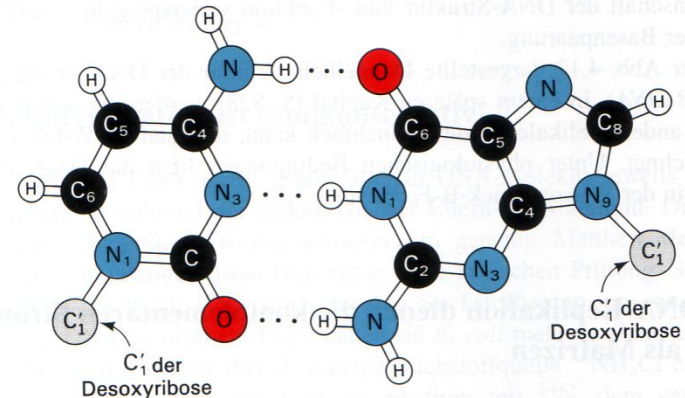
Spezifität der Basenpaarung:

Chargaff-Regel (1950):

Das Verhältnis von Adenin zu Thymin und von Guanin zu Cytosin ist in allen DNA-Arten = 1



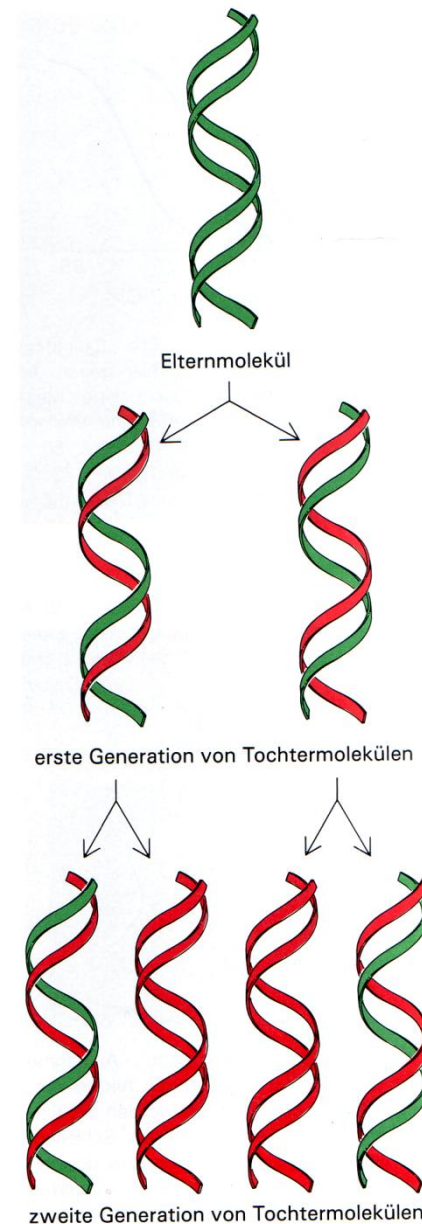
4.9 Modell eines Adenin-Thymin-Basenpaares.



4.10 Modell eines Guanin-Cytosin-Basenpaares.

Aus dem Doppelhelixmodell ergibt sich der Mechanismus der Replikation

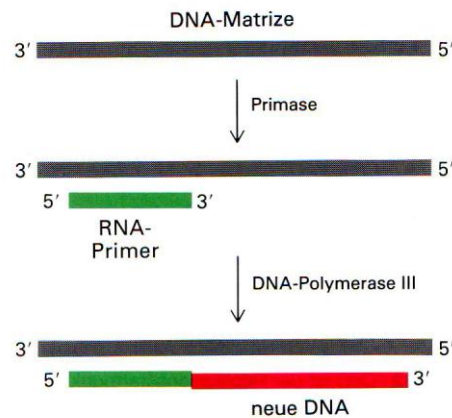
Die Replikation verläuft semikonservativ



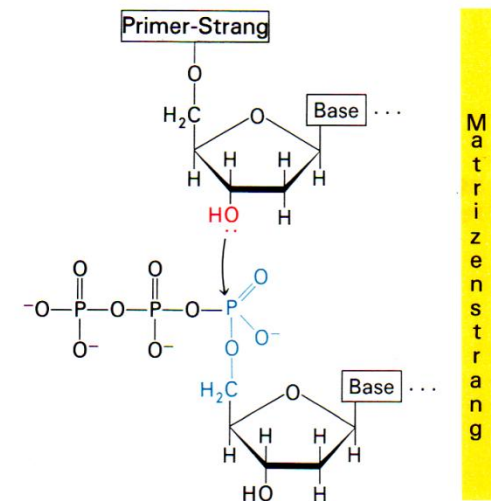
DNA wird durch DNA-Polymerasen synthetisiert

DNA-Polymerase I wurde 1958 von Arthur Kornberg aus E.coli isoliert

- Sie ist ein matrizenabhängiges Enzym
- Sie benötigt dATP, dGTP, dCTP, dTTP und Mg-Ionen
- Sie benötigt einen Primer-Strang (ein kurzes RNA-Stück)
- Sie addiert Desoxyribonucleotide an das 3'-OH-Ende eines bereits vorhandenen Strangs
- Die Syntheserichtung ist 5' $\longrightarrow$ 3'
- Sie besitzt auch Nuclease-Aktivität (Korrekturlesen !)

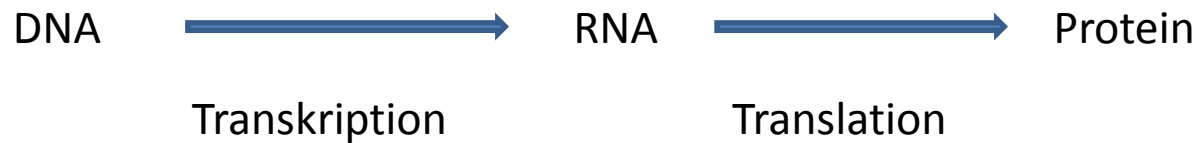


31.33 Zur DNA-Replikation dient ein kurzes RNA-Stück als Primer, das von einer Primase, einer RNA-Polymerase, synthetisiert wird. Die Primer-RNA wird zu einem späteren Zeitpunkt der Replikation herausgeschnitten.



31.23 Kettenverlängerung durch DNA-Polymerasen.

Genexpression – der Fluß der genetischen Information



RNA...

- Enthält Ribose statt Desoxyribose und Uracil statt Thymin.
- Ist meist einzelsträngig, kann jedoch Regionen mit Doppelhelixstruktur durch Bildung von Haarnadelschleifen enthalten.
- Zellen enthalten mehrere RNA-Sorten.

Typ	Rel.Menge %	Sed.koeff.	Nucleotide
Ribosomale RNA (rRNA)	80	23 S	3 700
		16 S	1 700
		5 S	120
Transfer-RNA (tRNA)	15	4 S	75
Messenger-RNA (mRNA)	5		heterogen

RNA-Moleküle in E. coli

Kleine RNA-Moleküle in Eukaryonten-Zellen

RNA-Typ	Funktion
Small nuclear RNA (snRNA)	Spleißen von RNA-Exons
7S RNA	Bestandteil des Signalerkennungspartikels
Micro-RNA (miRNA)	Ca.21 Nucleotide, binden an mRNA und hemmen die Translation
Small interfering RNA (siRNA)	Erleichtern den Abbau von mRNA

RNA wird durch RNA-Polymerasen synthetisiert

- In E.coli wird die gesamte RNA von *einer* Polymerase synthetisiert, in Säugerzellen gibt es mehrere.
- RNA-Polymerase benötigt eine Matrize (doppelsträngige DNA).
- RNA-Polymerase benötigt ATP, UTP, CDP, GTP sowie zweiwertige Metallionen (Mg oder Mn).
- Die Synthese verläuft wie die DNA-Synthese in 5' → 3'-Richtung.

RNA-Polymerasen benötigen keinen Primer und besitzen keine Nuclease-Aktivität !

Transkription

Die mRNA ist das Gegenstück zur Basensequenz der DNA-Matrize:

5'-GCGGCGACGCGCAGUUAUCCACAGCCGCCAGUUCGCGGGCAUUUU-3' mRNA

3'-CGCCGCTGCGCGTCAATTAGGGTGTGGCGGTCAAGGCGACCGCCGTAAAA-5' Matrizenstrang der DNA

5'-GCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTT-3' codierender Strang der DNA

Codierender Strang = sense-Strang

Matrizenstrang = antisense-Strang

Die Transkription beginnt an Promotorstellen.....

Codierender Strang der DNA :

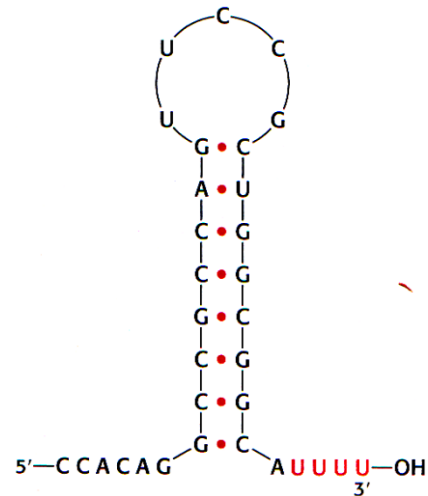
„upstream“ (stromaufwärts) ←

5' ~~~~~ ⁻³⁵ TTGACA ~~~~~ ⁻¹⁰ TATAAT ~~~~~ ⁺¹ Startpunkt

Prokaryotische Promotorstelle

...und endet an Terminatorstellen

Terminatorsequenzen codieren ein Terminationssignal, das in E.coli zur Synthese einer basengepaarten Haarnadelschleife führt, die zur Ablösung der mRNA von der RNA-Polymerase führt.



mRNA-Vorläufer von Eukaryonten werden während der Transkription verändert:

1. Am 5'-Triphosphatende wird ein „cap“ angebracht, das 7-Methylguanylat enthält . Caps tragen zur Stabilität der mRNAs bei (Schutz vor Phosphatasen und Nucleasen).
2. Polyadenylierung am 3'- Ende (bis zu 250 A - Reste).

Eukaryonten-Gene bestehen aus Introns (intervening sequences) und Exons (expressed sequences).

Introns sind nicht-codierende DNA-Sequenzen, die aus dem Primärtranskript der mRNA herausgeschnitten werden.

Splice-Enzyme (*splicing enzymes*) verknüpfen die Exons zur reifen mRNA.

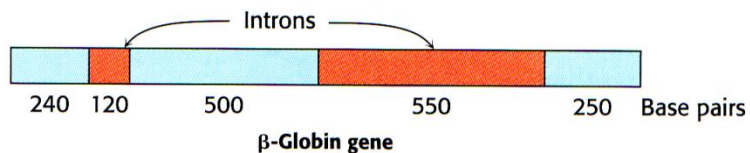
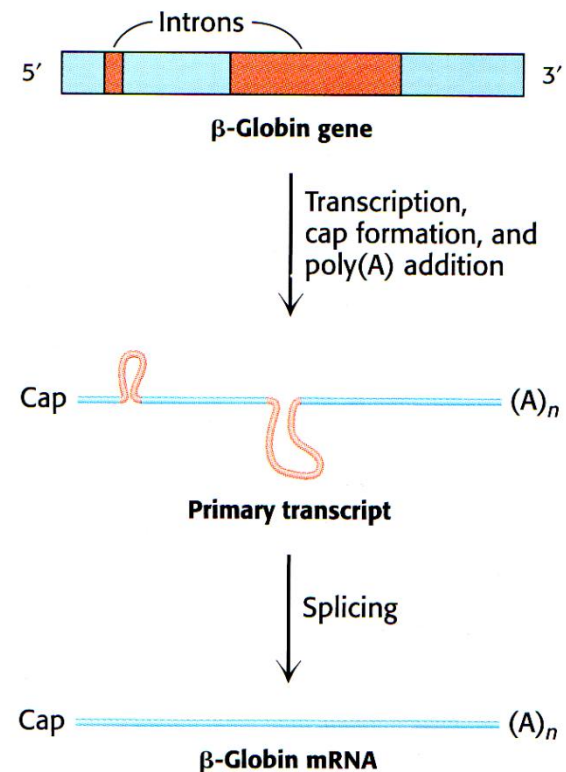


Figure 4.37 Structure of the β -globin gene.



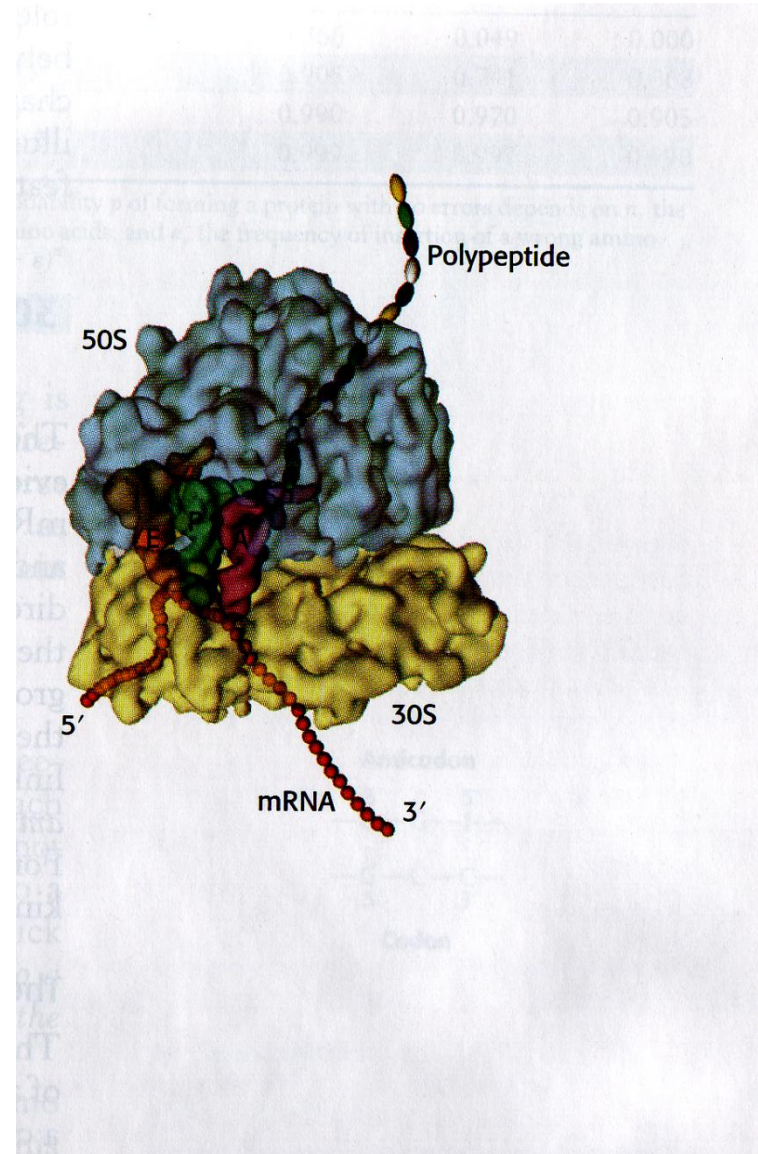
Translation (Proteinbiosynthese)

- Findet an Ribosomen statt
- Erfolgt vom Amino- zum Carboxylende
- Ist matrizenabhängig
- Die aktivierten Vorstufen sind Aminoacyl-tRNAs
- Läuft in 3 Stufen ab: Initiation, Elongation, Termination

Ribosomen sind hochkomplexe Molekülmaschinen mit einer Masse im Megadaltonbereich

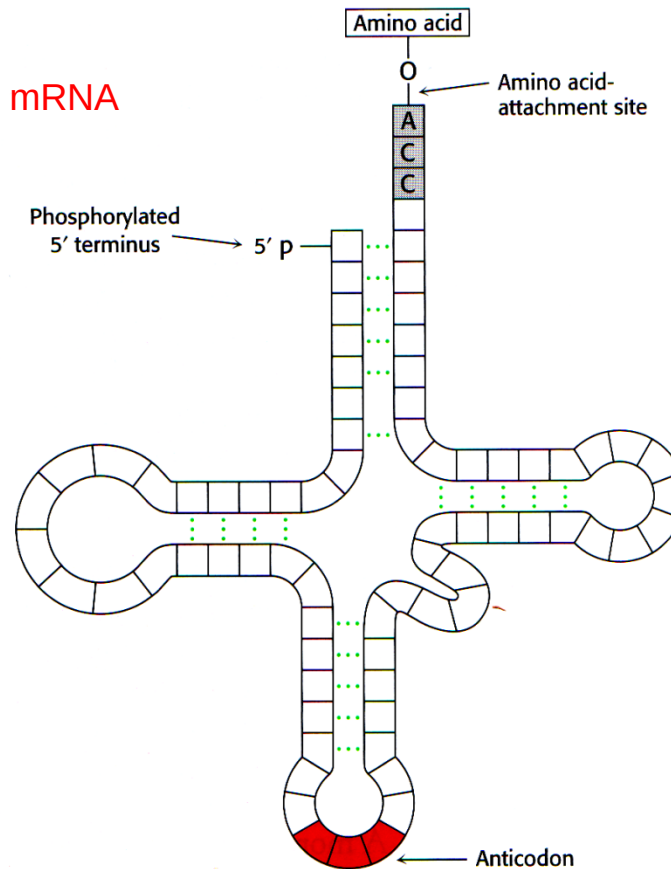
$\frac{2}{3}$ der Masse sind ribosomale RNA (rRNA)

E.coli-Ribosom



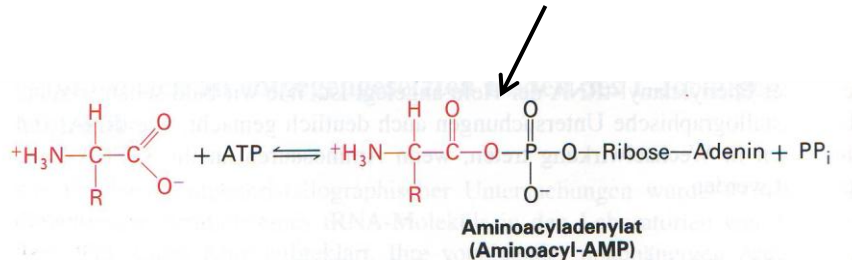
Transfer-RNAs (tRNAs) sind die Adapter-Moleküle der Translation

1. Aktivierung der AS für die thermodynamisch ungünstige Bildung der Peptidbindung
2. Nur tRNAs können die AS-Codons der mRNA erkennen



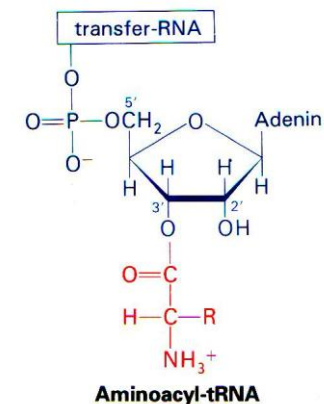
Synthese von Aminoacyl-tRNA durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

1. Bildung von Aminoacyladenylat



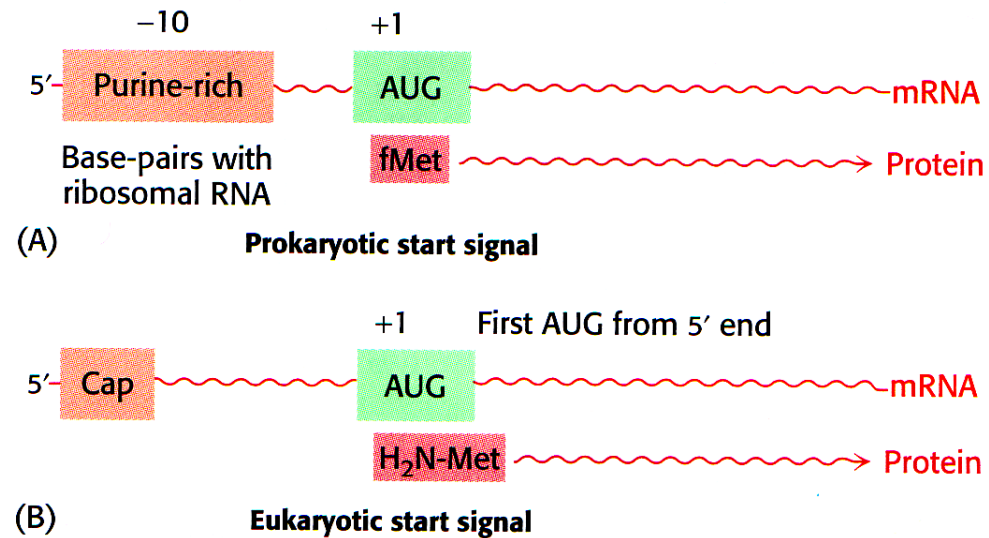
Pyrophosphat wird gespalten !

2. Übertragung der Aminoacylgruppe auf eine tRNA

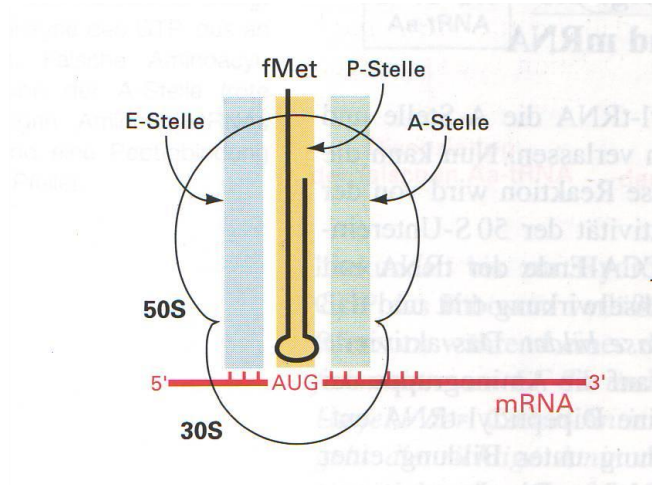


Wie beginnt die Translation....

mRNA enthält Start-Signale:



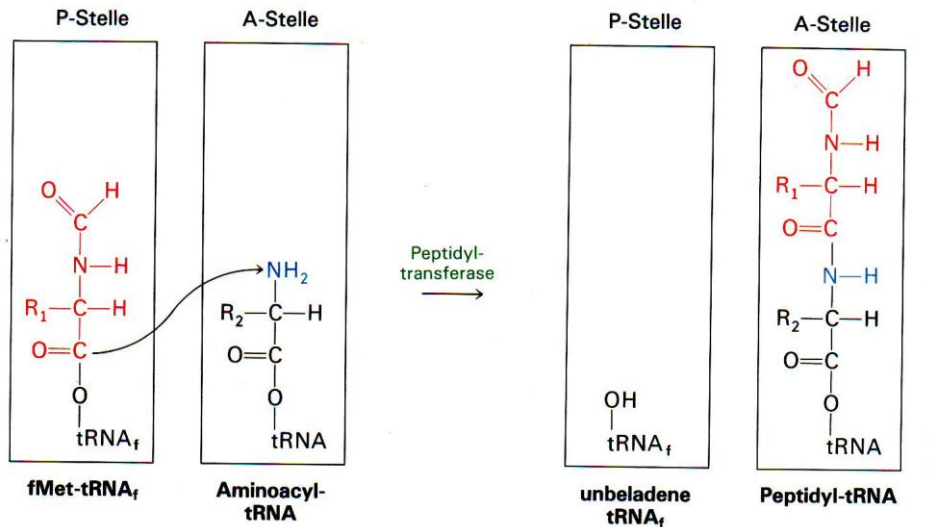
Elongationszyklus der Translation



A-Stelle = Aminoacylstelle

P-Stelle = Peptidylstelle

E-Stelle = Exitstelle



Nucleophiler Angriff der Aminogruppe der neueintretenden Aminoacyl-tRNA auf das C-Atom der f-Met-tRNA

...und wie wird die Translation beendet ?

mRNAs enthalten Terminationssignale (Stop-Codons), die aber nicht von tRNAs erkannt werden, sondern von Terminationsfaktoren (*releasing factors*), was dazu führt, dass Wasser anstelle einer Aminogruppe der Akzeptor des aktivierten Peptids wird - die Polypeptidkette verläßt das Ribosom.

Der genetische Code

Nirenberg, Khorana, Crick und Brenner 1961

- 3 Nucleotide codieren für eine Aminosäure.
- Der Code ist nicht-überlappend.
- Der Code hat keine Satzzeichen.
- Der genetische Code ist degeneriert (wobble-Hypothese).
- Der genetische Code ist fast, aber nicht absolut universell.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

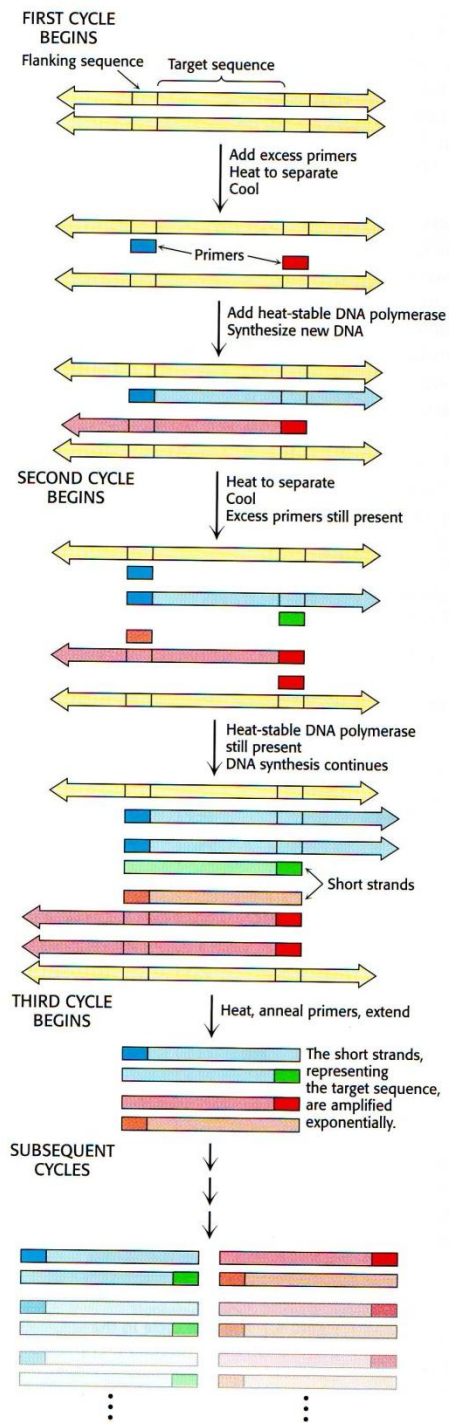
Kary Mullis 1984 :

Hohe Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen

- Medizinische Diagnostik (Bakterien Viren, Krebs)
- Forensik (in einer einzigen Haarwurzel ist genügend DNA für eine Typisierung)
- Molekulare Evolution

Prinzip der PCR

- die zu vermehrende Zielsequenz muß *nicht* zwangsläufig bekannt sein, man muß jedoch die flankierenden Sequenzen kennen
- zu den flankierenden Sequenzen passende Primer (ca. 20 Nucleotide) werden nach Strangtrennung hybridisiert
- eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert die Primer in Richtung der Zielsequenz; hierzu braucht man alle 4 Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)
- Eine PCR besteht aus Zyklen, die mehrfach hintereinander ablaufen
- Jeder Zyklus besteht aus 3 Einzelschritten: Strangtrennung durch Erhitzung auf 95 Grad, Hybridisierung der Primer bei 54 Grad, DNA-Synthese durch Verlängerung der Primer bei 72 Grad
- Die amplifizierte DNA wird durch Agarosegel-Elektrophorese und Anfärbung detektiert



Die Zielsequenz + flankierende Sequenzen ist nach n Zyklen 2^n - fach vermehrt

Anwendung in der Forensik:

Aus Blutspuren auf den Kleidungsstücken des Täters isolierte DNA

D = DNA des Täters

V = DNA des Opfers

