

	Nukleinsäuren I	S II
	Aufbau, Struktur und Eigenschaften der Nukleinsäuren	

Einführung

Als Einstieg könnten Schüler/innen mithilfe vorgefertigter Puzzle-Teile in Gruppenarbeit je ein Stück eines DNA-Moleküls aufbauen. Die Schüler/innen sind hierbei in einer ähnlichen Situation wie vor fünfzig Jahren JAMES WATSON und FRANCIS CRICK, die selbst keine experimentellen Arbeiten durchführten, sondern die Forschungsergebnisse anderer Wissenschaftler (hier die vorgefertigten Puzzle-Teile) zu einer DNA-Struktur zusammenfügten.

Für die Gruppenarbeit erhält jede Gruppe aus einem DNA-Modellbaukasten eine andere Kombination von Puzzle-Teilen. Jede Gruppe muss alle Puzzle-Teile verbauen.

Materialien: Arbeitsblatt: Auf den Spuren von WATSON und CRICK, Anlage 1
Puzzle-Teile aus DNA-Modellbaukasten, Anlagen 2 und 3

Auf die Ergebnisse der Arbeit mit dem DNA-Modell-Kit (DNA-Modelle der verschiedenen Gruppen, Arbeitsblatt) kann im weiteren Verlauf der Unterrichtseinheit immer wieder Bezug genommen werden.

- Aufbau wie eine Strickleiter
- Holmen: Zucker-Phosphat-Zucker-Phosphat-Zucker-Phosphat-.....
Man spricht auch von einem Zucker-Phosphat-*Rückgrat*.
- Sprossen: 2 Basen, die über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind.
- Namen der DNA-Bausteine
Hinweis zu Arbeitsblatt / 9.: Englische Schreibweise in deutsche Schreibweise ändern! Bsp.: Deoxyribose (engl.) → Desoxyribose (deutsch).

Um Herkunft, Bau und Funktion von DNA bzw. von DNA-Molekülen zu veranschaulichen, können z.B. folgende Medien eingesetzt werden:

→ CD: Kurzer Ausschnitt mit Ton (Schritt 1/18, Einführung in die Genetik: Zelle → Zellkern → DNA), Roche Genetics Lernprogramm Genetik [8]

oder

→ Abb.: Zelle mit Zellkern, Chromosomen, DNA, etc.

→ Abb.: DNA-Doppelhelix [1], Anlage 4

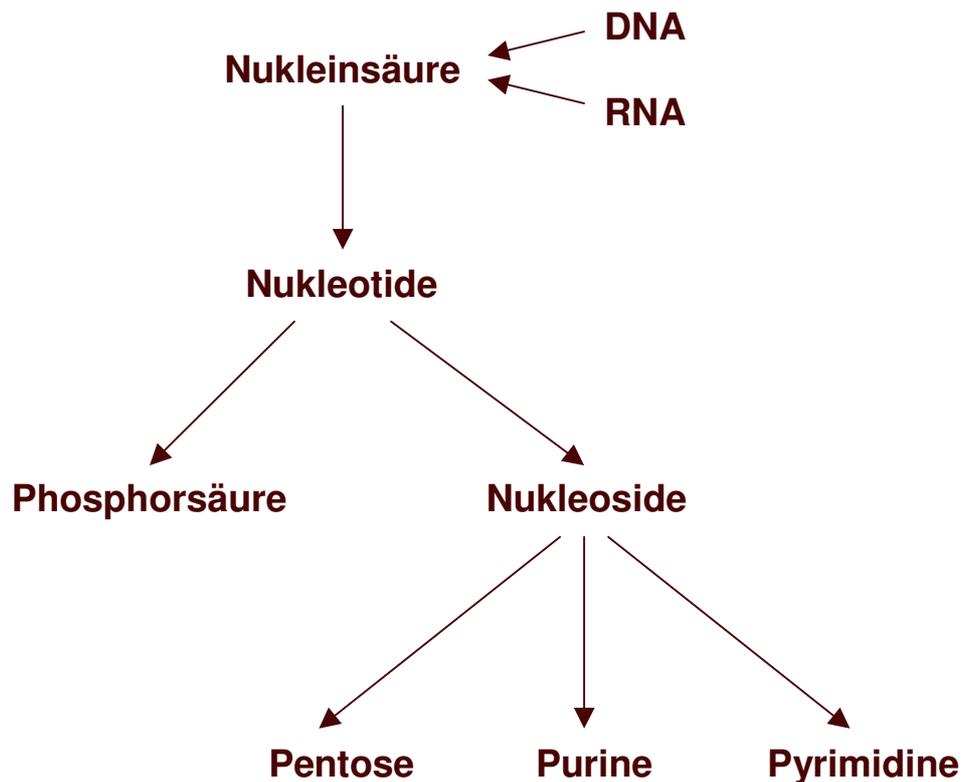
→ DNA-Tischmodell

Nukleinsäuren bestehen wie andere Naturstoffgruppen aus Makromolekülen. Ihre Größe reicht von $M \approx 2,5 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (t-RNA) bis $M \approx 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Säuger-DNA). Damit ist die DNA von Säugern um mehr als drei Zehnerpotenzen größer als die größten Proteine.

Makromoleküle sind aus monomeren Bausteinen aufgebaut,

- Polysaccharide aus Monosaccharid-Einheiten
Bsp.: Stärke aus α -D-Glucose-Einheiten
- Proteine aus Aminosäure-Einheiten
- Nucleinsäuren aus Nucleotid-Einheiten

Durch saure Hydrolyse kann man die Nucleinsäuren in Nucleotide zerlegen. Durch weitere hydrolytische Spaltung erhält man Nucleoside, Phosphorsäure, organische Basen und Pentosen.



Was ist ein Nucleotid?

- Phosphat-Zucker-Base

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Merke: **Nucleinsäuren sind Polymere aus Nucleotiden, die über Phosphorsäurediesterbindungen miteinander verknüpft sind (= Polynucleotide).**

Vergleiche PE, PP, Polyester

Nukleotide und ihre Bausteine

a) Organische Basen:

→ Abb.: Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren, Anlage 6

Am Aufbau der DNA sind vier Basen beteiligt:

- Die *Purin*-Derivate Adenin (A) und Guanin (G) und
- die *Pyrimidin*-Derivate Cytosin (C) und Thymin (T).

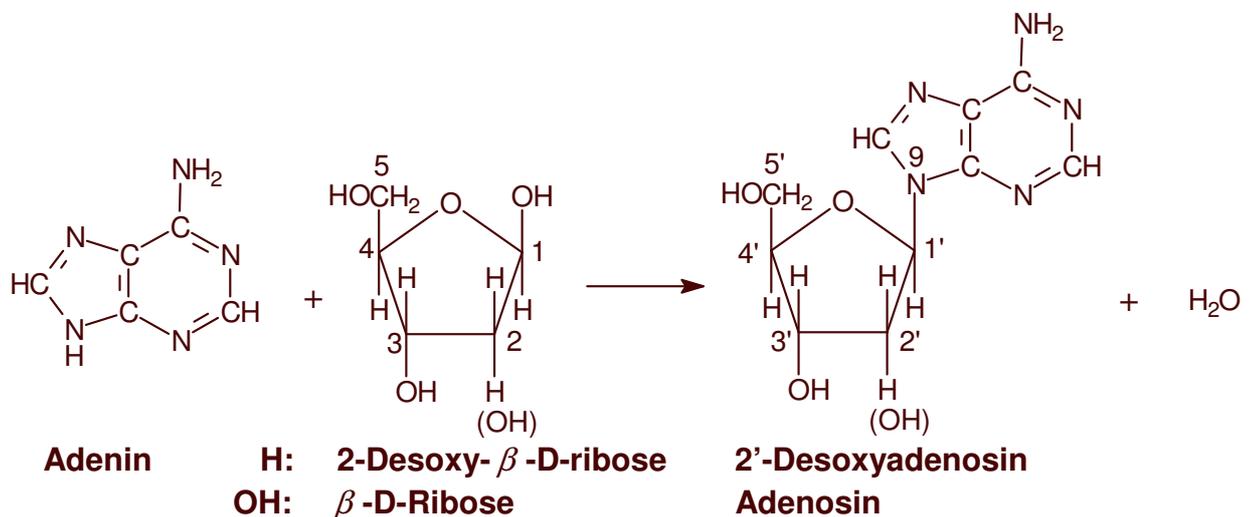
Die RNA enthält Uracil (U) anstelle von Thymin.

Die Purinbasen sind planar und hydrophob.

Alle Basen sind unter physiologischen Bedingungen, $5 < \text{pH} < 9$, ungeladen .

b) Zucker (Pentose):

→ Abb.: Nukleosidbildung



Organische Base + Zucker → Nukleosid + Wasser

Je nach Zuckertyp in den Nukleotiden unterscheidet man zwischen den beiden Nukleinsäureklassen:

- **Ribonukleinsäuren (RNS, RNA)**
- **Desoxyribonukleinsäuren (DNS, DNA)**

RNA enthält den Zucker β-D-Ribose, DNA 2-Desoxy-β-D-ribose.

Zur Unterscheidung der Atome im Basen- und im Zuckeranteil kennzeichnet man bei der Nummerierung letztere mit einem Strich. Man spricht daher z.B. von einer 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe (2-Strich-, 3-Strich-.....).

Die 2'-OH-Gruppe der Ribose-Einheit ist für die chemische Reaktivität der RNA verantwortlich.

In den Nukleosidmolekülen ist jeweils ein Ringstickstoffatom der Basen mit dem C-1'-Atom der Zuckereinheit verbunden. Im Fall der Pyrimidinbasen ist die

Verknüpfungsstelle die Position N-1, bei den Purinbasen die Position N-9. Es handelt sich um β -glycosidische oder N-glycosidische Bindungen.

→ Abb.: Nomenklatur der Nucleoside

DNA	RNA	
<u>Desoxy-adenosin</u> = 2'-Desoxy-9-(β -D-Ribofuranosyl)-adenin	<u>Adenosin</u> = 9-(β -D-Ribofuranosyl)-adenin	Purin-Basen
<u>Desoxy-guanosin</u> = 2'-Desoxy-9-(β -D-Ribofuranosyl)-guanin	<u>Guanosin</u> = 9-(β -D-Ribofuranosyl)-cytosin	
<u>Desoxy-cytidin</u> = 2'-Desoxy-1-(β -D-Ribofuranosyl)-cytosin	<u>Cytidin</u> = 1-(β -D-Ribofuranosyl)-cytosin	Pyrimidin-Basen
<u>Desoxy-thymidin</u> = 2'-Desoxy-1-(β -D-Ribofuranosyl)-thymin		
	<u>Uridin</u> = 1-(β -D-Ribofuranosyl)-uracil	

c) **Phosphate:**

Nucleosid + Phosphat → Nucleotid + Wasser

Bei den Nucleotiden handelt es sich um eine Stoffklasse, bei der jeweils die Zuckereinheit des Nucleosids mit Phosphorsäure verestert ist.

→ Abb.: Nucleotidbildung (dAMP, AMP, Nucleosid-5'-monophosphate), Anlage 7

Bei den Nucleotid-Bausteinen der Nucleinsäuren ist immer die 5'-OH-Gruppe der Zucker-Einheit mit einer Phosphorsäure-Einheit verestert.

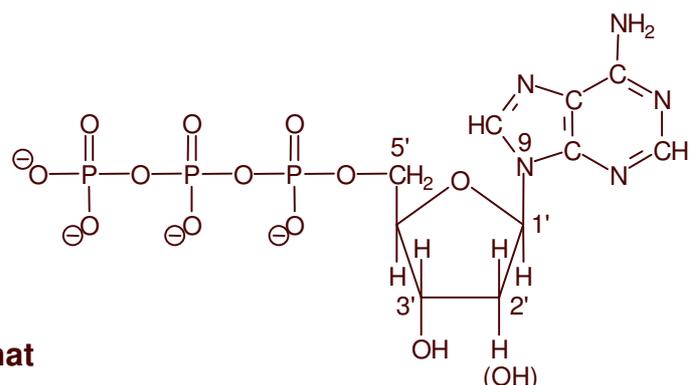
- **Nucleosid-5'-monophosphate sind die Nucleotid-Bausteine der Nucleinsäuren.**

Als Ausgangsstoffe für die DNA-Synthese dienen die energiereichen Nucleosid-5'-triphosphate (Triester), z.B. Desoxyadenosin-5-triphosphat (5'-dATP), siehe Abb.!

H: dATP

OH: ATP

Adenosin-5'-triphosphat



Die Phosphat-Gruppe verliert bei pH = 1 das erste Proton und im Falle eines Monoesters bei pH = 7 das zweite Proton.

Von Nukleotiden zu Nukleinsäuren, Anlage 8

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Biochemisch gilt: Nukleosid-5'-triphosphat → Polynukleotid + Pyrophosphat
(Nukleotid) (Nukleinsäure)

Bsp.: $x \cdot \text{dATP} + x \cdot \text{dTTP} + y \cdot \text{dGTP} + y \cdot \text{dCTP} \rightarrow \text{DNA} + 2(x + y) \text{ PP}$

bzw.

$x \cdot \text{ATP} + x \cdot \text{UTP} + y \cdot \text{GTP} + y \cdot \text{CTP} \rightarrow \text{RNA} + 2(x + y) \text{ PP}$

Im Nukleinsäuremolekül sind die einzelnen Nucleoside perlschnurartig aufgereiht. Die Zucker-Einheiten sind dabei zweifach verestert, am 5'- und am 3'-C-Atom. Jedes Phosphorsäurediester-Bindeglied trägt eine negative Ladung. DNA- und RNA-Moleküle sind daher Polyanionen.

CHARGAFF'sche Regel: In der DNA treten Adenin und Thymin einerseits und Guanin und Cytosin andererseits immer in gleicher Häufigkeit auf (1949 nachgewiesen von ERWIN CHARGAFF, österreichischer Chemiker).

Beispiel: Die untersuchte DNA enthält 20 % Adenin. Daraus folgt für die übrige Basenzusammensetzung: 20 % Thymin, 30 % Guanin, 30 % Cytosin.
(→ komplementäre Basenpaarung)

Innerhalb der DNA werden die Nucleotide miteinander zu langen Ketten verknüpft. Die Polynucleotidkette wächst (während der Synthese) vom 5'- zum 3'-Ende. So geschrieben ist die Reihenfolge der Nucleotide *kolinear* zur Reihenfolge der Aminosäuren in einem Protein (vom N- zum C-terminalen Ende).

→ Folie: FCI Nr. 20/4 Der genetische Code: Alphabet des Lebens [9]

Die Reihenfolge der Nucleotide in einem Nucleinsäuremolekül nennt man *Nucleotidsequenz*. Sie mag auf den ersten Blick willkürlich erscheinen, doch wissen wir, dass in ihr - ähnlich einem Strichcode von Supermarktartikeln - genetische Informationen gespeichert sind. Ein *Gen* ist ein bestimmter DNA-Abschnitt mit einer spezifischen Nucleotidsequenz, in der die Information für ein ganz bestimmtes Zellprotein verschlüsselt ist. Zur Charakterisierung einer bestimmten DNA wird anstelle der Nucleotidsequenz die *Basensequenz*, eine Buchstabenfolge aus den Anfangsbuchstaben der Basen A, T, C und G (RNA: U statt T) angegeben.

Jede menschliche Zelle enthält 3,9 Milliarden DNA-Basen, das entspricht einer DNA-Gesamtlänge von 990 mm (≈ 1 m). Die Länge eines DNA-Moleküls oder eines DNA-Abschnittes wird nicht in mm, sondern in Basenpaaren angegeben.
Beispiele: Phage T7: 39936 Basenpaare (bp) $\approx 39,9$ kbp (kilo = 10^3),
Escherichia coli: Ca. 4 000 000 bp = 4 Mbp (Mega = 10^6),
Mensch: 3900 Mbp oder 3,9 Gbp (Giga = 10^9).

Inzwischen wissen wir, dass unsere Zellen nicht 100 000 Gene (wie vor dem Human-Genom-Projekt erwartet), sondern etwa 30 000 Gene besitzen. Diese 30 000 Gene sorgen dafür, dass wir Menschen so aussehen wie Menschen. Rund 97 % des menschlichen Genoms beinhalten sogenannte „Junk-DNA“, Informationsmüll, von dem die Forscher heute noch nicht wissen, welchem Zweck er dient.

Die DNA-Doppelhelix (Sekundärstruktur)

→ Abb.: DNA-Einzelstränge, Anlagen 9 und 10

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Lagern sich zwei DNA-Einzelstränge zu einem Doppelstrang zusammen, muss die Coulomb-Abstoßung zwischen den Polyanionen (Zucker-Phosphat-Ketten) überwunden werden. Es werden daher Metallionen benötigt, die mit ihrer positiven Ladung die negativen Ladungen jedes DNA-Einzelstranges kompensieren. Für Experimente mit Nukleinsäuren ist die Anwesenheit von Salzen im Puffer eine sehr kritische Variable. In der Regel arbeitet man in einem Puffer bei pH = 7 und einer NaCl-Konzentration von 150 mmol/L. Mehr Salz führt zu stabileren Doppelsträngen. Weniger Salz destabilisiert.

Zwei Einzelstränge lagern sich in antiparalleler Ausrichtung zusammen und bilden einen *antiparallelen DNA-Doppelstrang*. Die Zuckerphosphate liegen außen und bilden die „Holmen“ der Leiter (oder das Rückgrat). Somit bildet die Peripherie der Doppelhelix eine *hydrophile* Hülle. Die Basen zeigen nach innen und bilden die „Sprossen“ der Leiter. Somit ist das Innere der DNA *hydrophob*.

Wenn sich die beiden Einzelstränge um eine *zentrale Helixachse* winden, erhält man die ideale DNA-Konformation, sie wird auch B-Konformation oder kurz B-Helix genannt .

→ Abb.: B-DNA, Anlage 11 oder DNA-Tischmodell

Die Ringebenen der Basen sind, vergleichbar mit den Stufen einer Wendeltreppe, senkrecht zur Helixachse ausgerichtet. Es liegen immer zwei Basen gegenüber, welche durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Eine Purin-Base bildet immer mit einer Pyrimidin-Base ein Basenpaar und umgekehrt. Man spricht von einer *komplementären Basenpaarung*.

→ siehe DNA-Modelle (der Gruppenarbeit)

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Alle derartigen Basenkombinationen passen in den gleichen Rahmen, der durch den Abstand der Zucker-Phosphat-Ketten in der Doppelhelix vorgegeben ist. Zwei sich gegenüberliegende Purin-Ringe würden in einer Doppelhelix zuviel Platz beanspruchen, dagegen würden zwei gegenüberliegende Pyrimidin-Ringe den Raum nicht ausfüllen können.

Der Fünfring der Desoxyribose liegt aus sterischen Gründen nicht planar vor, sondern in einer Briefumschlagsform. Hierbei wird ein Ringatom aus der Ebene herausgedreht. Die Ebenen der Fünfringe stehen dabei senkrecht zu den Ebenen der Basen-Ringe.

Welche Kräfte stabilisieren die DNA-Doppelhelix?

a) Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen:

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2],
Anlage 5

Die Anzahl der Wasserstoffbrücken bestimmt unter anderem die Stabilität der Doppelhelix. H-Brücken bilden sich zwischen positiv polarisierten H-Atomen von NH- und NH₂-Gruppen und nichtbindenden Elektronenpaaren von Carbonylgruppen (C=O) bzw. N-Atomen der Basen (Heterozyklen). Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung setzt voraus, dass sich die entsprechenden Atome bzw. Atomgruppen auf eine Distanz von 280 – 300 pm annähern.

Da Wasserstoffbrückenbindungen nicht sehr stark sind, etwa 6-10 kJ·mol⁻¹, tragen sie nicht sonderlich viel zur Triebkraft der Doppelstrangbildung bei.

Unterschiede in der Stabilität von DNA-Doppelhelices vergleichbarer Kettenlänge entstehen dadurch, dass die Basenpaare unterschiedliche Anzahlen von H-Brücken ausbilden:

⇒ G≡C: Drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin.

⇒ A=T: Nur zwei Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin.

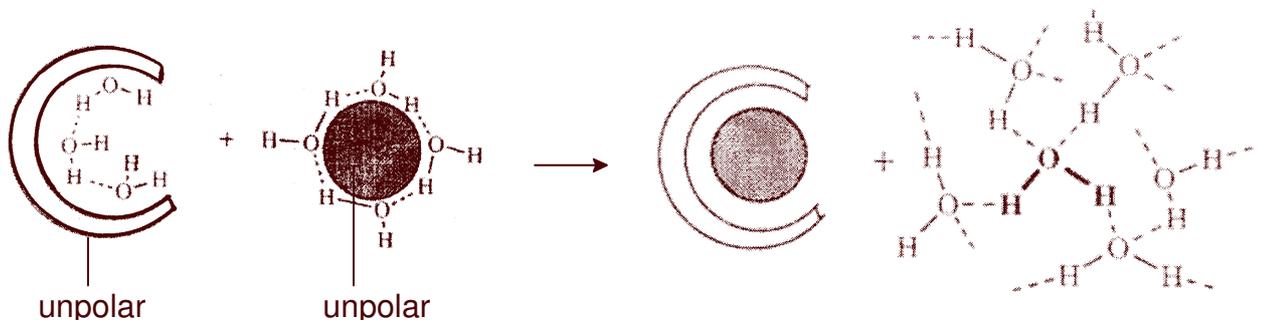
Dies hat zur Folge, dass die Stabilität einer Doppelhelix mit höherem Anteil von G≡C-Paarungen zunimmt.

b) Van-der-Waal's-Kräfte zwischen den komplementären Basen (hydrophobe Bindung):

Den größten Einfluss auf die Stabilität der Doppelhelix haben die Van-der-Waal's-Kräfte, die zwischen den relativ nah übereinander liegenden Basen wirken. Ihr Abstand beträgt etwa 260-340 pm. Jedes Basenpaar ist im Vergleich zum Nachbar-Basenpaar um ca. 36° um die Helixachse gedreht, so dass etwa 10 Basenpaare eine vollständige Umdrehung von 360° ergeben.

Die Paarung der hydrophoben Basen wird in wässriger Phase energetisch begünstigt:

→ Abb.: Wechselwirkung zweier unpolarer Moleküle im Wasser [1]



Die Wassermoleküle an der Oberfläche hydrophober Moleküle sind nicht durch vier H-Brücken abgesättigt. Werden die Wassermoleküle durch Assoziation zweier unpolarer Moleküle freigesetzt, so können sie alle vier H-Brücken ausbilden. Der damit verbundene Enthalpiegewinn ist gerade bei Wasser sehr groß.

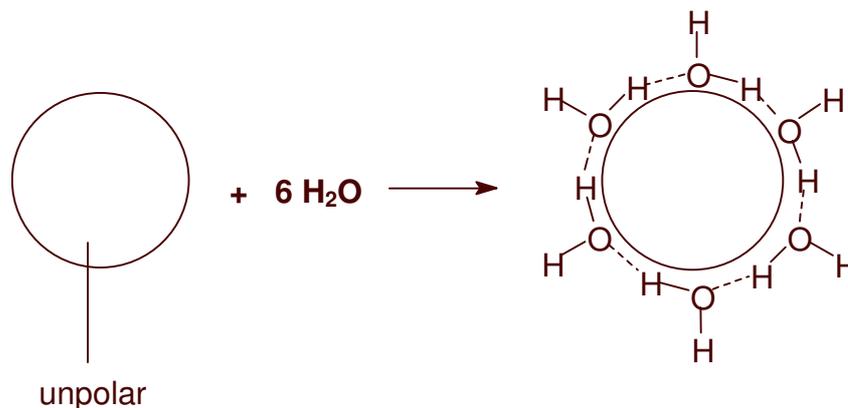
c) Wasserstoffbrückenbindungen im äußeren und inneren Hydroskelett:

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2],
Anlage 5

Computersimulationen [4] zeigten, dass die DNA-Doppelhelix im Vakuum aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen auseinanderbricht. In Gegenwart von Wassermolekülen ist die DNA-Doppelhelix dagegen stabil. So erweist sich Wasser geradezu als integraler Bestandteil der DNA. Das DNA-Molekül enthält sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche. Dabei zeigt sich bezüglich der Ausbildung der räumlichen Struktur von Biomolekülen in Wasser folgendes Grundprinzip:

- Hydrophile Bereiche sind an der Oberfläche von Biomolekülen. Bei der DNA bilden sowohl die negativ geladenen Phosphat-Gruppen als auch die Desoxyribose-Einheiten Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen aus → *äußeres Hydroskelett* der DNA-Doppelhelix.
- Hydrophobe Bereiche sind im Innern von Biomolekülen. Auch im Innern der DNA-Doppelhelix befinden sich Wassermoleküle! Dort ordnen sich die H₂O-Moleküle um die Basen-Oberflächen herum an. Genauer: Das Wasser nimmt um die hydrophobe Oberfläche eine quasi-kristalline Struktur ein.

→ Abb.: Hydrophober Effekt



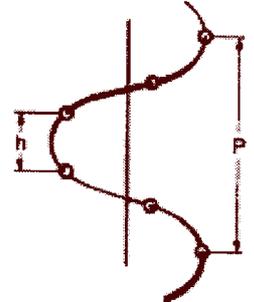
Die treibende Kraft ist die Maximierung der Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen. Es entsteht eine Art Korsett um die komplementären Basen-Bereiche herum → *inneres Hydroskelett* der DNA-Doppelhelix.

Helicale Parameter der Doppelhelices:

- Abb.: B-DNA mit kleiner und großer Furche [1], Anlage 11
- Abb.: A-DNA [1], Anlage 12
- Tabelle: Helicale Parameter der Doppelhelices [1], siehe unten.

Die Sekundärstruktur der Doppelhelix wird im Wesentlichen von drei Parametern charakterisiert [1]:

- **P** = Ganghöhe. Das ist der Abstand auf der Helixachse, der nach 360° Umlauf zurückgelegt wird.
- **N** = Zahl der Nukleotide innerhalb einer 360°-Drehung um die Helixachse.
- **h** = Höhendifferenz zwischen zwei Basen.



Die Tabelle fasst die wichtigsten Parameter der A- und B-Helix zusammen:

Doppelhelix-Typ	A-DNA	B-DNA
Helix-Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig
P	0,59 nm	0,70 nm
N	11 Nukleotide	10 Nukleotide
h	0,256 nm	0,338 nm
Rotation pro Nukleotid	32,7°	36°
Furchenweite:		
• kleine Furche	0,27 nm	0,57 nm
• große Furche	1,10 nm	1,17 nm
Furchentiefe		
• kleine Furche	0,28 nm	0,75 nm
• große Furche	1,35 nm	0,85 nm

Die B-DNA existiert bei niedrigen Salzkonzentrationen und hoher Feuchtigkeit. Sie ist die natürliche Konformation der DNA in Zellen.

Da sich die Basen um die Helixachse winden, entstehen bei der B-DNA *kleine, schmale Furchen* (minor grooves) und *große, weite Furchen* (major grooves). Beide Furchentypen sind etwa gleich tief. Die weiten Furchen differieren allerdings sehr stark. Beide Furchen stehen damit für molekulare Erkennungen zur Verfügung.

In der kleinen Furche binden vor allem kleine Moleküle wie z. B. Wassermoleküle, Metall-Ionen oder Antitumor-Wirkstoffe.

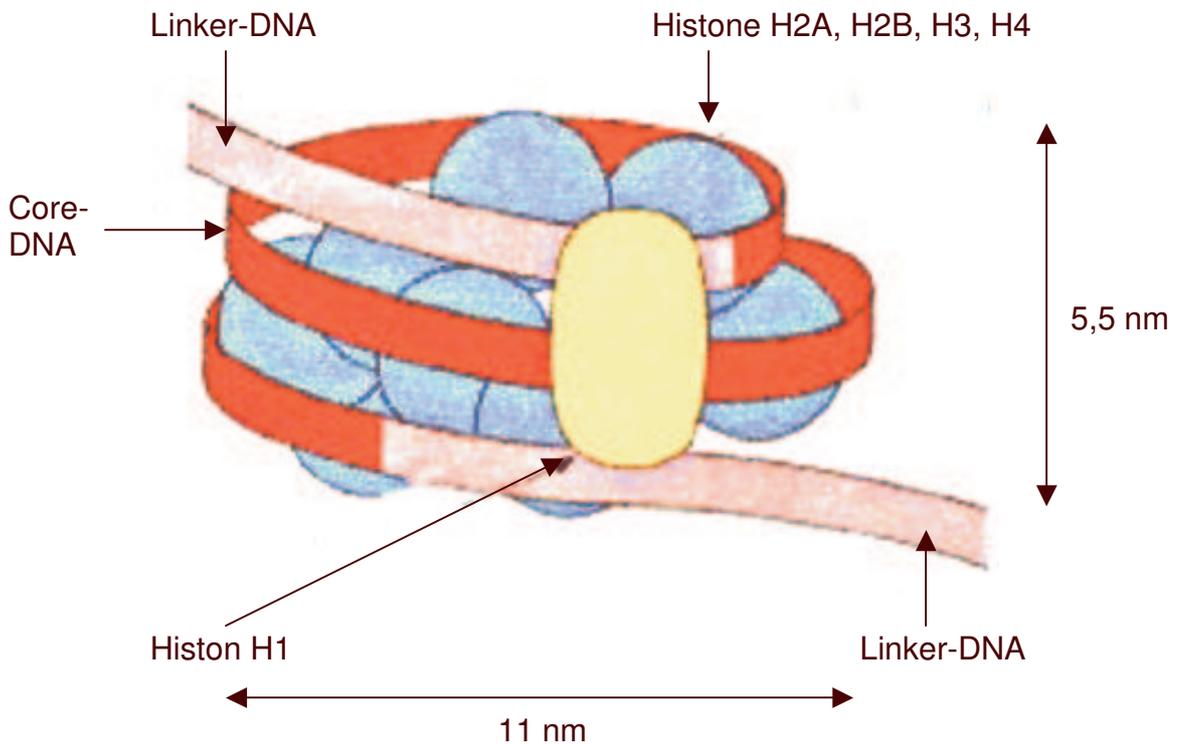
Die große Furche ist der Ankerpunkt für Proteine, die an der Genregulation oder der DNA-Reparatur beteiligt sind.

3D-Animation der DNA-Struktur:

Hier oder an anderen Stellen des Unterrichts können die verschiedenen Aspekte der DNA-Struktur mithilfe eines 3D-Molekülprogrammes veranschaulicht werden. [11,12,13]

DNA-Doppelhelix in der Zelle:

→ Abb.: Histon-Octamer = Nucleosom [1]



In der Zelle ist das DNA-Molekül verpackt. Der Doppelstrang wickelt sich dabei um ein Histon-Octamer. Das Histon-Octamer nennt man auch Coreparticle oder Nucleosom.

→ Abb.: Feinstruktur einer Chromatide [5]

Zwei Coreparticles bzw. Nucleosomen sind über eine Linker-DNA miteinander verknüpft. An dieser Linker-DNA sitzt ein Histon H1, das stabilisierend wirkt. Diese sehr dichte Histon-Verpackung ermöglicht es Organismen ihre DNA im Zellkern abzulegen. Hierbei werden Histone eng aneinander gepackt. Diese dicht gepackte Struktur nennt man *Chromatin* bzw. *Chromatide*.

Vor jeder Zellteilung besteht jedes *Chromosom* aus 2 Chromatiden, unmittelbar nach einer Zellteilung bestehen die Chromosomen nur aus jeweils einer Chromatide. Die DNA-Doppelhelix jeder Chromatide enthält etwa 100 Millionen Basenpaare (100 Mbp) und weist 10 Millionen Windungen auf.

Chemische Ursachen von Genmutationen

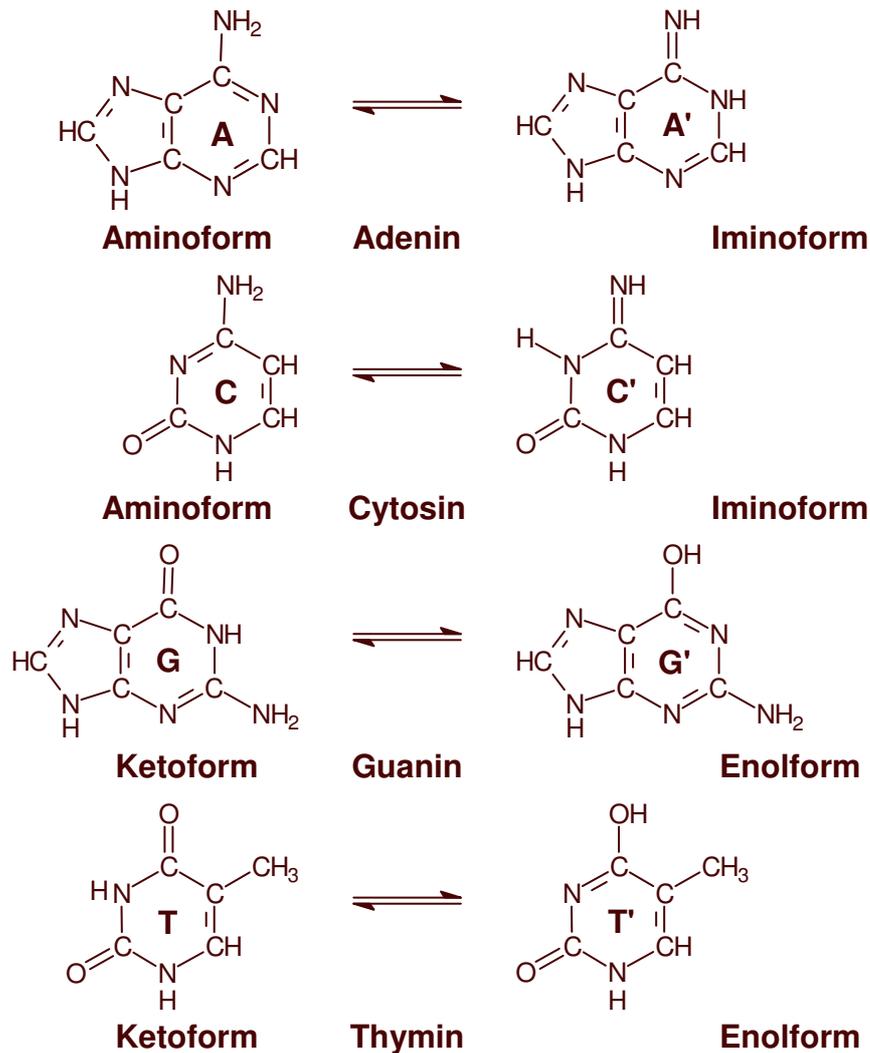
→ Folie: FCI Nr. 20/04: Der genetische Code: Alphabet des Lebens [9]

- Kurzinformation: Basensequenz der DNA → ... → Aminosäuren-Sequenz eines Proteins

Was wäre, wenn sich eine Base der DNA verändern würde?

- veränderte genetische Information
- andere Aminosäuren-Sequenz
- anderes Protein

a) Tautomere Formen der Basen:



Tautomere sind Strukturisomere, die sich im Gleichgewicht befinden. Der Unterschied in den Strukturen kommt durch die intramolekulare Verschiebung eines Protons zustande. Das Gleichgewicht liegt zwar stark auf der Seite der Amino- bzw. der Ketoform, jedoch liegt ein kleiner Teil der Basen in der Imino- bzw. Enolform vor.

Was passiert, wenn in einem DNA-Molekül eine Base spontan die seltene tautomere Form annimmt?

→ Folie: Schemat. Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5
 → Folienstücke mit seltenen tautomeren Basenformen

Mithilfe der oben genannten Folie und den Folienstücken kann veranschaulicht werden, dass seltene tautomere Basenformen andere Basenpaarungen und somit Genmutationen verursachen, weil nicht mehr die ursprünglichen Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können. Siehe Tabelle!

Normale Form	Seltene tautomere Form
A (Amino) paart mit T	A (Imino) paart mit C
C (Amino) paart mit G	C (Imino) paart mit A
G (Keto) paart mit C	G (Enol) paart mit T
T (Keto) paart mit A	T (Enol) paart mit G

Tabelle aus: Chemie der Nukleinsäuren [3]

b) **Spontane Desaminierung einer Base:** [6]

Durch spontane Hydrolyse wird von der DNA-Base Ammoniak abgespalten, so kann aus z.B. Cytosin Uracil entstehen. Dies kann ernste Schäden der DNA in der betroffenen Zelle bewirken.

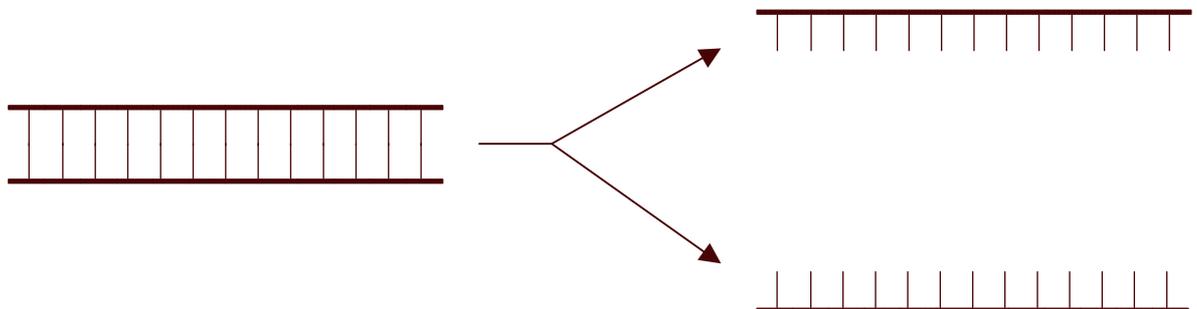
c) **Spontane Abspaltung einer Base in der DNA-Doppelhelix:** [6]

Durch spontane Hydrolysen können innerhalb einer DNA-Doppelhelix ganze Basen abgespalten werden. Dies hat eine veränderte Basensequenz und damit eine veränderte genetische Information zur Folge.

Denaturierung (Schmelzen) von DNA

Wird eine wässrige Lösung von DNA auf 100 °C erhitzt oder ihr pH-Wert auf ≥ 13 erhöht, so werden die H-Brückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren gespalten und die Doppelhelix geht in ein ungeordnetes Knäuel von einsträngiger DNA über. Man nennt diesen Vorgang auch

- **Denaturierung** oder
- **Schmelzen** der DNA.



Am einfachsten kann man den Vorgang durch Messung der Absorption von UV-Licht ($\lambda = 260 \text{ nm}$) verfolgen. Einzelsträngige DNA absorbiert bei dieser Wellenlänge um den Faktor 1,4-mal (oder 40 %) besser als doppelsträngige. Die UV-Absorption ist auf die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA-Einzelstränge zurückzuführen.

→ Abb.: Absorptionszunahme bei Temperaturerhöhung beim Schmelzen von DNA verschiedener Herkunft [7]

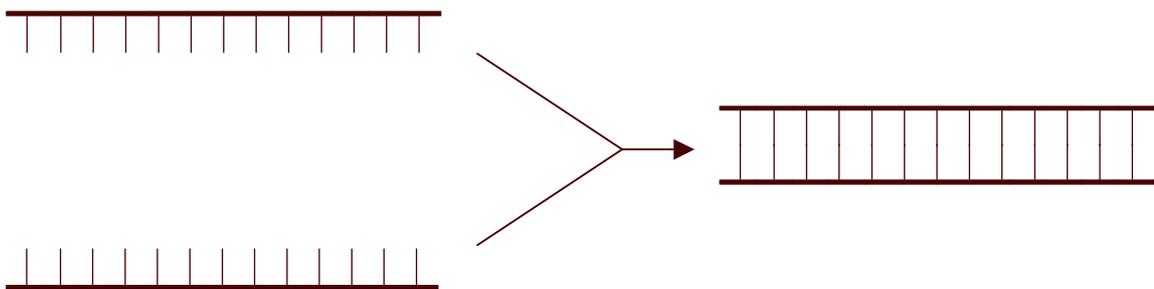
Die Lage der Schmelzkurven hängt vom Lösungsmittel ab: Bei niedriger Salzkonzentration, erhöhtem pH-Wert und Anwesenheit organischer Lösungsmittel verschieben sich die Schmelzpunktkurven nach links.

Schmelzpunkt T_m : Diejenige Temperatur, bei der die Hälfte der untersuchten DNA einzelsträngig vorliegt.

Die Stabilität einer DNA ist eine direkte Folge des prozentualen Anteils der GC-Nukleotidpaare, die drei H-Brücken ausbilden. Je größer der Stoffmengenanteil an GC-Paaren in einer DNA, desto höher liegt ihr Schmelzpunkt.

→ Abb.: Abhängigkeit des mittleren Schmelzpunktes vom GC-Gehalt einer DNA [7]

Renaturierung von DNA



Unter geeigneten Bedingungen lassen sich denaturierte (geschmolzene) DNA-Abschnitte wieder in die doppelsträngige Form überführen. Diesen Vorgang nennt man Renaturierung. Die Geschwindigkeit dieses Vorganges ist von verschiedenen Bedingungen abhängig:

- Von der Konzentration der DNA in Lösung
- Von der Konzentration an Kationen, welche negative Ladungen der Polyphosphatanionen neutralisieren
- Von der Temperatur (die günstigste liegt ca. 25 K unter dem T_m)
- Von der Größe der DNA

Hybridisierung von DNA :

Wenn einzelsträngige Nukleinsäuren verschiedenen Ursprungs miteinander doppelsträngige Nukleinsäuren bilden, spricht man von Hybridisierung.

Beispiel: Doppelsträngige Mischformen durch Kombination von RNA mit DNA oder DNA mit strukturell verwandter DNA.

Das Prinzip der Hybridisierung besteht darin, zwei Präparationen einzelsträngiger Nukleinsäuren zu mischen und dann den entstandenen doppelsträngigen Anteil zu bestimmen.

Nachweismethoden von Nukleinsäuren (wissenschaftlich)

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Die Nachweismethoden von Nukleinsäuren beruhen hauptsächlich auf der quantitativen Bestimmung der einzelnen Bausteine:

- Bestimmung der Pentose
- Bestimmung der Phosphorsäure
- Messung der Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen
Bsp.: Nach der sauren Hydrolyse von DNA kann der blaue Farbkomplex aus Purinnukleotid und Diphenylamin (Dische-Reagenz) fotometrisch bei $\lambda = 598 \text{ nm}$ bestimmt werden.
Vorsicht: Diphenylamin ist giftig, umweltgefährlich und möglicherweise karzinogen!
- **Anfärben von DNA:**
 - Ethidiumbromid: Üblicher Fluoreszenzfarbstoff der Molekularbiologie, **sehr giftig, reizend, fortpflanzungsgefährdend.**
 - Sybr Green I: **giftig, reizend, fortpflanzungsgefährdend** (deutlich weniger toxisch und weniger mutagen als Ethidiumbromid).
 - Acridinorange: **Gesundheitsschädlich, fortpflanzungsgefährdend.**
 - Acriflavinhydrochlorid: **Gesundheitsschädlich, reizend, umweltgefährlich.**
 - Toluidinblau: Keine Gefährlichkeitsmerkmale.
 - Azur B-chlorid: Keine Gefährlichkeitsmerkmale.
 - Metylenblau: **Gesundheitsschädlich, umweltgefährlich.**

Die genannten Farbstoffe sind kationisch und besitzen aromatische Ringsysteme. Sie schieben sich zwischen die Basen der DNA (= Interkalation) und bilden oft sehr stabile Komplexe. Zuerst lagern sich die positiv geladenen Farbstoffmoleküle an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Polyanionen an.

Anschließend erfolgt die Interkalation.

Viele Verbindungen, die mit DNA durch Interkalation wechselwirken, sind heute gebräuchliche Chemotherapeutika im Kampf gegen Krebs.

Verbindungen wie z.B. Ethidiumbromid besitzen im Gegensatz zu reinen Interkalatoren zusätzliche Molekülgruppen und induzieren damit Strangbrüche der DNA und schädigen sie damit zusätzlich.

Die DNA wird generell durch die Interkalation sehr stark entwunden. Der Basenabstand wird durch die dazwischengeschobenen Interkalatoren etwa verdoppelt.

Nachweismethoden von Nukleinsäuren (schulisch)

- **Anfärben von DNA:**
Mit dem Schiffs-Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure) erfolgt nach saurer Hydrolyse die Bildung eines rotvioletten Farbstoffes.
In der Histologie dient das Schiffs-Reagenz bei der Feulgen-Färbung zur selektiven Anfärbung der Zellkerne in Gewebeschnitten. Es handelt sich um eine Farbreaktion mit der DNA.
- **Saure Hydrolyse der DNA und Nachweis von Hydrolyseprodukten** [14]:
 - **Phosphatnachweis:** Die DNA wird mit salpetersaurer Ammoniummolybdat-Lösung versetzt und 5 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt → gelber Niederschlag.

- **Fehling-Reaktion:** Die DNA wird in verdünnter Schwefelsäure etwa 5-10 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wird das Hydrolysat durch Zugabe von NaHCO_3 neutralisiert und die Fehling-Reaktion durchgeführt → rotbrauner Niederschlag.

Molekulare Erkennung der DNA [1]

Ziel: Sequenzspezifische Verbindungen lagern sich an ganz bestimmte DNA-Abschnitte an und blockieren damit einen bestimmten Genabschnitt, d.h. sie verhindern somit das Ablesen der dort befindlichen genetischen Information. Man hätte damit die Möglichkeit, die Expression von Virus-DNA im menschlichen Genom zu unterbinden. Es könnten neuartige Medikamente zur Behandlung vieler Viruserkrankungen entwickelt werden.

Wie erkennt eine Verbindung eine ganz bestimmte Stelle der DNA?

In die große Furche der DNA ragen viele funktionelle Gruppen der Basen.

→ Abb.: B-DNA [1], Anlage 11

→ Abb.: Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang [2], Anlage 5

Diese funktionellen Gruppen der Basen bilden für jeden Abschnitt der DNA *im Bereich der großen Furche ein sequenzspezifisches Bindungsmuster*. Die Kenntnis dieser sequenzspezifischen Bindungsmuster eröffnet die Möglichkeit mit entsprechenden komplementären Verbindungen gezielt bestimmte Gen-Bereiche zu blockieren. Das wäre eine Strategie, mit der bestimmte Krankheiten auf der Ebene des genetischen Materials bekämpft werden könnten.

Literatur

- [1] T.Carell: Vorlesung Biologische Chemie I Nukleinsäuren → online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1.html(7.8.02)
- [2] H.Beyer,W.Walter: Lehrbuch der Organischen Chemie,23.Aufl.,1998,S.924
- [3] Chemie der Nukleinsäuren
→ http://www.aum.iawf.unibe.ch/vlz/BWL/Gen_Kurs/Gen_Kurs/DNA/chem00.htm(20.8.02)
- [4] M.Gerstein,M.Levitt: Die Simulation von Biomolekülen in Wasser, Spektrum der Wissenschaft 2(1999),46-51
- [5] H.Bayrhuber, U.Kull (Hrsg.): Linder Biologie 1998, S.324
- [6] Alberts et al: Molekularbiologie der Zelle, VCH, 2.Aufl. 1990, ISBN 3-527-27983-0 und 3. Aufl. 1995, ISBN 3-527-30055-4
- [7] Knippers,R.: Molekulare Genetik, Thieme Verlag Stuttgart 1995
- [8] F.Hoffmann-La Roche: CD: Roche Genetics Lernprogramm Genetik, erhältlich unter www.roche genetics.com
- [9] Folienserie des Fonds der Chemischen Industrie Nr. 20: Biotechnologie / Gentechnik
- [10] Bildungsplan für die Kursstufe des Gymnasiums 2001, S.214, 217, 224
- [11] H.Schickor: Bau und Präsentation von 3D-Molekülanimationen, Unterricht Chemie 13(2002),Nr.67, S.41-44
- [12] Scharfenberg: Virtuelle Molekülmodelle am RWG, <http://rwg-bayreuth.de/chemie/chime/index.html>
- [13] CD: Doppelhelix – eine dreidimensionale Simulation der DNA-Struktur, Schroedel Verlag 2001, ISBN 3-507-10545-4
- [14] H.K.Schuster: DNA-Hydrolyse, persönliche Mitteilungen, Schlossgymnasium Künzelsau, 2003

Arbeitsblatt: Auf den Spuren von WATSON und CRICK (Partner- o. Gruppenarbeit)

WATSON und CRICK haben die Struktur der DNA herausgefunden, indem sie alle verfügbaren Informationen über dieses Riesenmolekül zusammengetragen und sorgfältig ausgewertet haben. 1953 fanden sie eine Struktur, die zu allen diesen Informationen passte. Wie wenige Jahre später bestätigt werden konnte, war es tatsächlich die richtige Struktur. Dafür bekamen sie 1962 den Nobelpreis.

Aufgabe: Mit diesem Puzzle sollt ihr versuchen, den Aufbau eines DNA-Moleküls herauszufinden.

1. Die Einzelteile des Puzzles stellen die molekularen Bausteine der DNA dar. Legt die Molekülmodelle (Puzzle-Teile) mit den Buchstaben nach oben vor euch auf den Tisch.
2. Betrachtet die Bausteine genau. Welche Bausteine passen zusammen?

-
3. In welchem Zahlenverhältnis stehen:

D : P =
 A : T =
 C : G =
 D : (A+T+C+G) =

4. Versucht die einzelnen Bausteine so zusammenzubauen, dass ein „Riesenmolekül“ entsteht. Bedingung ist, dass möglichst alle Bindungsmöglichkeiten genutzt werden. Was fällt euch beim Zusammenbau des „Riesenmoleküls“ auf?

-
4. Welches ist die kleinste sich wiederholende Gruppe (Einheit) des „Riesenmoleküls“?
 5. Fertigt eine Skizze von eurem Molekülmodell an. Womit könnte man es vergleichen?
 6. Vergleicht euer Molekülmodell mit denen anderer Gruppen. Worin unterscheidet sich euer Molekülmodell von den anderen?
 7. Ein DNA-Molekül ist 2 nm breit ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} \rightarrow 1 \text{ mm} = 1000000 \text{ nm}$). Wievielmals größer ist euer Modell?
 8. Das DNA-Modell ist in Wirklichkeit nicht flach, sondern wie eine Wendeltreppe gewunden. Diese Struktur bezeichnet man als Doppelhelix. Schaut euch dazu ein Strukturmodell der DNA an.
 9. Wenn ihr fertig seid, dreht ihr bitte euer DNA-Molekülmodell um. Jetzt seht ihr, welche chemischen Strukturen sich hinter den einzelnen Buchstaben verbergen. Notiert euch, für welchen molekularen Baustein der jeweilige Buchstabe steht:

D : C:
 P : G:
 A: T:

Materialien:

1 – 2 DNA-Modellbaukästen, Strukturmodell der DNA.

Nähere Informationen dazu und die Bestell-Adresse (ncbe@reading.ac.uk) finden Sie im Internet unter <http://www.reading.ac.uk/NCBE> (→ Materials, → DNA Science, → DNA jigsaw, → Instructions from the jigsaw (German language, download), Preis pro Kasten: £ 50,00.

Durchführung:

Wenn Ihnen 2 DNA-Modellbaukästen zur Verfügung stehen, können Sie z.B. 6 Schülergruppen mit folgenden Anzahlen von Puzzle-Teilen versorgen:

Gruppen \ Puzzle-Teile	1	2	3	6	5	6
A = Adenin	5	4	3	2	3	4
T = Thymin	5	4	3	2	3	4
C = Cytosin	2	3	4	5	4	3
G = Guanin	2	3	4	5	4	3
D = Desoxyribose	14	14	14	14	14	14
P = Phosphat	14	14	14	14	14	14

Wichtiger Hinweis: Jede Schülergruppe soll alle Puzzle-Teile verbauen!

Siehe auch folgende Seite, Kopie aus dem Lehrerbegleitheft zum DNA-Modellbaukasten.

Didaktischer Hinweis:

Arbeitsblatt (vorige Seite) und DNA-Modellbaukasten eignen sich, um den Schüler/innen Vorstellungen über die Struktur und Funktion der DNA-Doppelhelix zu veranschaulichen. Durch die „Zwei-in-einem-Konzeption“ kann der Bausatz sowohl zur Hinführung auf einfachste Grundlagen als auch zu einem vertieften Wissensstand über die DNA eingesetzt werden. Dazu ist die **eine Seite** der Puzzle-Teile mit **Großbuchstaben** (den Anfangsbuchstaben des Molekülnamens) und die **andere Seite** mit den **Strukturformeln** der DNA-Bausteine bedruckt.

Weiterhin können auch Fragen zur DNA-Replikation oder Transkription mithilfe des DNA-Baukastens anschaulich erläutert werden.

Arbeitsblatt (Anlage 1) bearbeitet von:

- Sandra Eberhardt, Isolde-Kurz-Gymnasium, Bismarckstr. 55, 72764 Reutlingen
- Gerhard Braun, Gymnasium bei St. Michael, Tüngentaler Str. 92, 74523 Schwäbisch Hall, mail@braun-sha.de

1

DNA-STRUKTUR

1 Modell für Einsteiger



2 Informationen für LehrerInnen

Anzahl und Art der Puzzle-Teile, die Sie ausgeben, ist abhängig von der Klassengröße, der Zahl der zur Verfügung stehenden Bausätze sowie von Anzahl und Größe der Schülergruppen, die Sie bilden möchten. Besteht Ihre Klasse z.B. aus 24 Schülern und Sie haben einen Bausatz, so können Sie 4 Gruppen zu je 6 Schülern oder 6 Gruppen zu je 4 Schülern bilden. Die Zahl der Bausteine pro Gruppe beträgt dann:

4 Gruppen zu je 6 Schülern		6 Gruppen zu je 4 Schülern	
2 Gruppen bekämen jeweils	2 Gruppen bekämen jeweils	3 Gruppen bekämen jeweils	3 Gruppen bekämen jeweils
D - 12	D - 12	D - 8	D - 8
P - 12	P - 12	P - 8	P - 8
A - 4	A - 2	A - 3	A - 1
T - 4	T - 2	T - 3	T - 1
G - 2	G - 4	G - 1	G - 3
C - 2	C - 4	C - 1	C - 3

ACHTUNG: Folgendes gilt immer - unabhängig von Anzahl und Größe der Gruppen:

Anzahl der D's = Anzahl der P's; Anzahl der A's = Anzahl der T's;

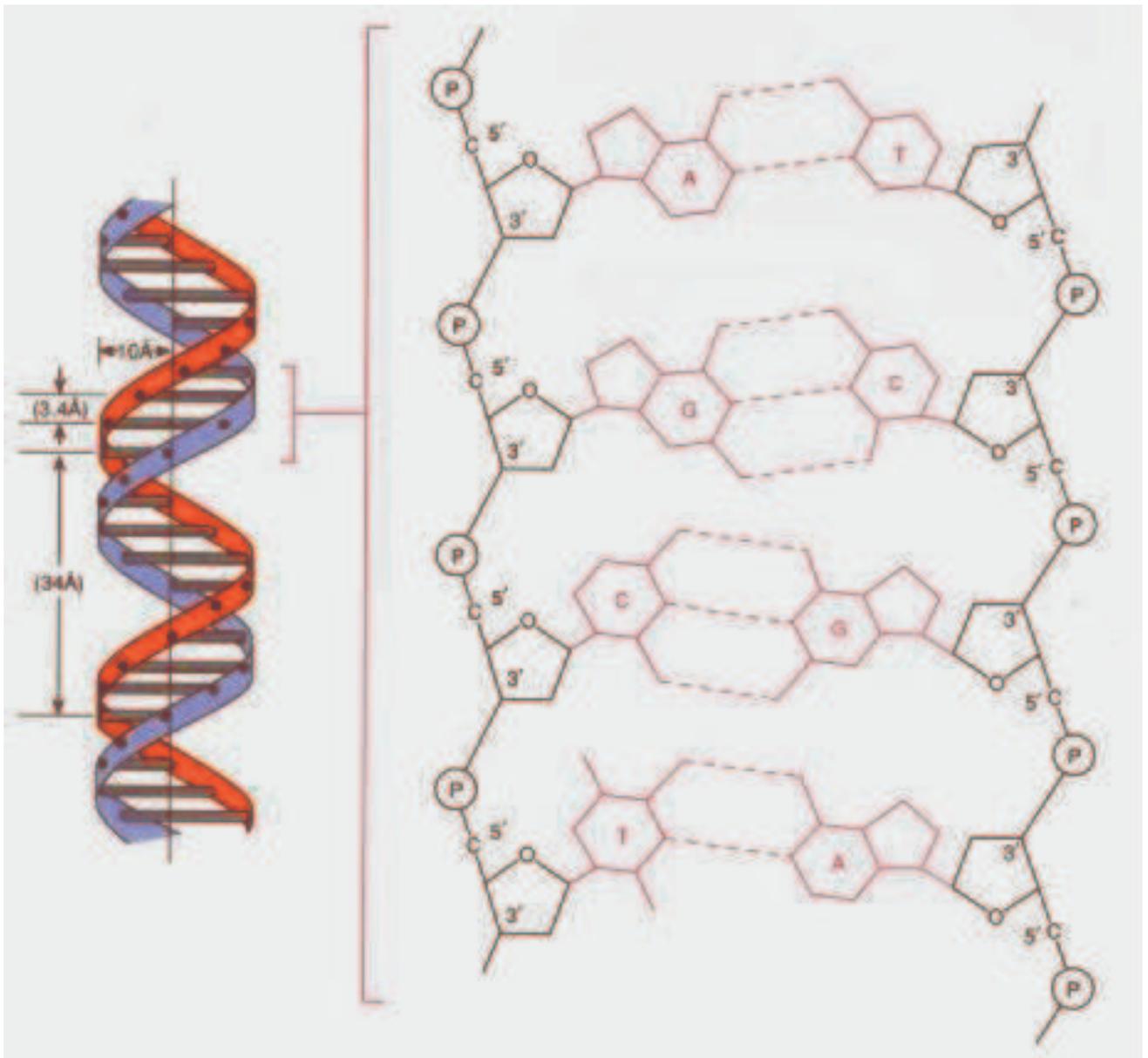
Anzahl der G's = Anzahl der C's; Anzahl der D's (oder P's) = Anzahl der A's + T's + G's + C's

Aber: Die Anzahl der A's und T's sollte der der G's und C's nicht entsprechen.

Wenn Sie eine kleinere Klasse haben oder wenn Ihnen mehr Bausätze zur Verfügung stehen, können Sie natürlich auch kleinere Gruppen bilden.

- F1** D, P, A, T, G und C.
- F2** Diese Antwort hängt davon ab, wie viele Teile ausgegeben wurden (s.o.).
- F3** D und P (oder P und D); A, T, G und C binden an D; A an T (oder T an A); G an C (oder C an G).
- F4** Es gibt nur eine Möglichkeit, wie die Teile richtig zusammenpassen. Hierbei steht die Hälfte der Buchstaben auf dem Kopf. Überprüfen Sie, ob die Schüler die Teile so zusammengefügt haben, daß das Molekül aussieht wie eine Leiter: Die D's und P's bilden die "Holme" und die A's, T's, G's und C's bilden die "Sprossen". A paart nur mit T, G nur mit C. Dies wird als "Regel der spezifischen Basenpaarung" bezeichnet. Das Molekül gliedert sich in zwei "Hälften" oder Stränge, die in entgegengesetzte Richtungen verlaufen (antiparallel). Siehe hierzu auch Folie auf der nächsten Seite.
- F5** Alle DNA-Moleküle Ihrer Schüler werden prinzipiell in ihrer Gesamtstruktur übereinstimmen. Eine eingehendere Betrachtung wird jedoch zeigen, daß die Reihenfolge oder "Sequenz" der A's, T's, G's und C's unterschiedlich ist. Es gibt viele mögliche Variationen dieser Basensequenz. Die in der DNA gespeicherte Information ist durch die Sequenz der Basen verschlüsselt. Drei aufeinanderfolgende Basen bilden ein sog. Triplet-Codon.
- F6** Ein Nukleotid (die Grundeinheit des DNA-Moleküls) besteht aus einem D, einem P und einer der Basen A, T, G oder C.
- F7** Diese Frage können Sie überspringen, wenn Sie sie für zu schwierig halten. Die Breite des Modells beträgt ungefähr 220 mm. Wenn 1 mm = 1 Million Nanometer, dann sind 220 mm = 220 Millionen Nanometer. Das tatsächliche Molekül ist 2 Nanometer breit, wir müssen also 2 Nanometer mit 110 Millionen multiplizieren, um 220 Millionen Nanometer zu erhalten. Das Modell ist folglich 110 Millionen Mal größer!

In **Microbes and Molecules**, herausgegeben von der *European Initiative for Biotechnology Education*, finden Sie im ersten Kapitel auf den Seiten 6 und 7 ein einfaches Papier-Modell der Doppelhelix. Über die folgende World Wide Web-Seite können Sie sich dieses Modell kopieren: <http://www.reading.ac.uk/NCBE> (siehe hierzu auch nächste Seite).



DNA-Doppelhelix (Aus: T.Carell: Vorlesung Biologische Chemie I
Nukleinsäuren

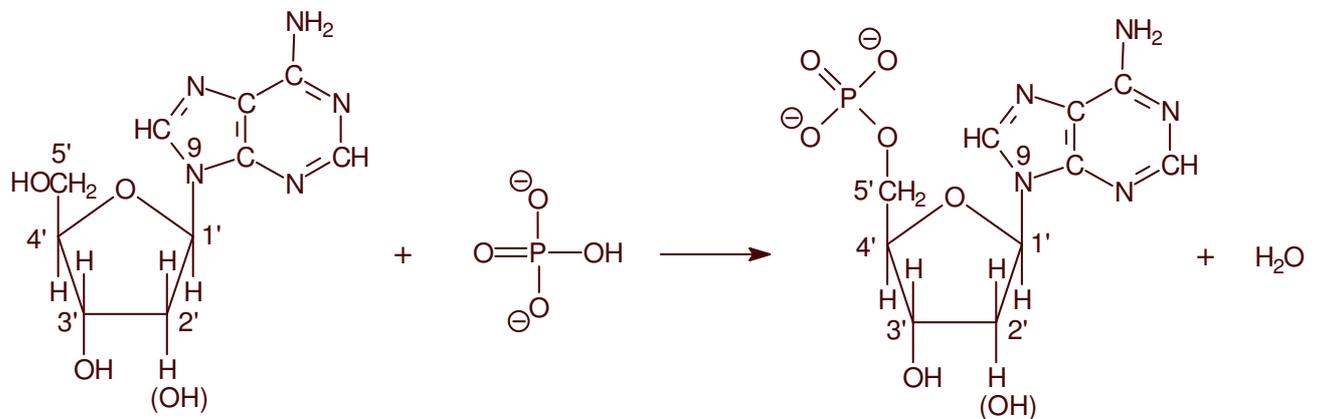
→ online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1.html [7.8.02])

Unten genannte Abbildung aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

Schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang

Aus: H.Beyer,W.Walter: Lehrbuch d. Organischen Chemie, 23. Aufl.1998, S. 924

Nukleotidbildung



H: 2'-Desoxyadenosin
monophosphat

OH: Adenosin

**2'-Desoxyadenosin-5'-
(dAMP)**

Adenosin-5'-monophosphat (AMP)

Entsprechende Nukleotide (Nukleosid-5'-monophosphate):

dGMP 2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
GMP Guanosin-5'-monophosphat

dCMP 2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat
CMP Cytidin-5'-monophosphat

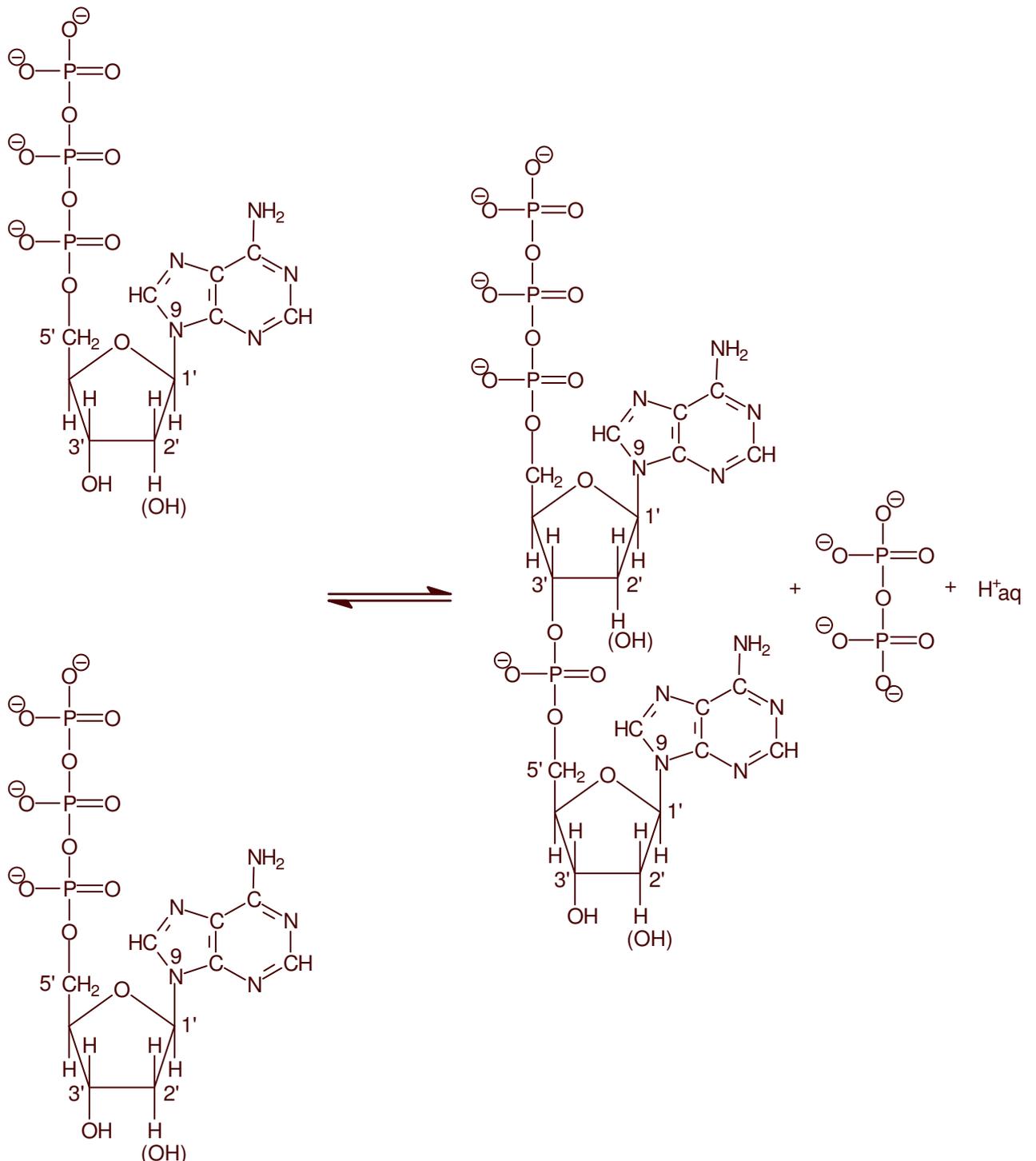
dTMP 2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat

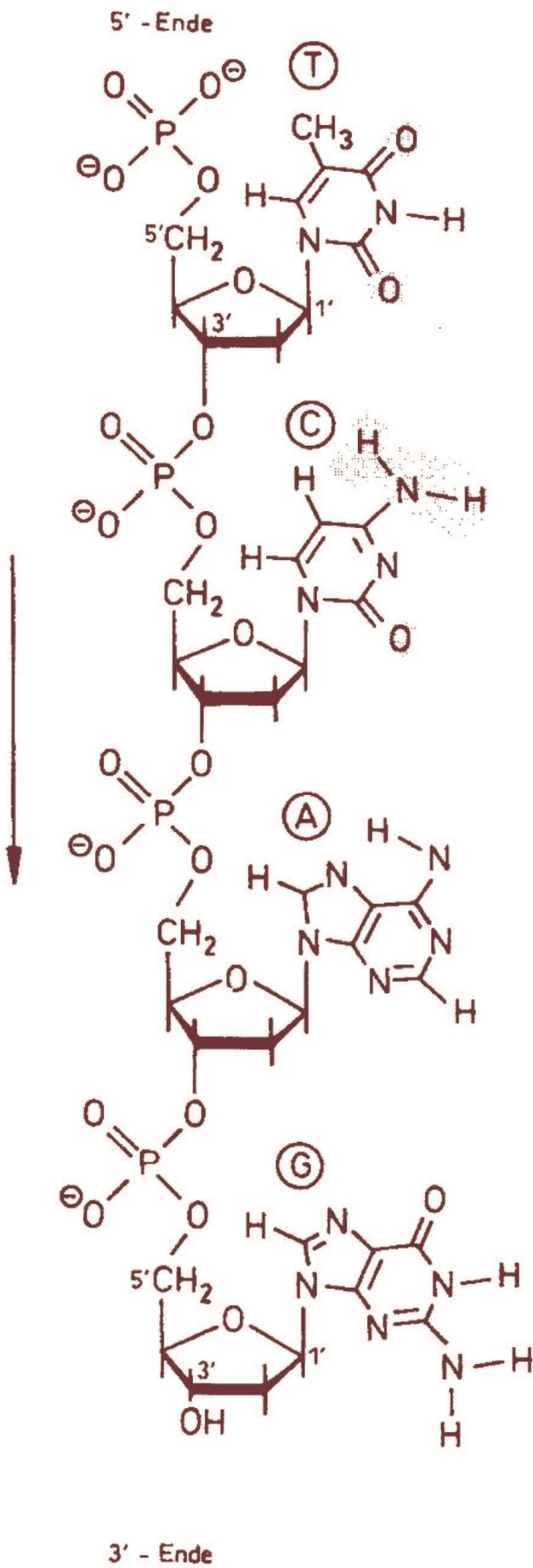
UMP Uridin-5'-monophosphat

Biochemisch gilt:

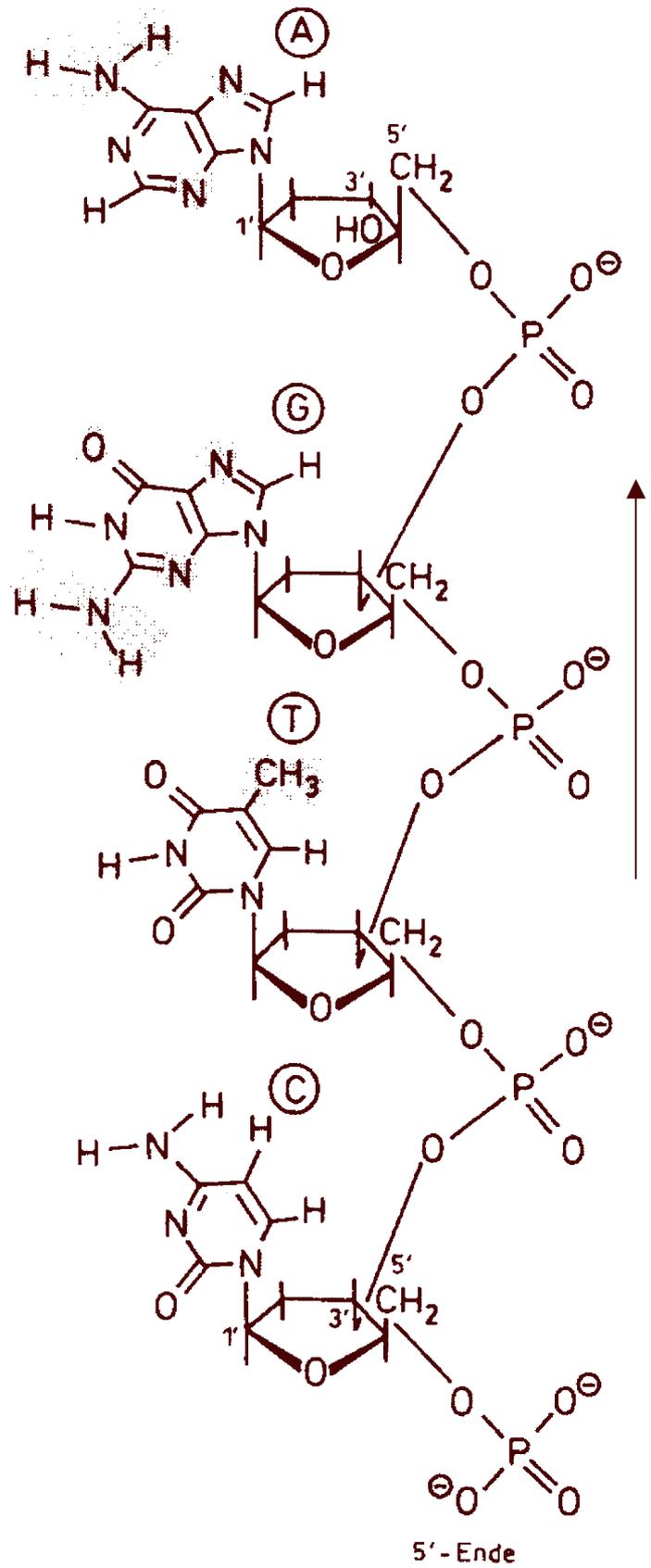


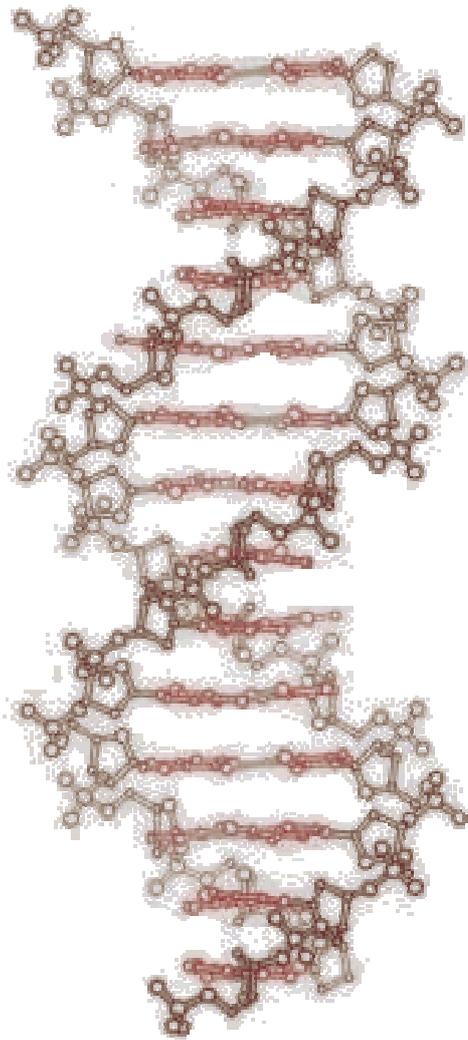
bzw.



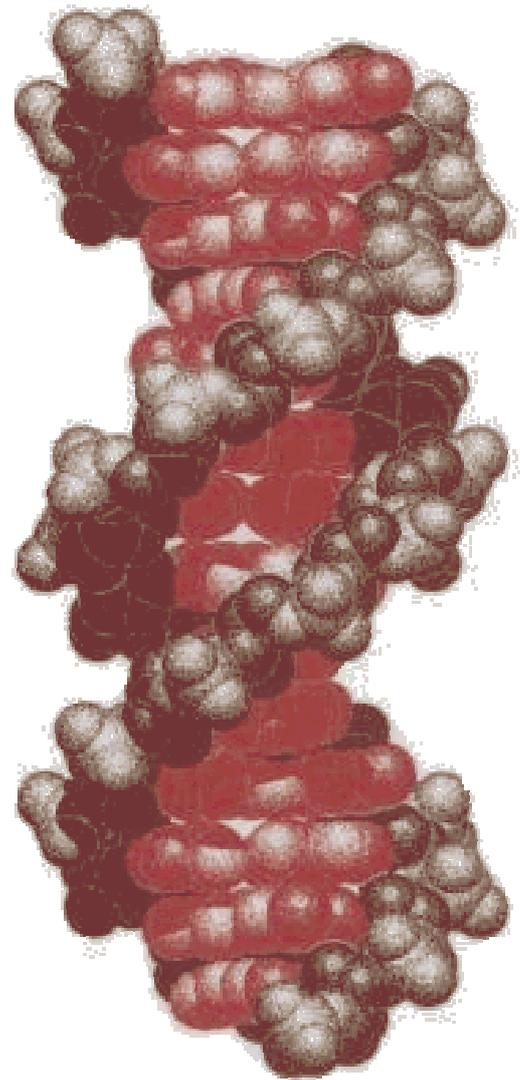


3' - Ende

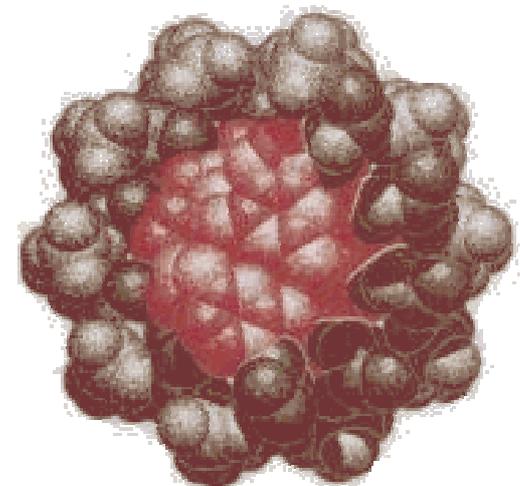
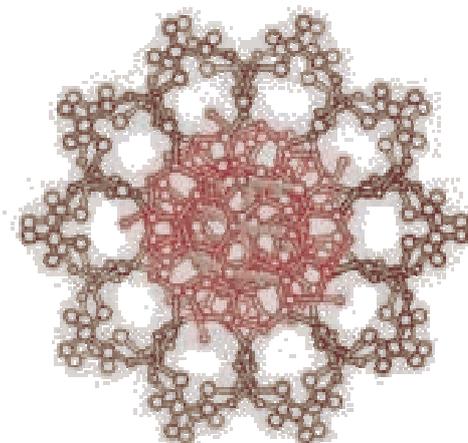




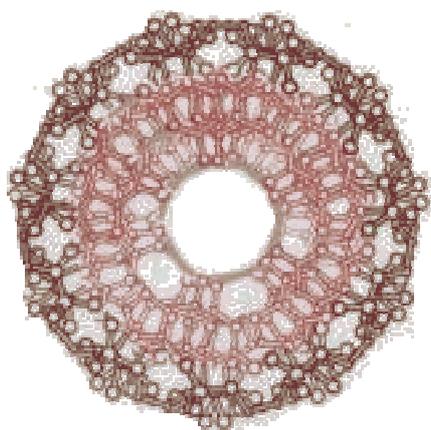
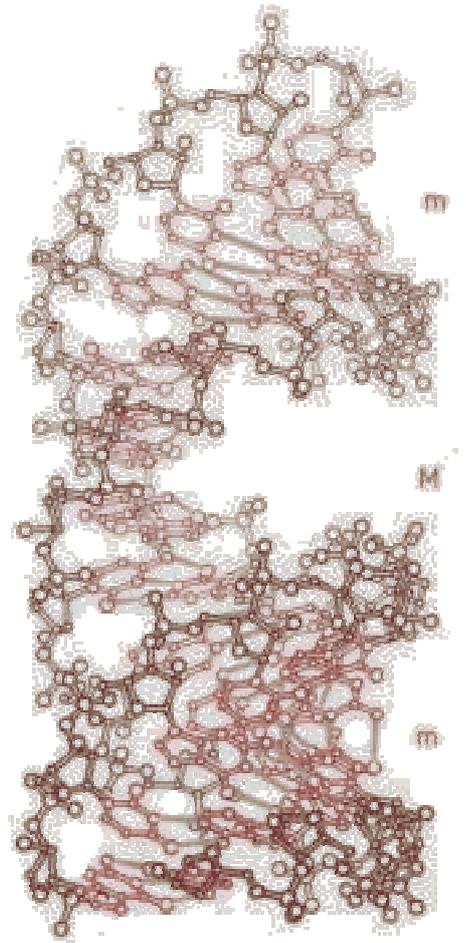
(a)



(b)



**B-DNA (Aus: T.Carell: Vorlesung Biologische Chemie I
Nukleinsäuren → online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1.html [7.8.02])**



**A-DNA (Aus: T.Carell: Vorlesung Biologische Chemie I
Nukleinsäuren**

→ online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1.html [7.8.02]