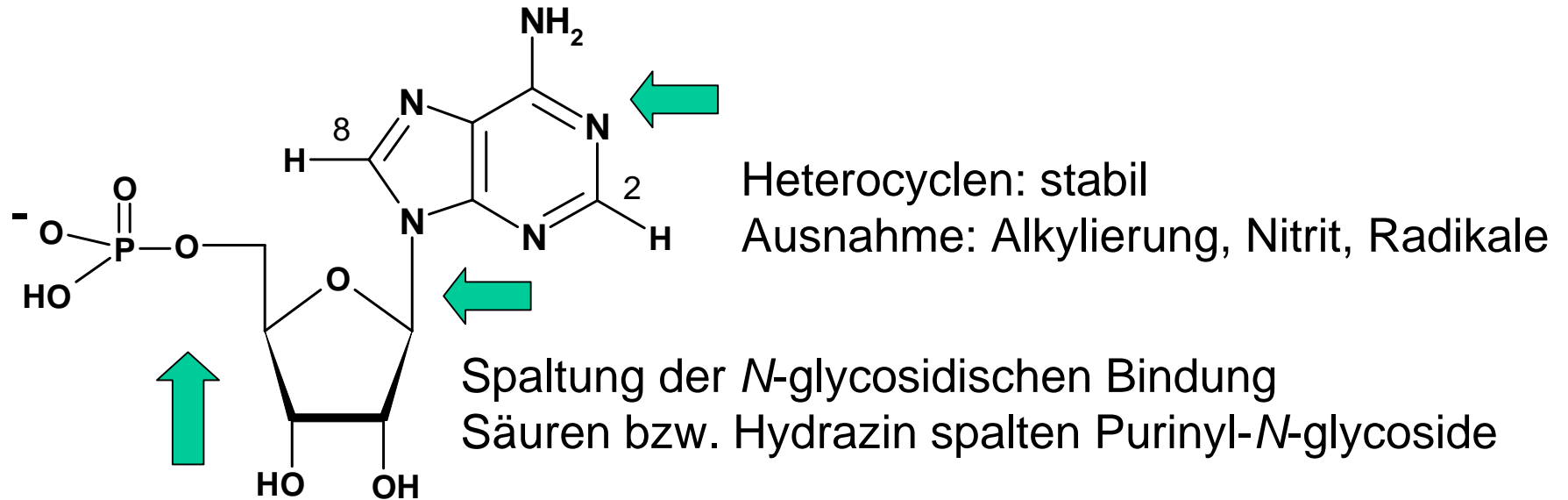


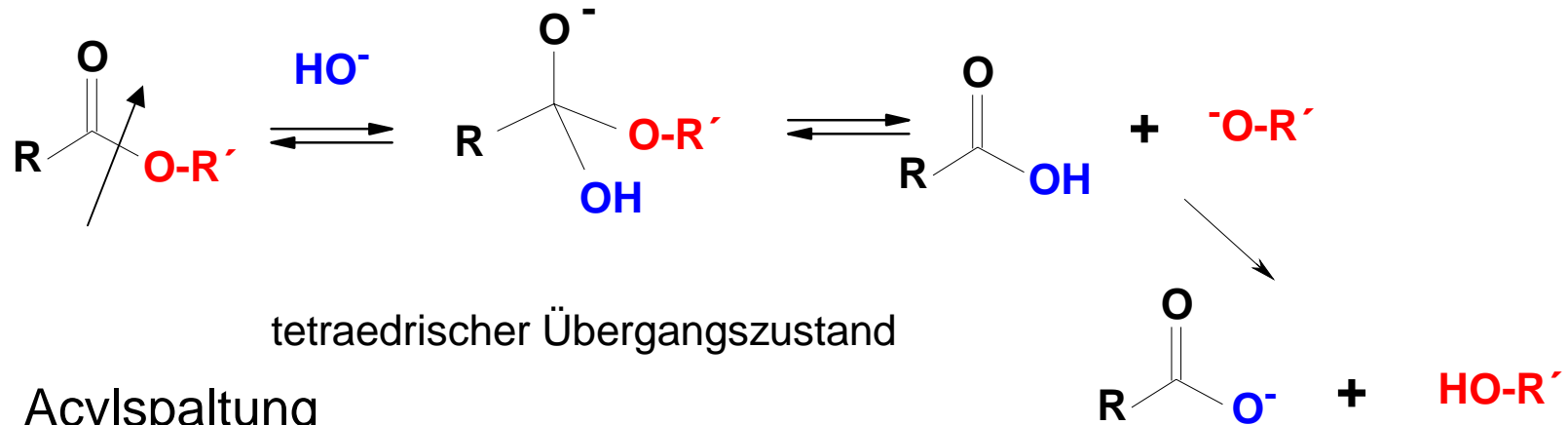
4. Chemische Stabilität der Nukleinsäuren



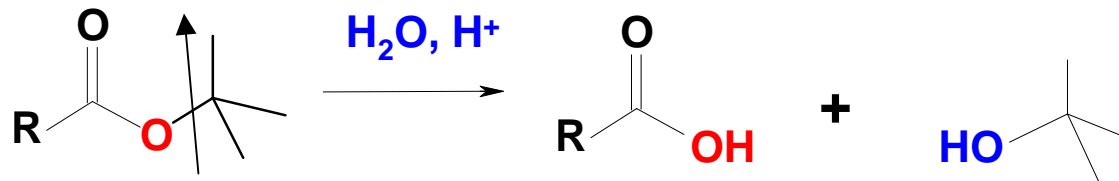
Spaltung der Phosphoester Bindung:
0.3 M KOH hydrolysiert RNA
DNA bleibt stabil

Chemische Hydrolyse von Phosphorsäureestern

Vergleich: Hydrolyse von Carbonsäureestern

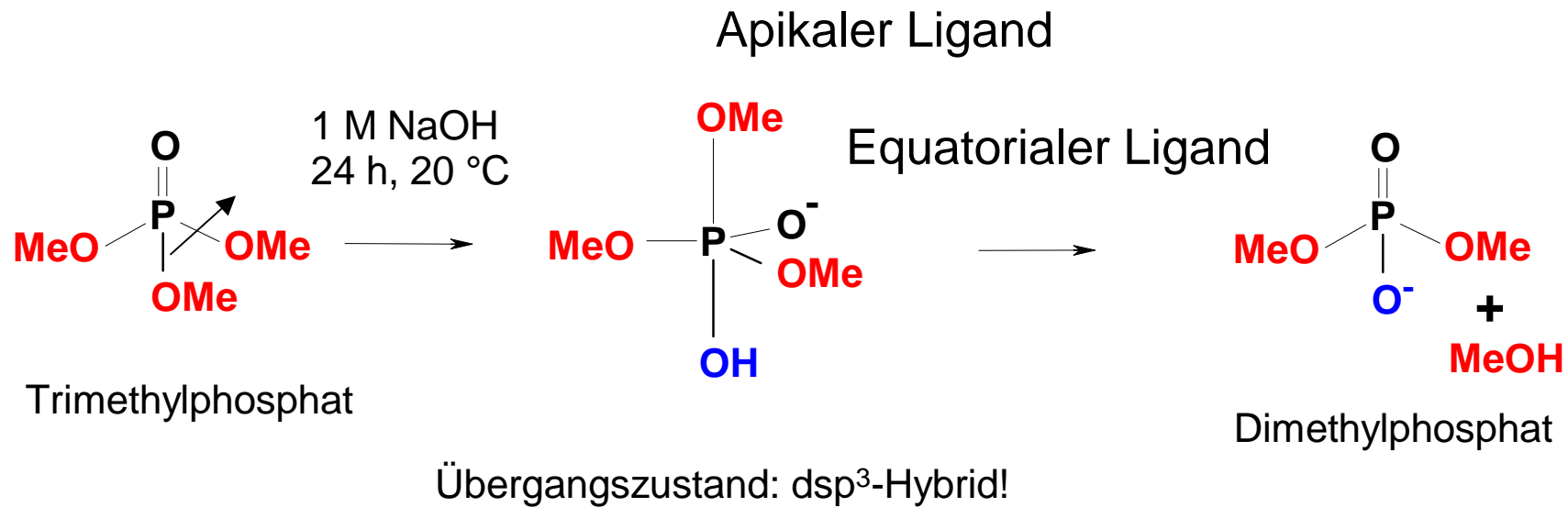


Nachweis: Reaktion in ^{18}O markiertem Wasser



Chemische Hydrolyse von Phosphorsäureestern

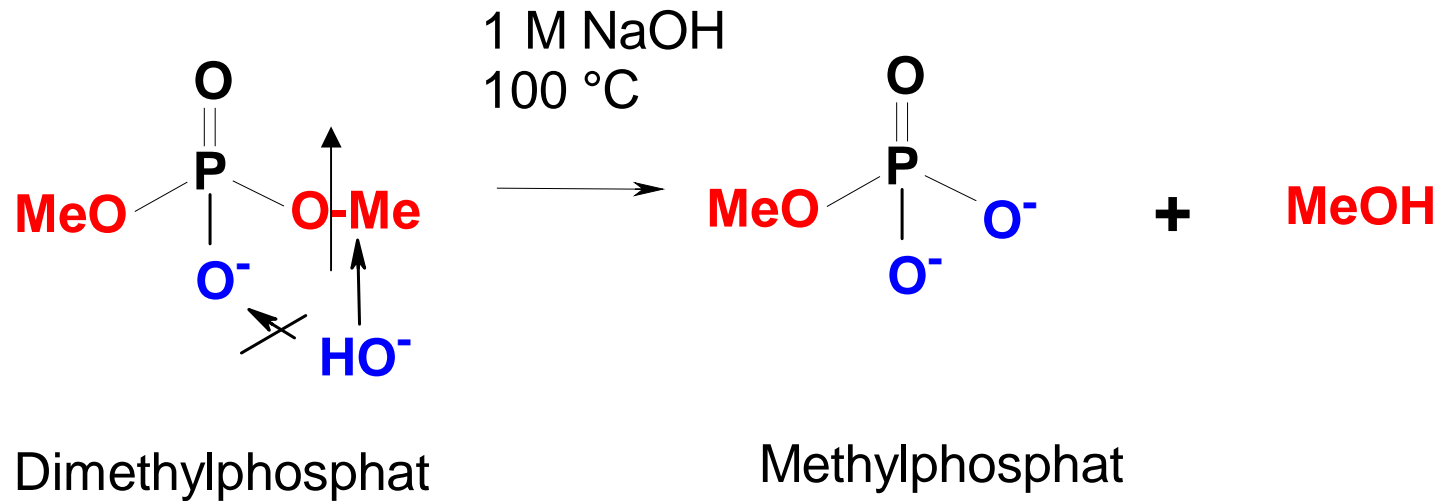
1. Phosphotriester



Phosphorylspaltung

Chemische Hydrolyse von Phosphorsäureestern

2. Phosphodiester

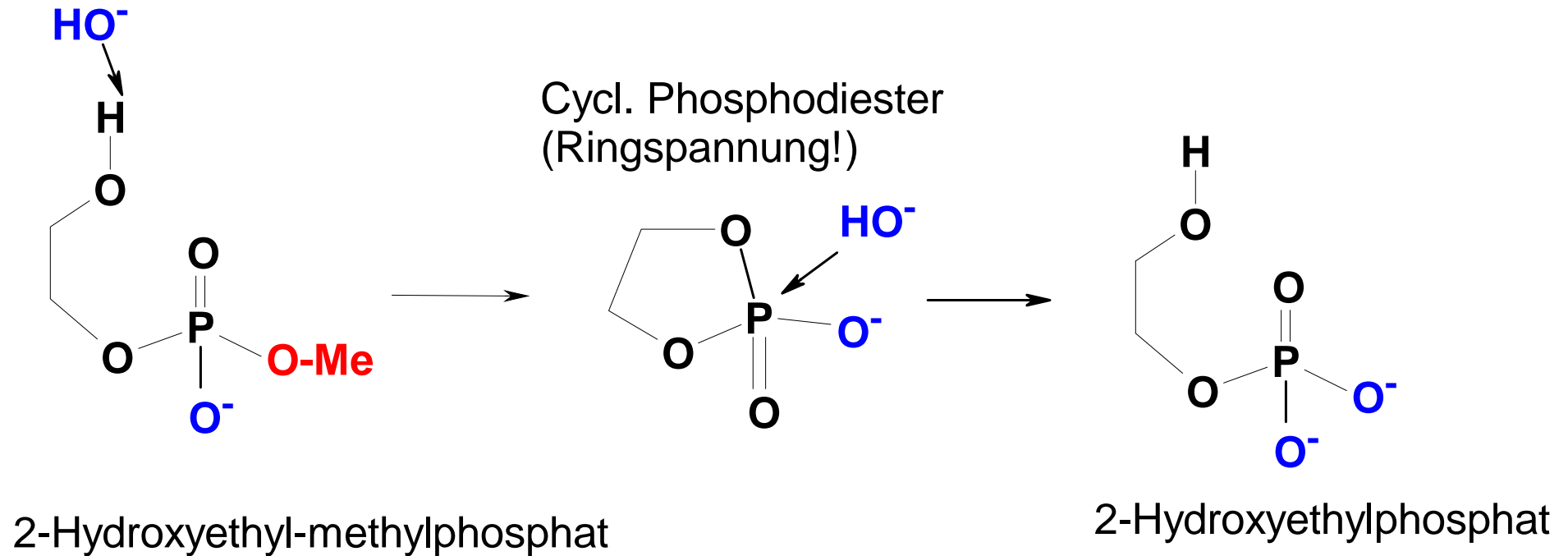


Alkylspaltung

Halbwertszeit: 16 Tage!

Chemische Hydrolyse von Phosphorsäureestern

2. Phosphodiester

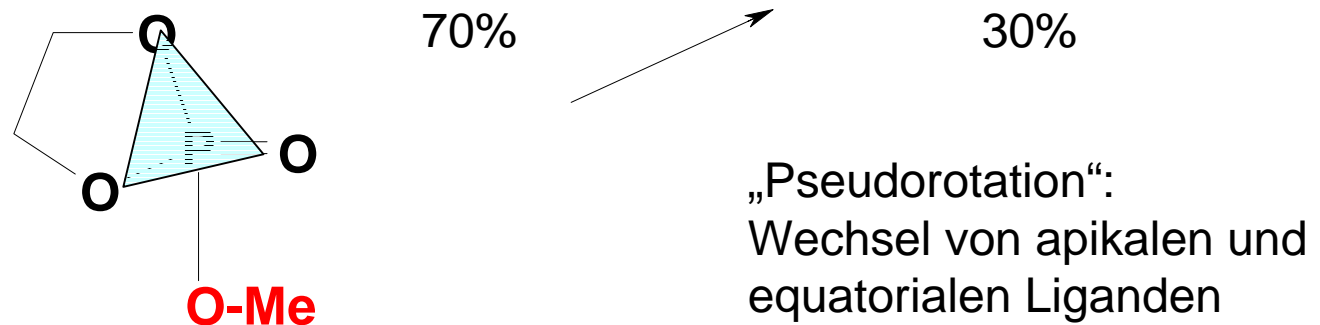
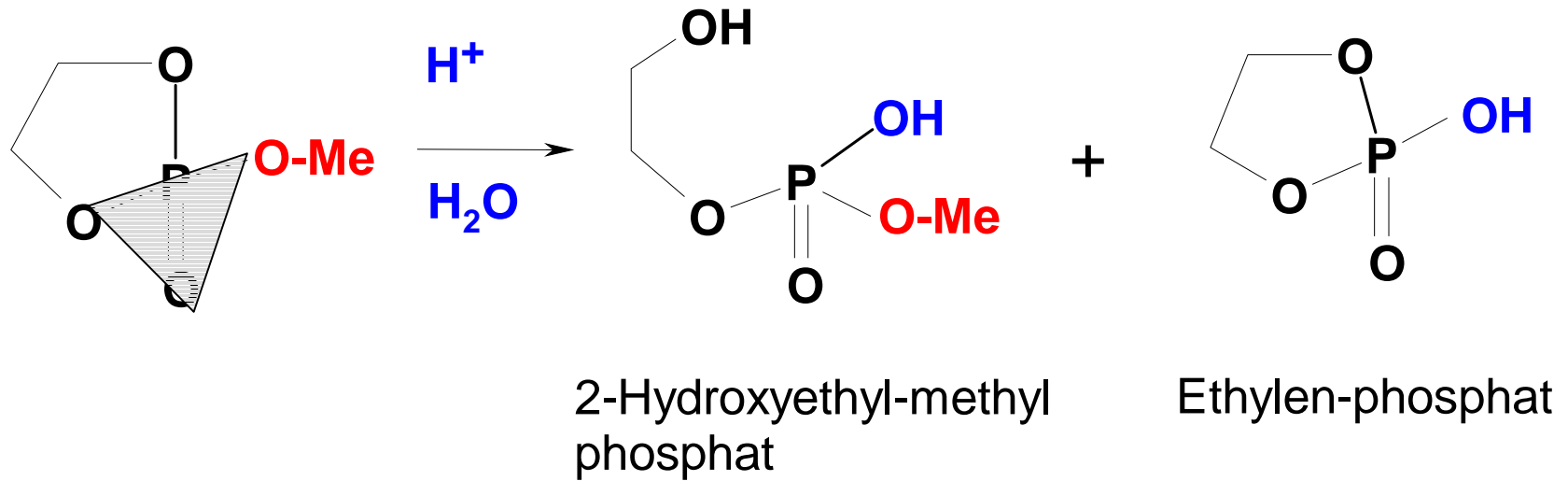


Halbwertszeit bei 25 °C 25 min!

$\Delta H = -26.8 \text{ kJ/mol}$

Nachbargruppeneffekt
Anchimere Beschleunigung

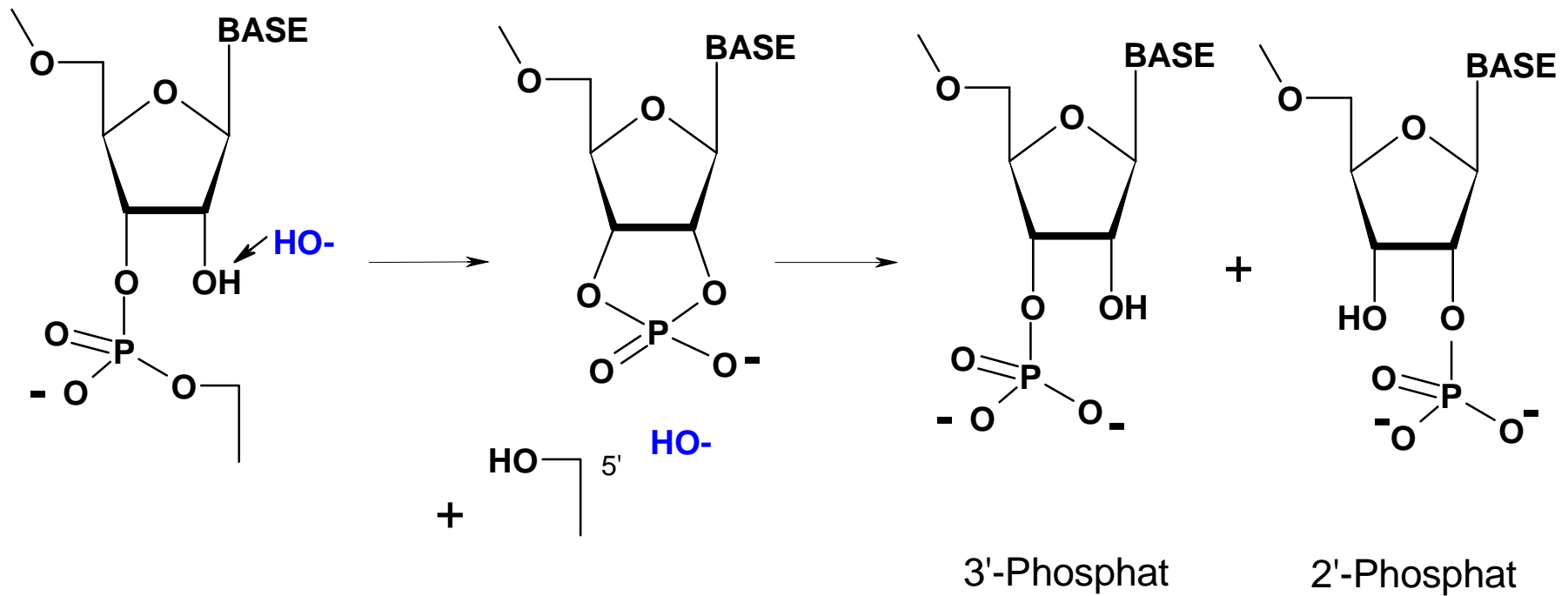
Vgl: Dimethylphosphat: -7.5 kJ/mol



Abgangsgruppe kann nur aus der apikalen Position entfernt werden (längste Bindung!)

Alkalische Hydrolyse von DNA und RNA

DNA: stabil (1 h bei 100 °C, 1 M NaOH)
RNA: hydrolysiert bei RT in 0.1 M NaOH



Enzymatische Hydrolyse von RNA

Ribonukleasen

Spalten basenspezifisch oder unspezifisch

z.B.

Ribonuklease A nach Pyrimidin-Nukleotiden (C,U)

Ribonuklease T₁ (*Aspergillus oryzae*) nach Guanin (in *syn*-Konformation)

Ribonukleasen P (Ribozyme)

Ribonuklease A

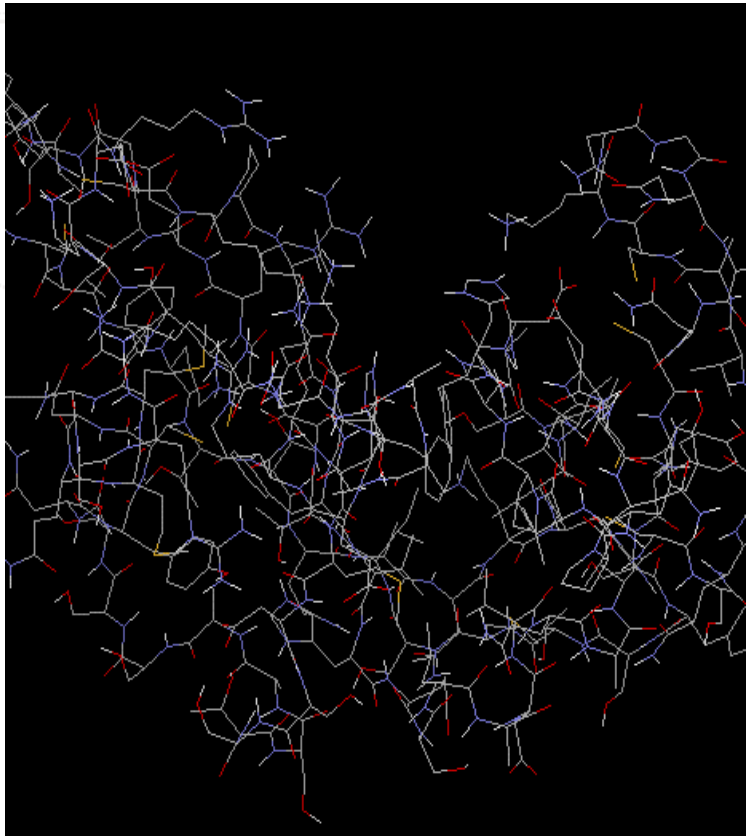
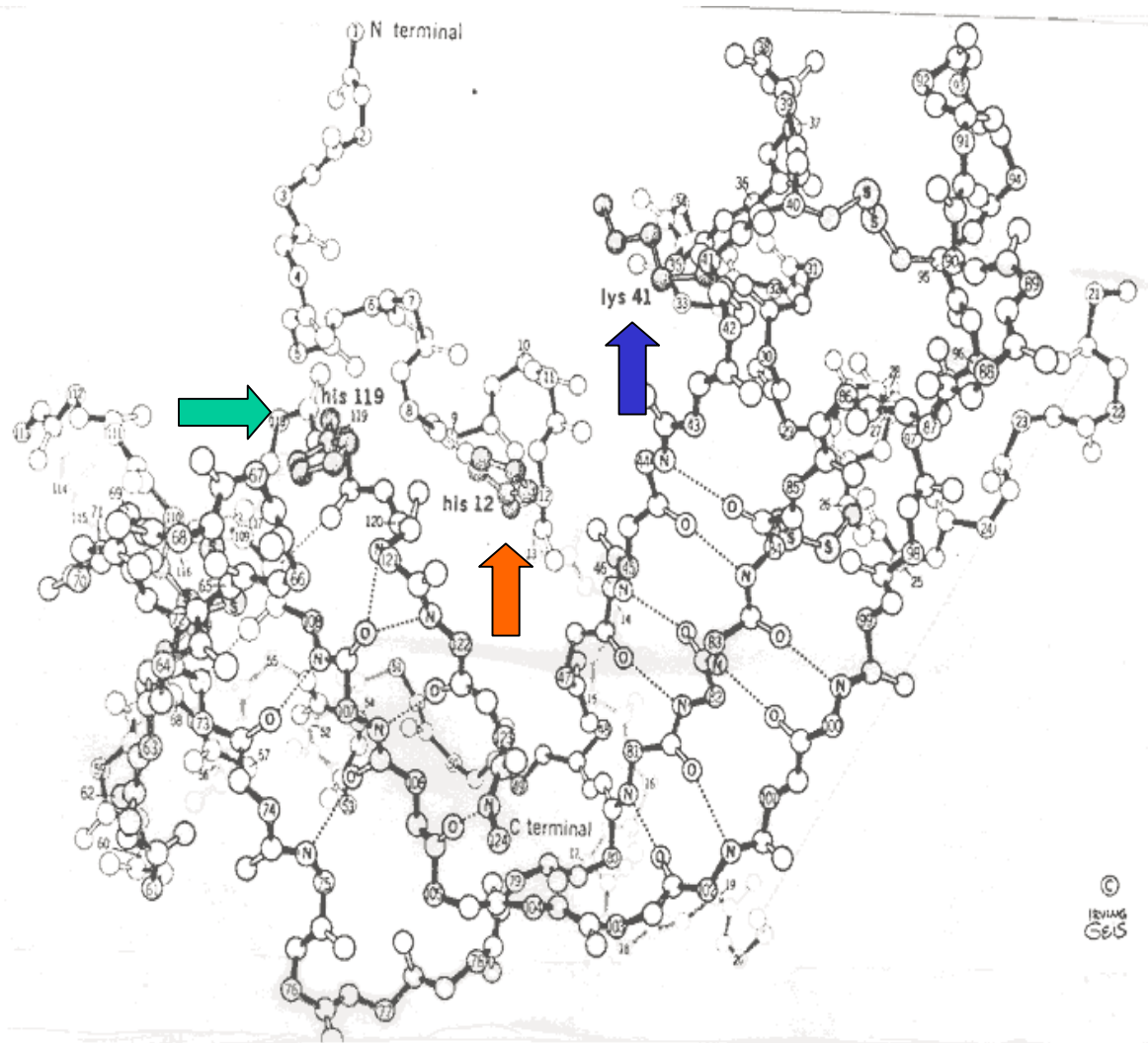
Isolierung aus Rinderpankreas

Viele Kristallstrukturen (124 entries, z. B. pdb-code: 1AFK, 1H1H, 1QHC, 1RND)

Erste „NMR-Struktur“, 4 Nobelpreise

M: 13.680, 124 Aminosäuren

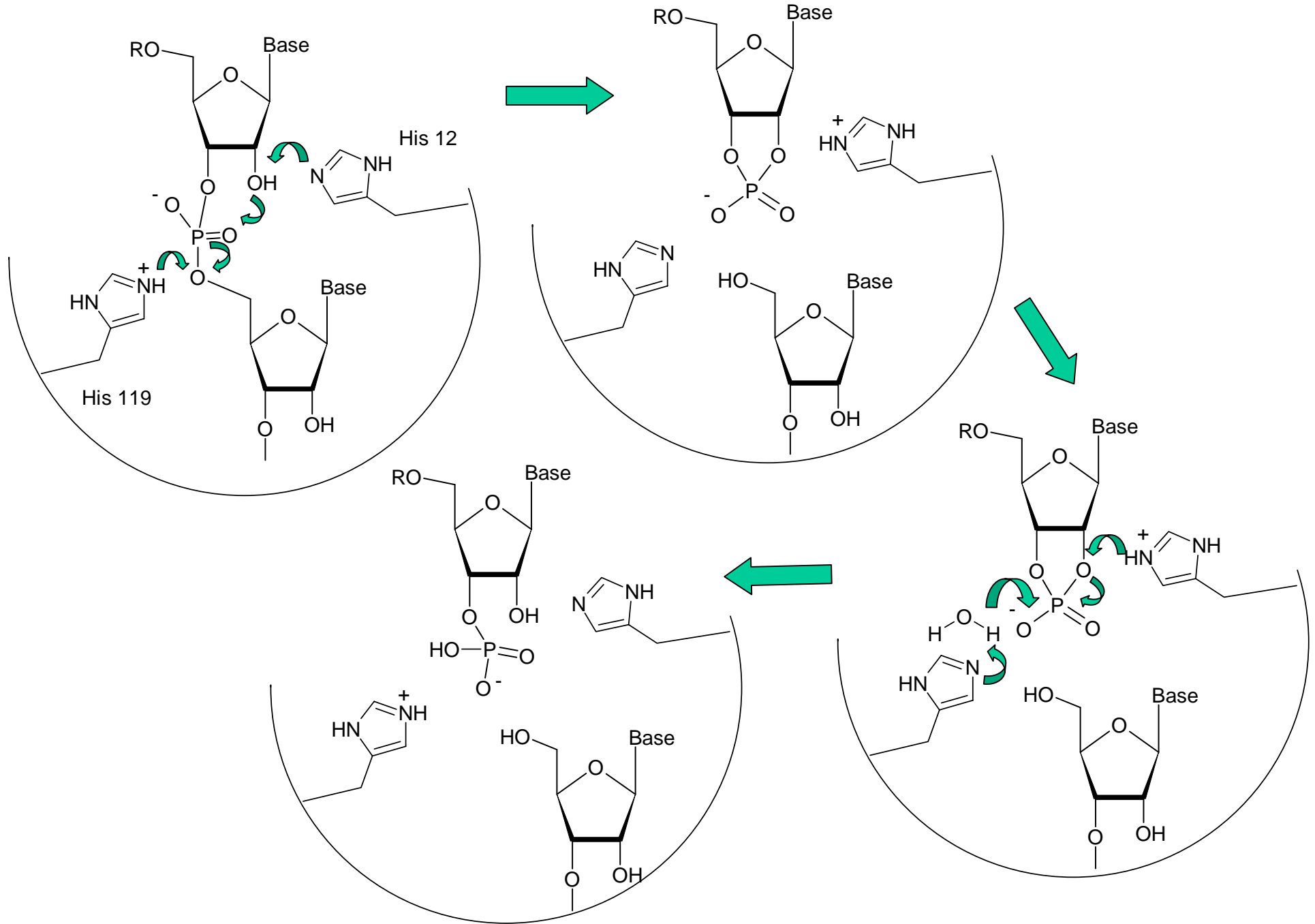
Chem. Synthesen: 1969 Merrifield (0.4 mg), 1979 Yajima (3 mg)



© IRVING
GEIS
RNase A

Katalytisches Zentrum: His 12
His 119
Lys 41

Mechanismus der Ribonukleasereaktion

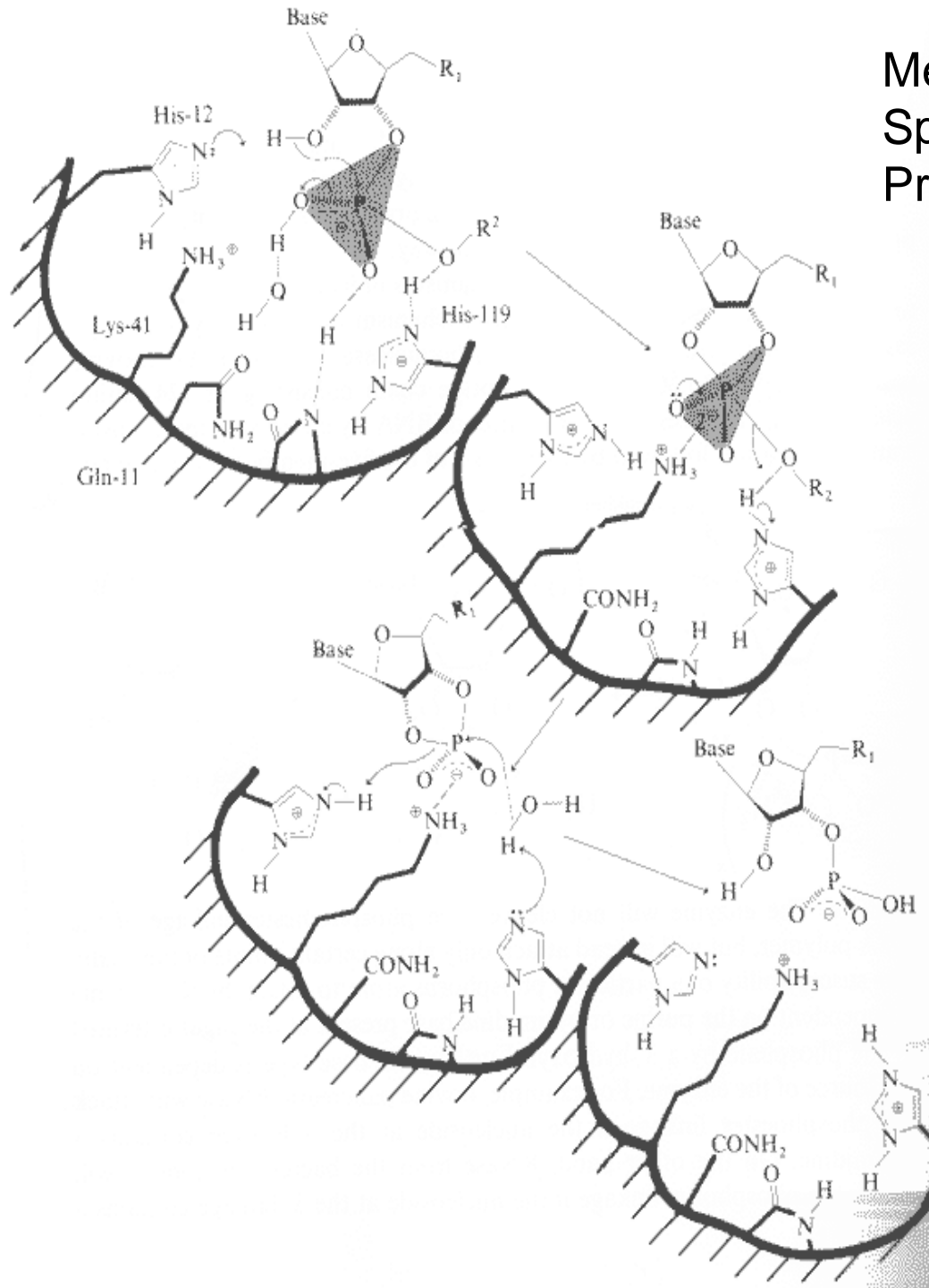


Mechanismus der Phosphodiester-Spaltung

Produkt: ausschließlich 3'-Phosphate

Teilschritte:
Umesterung - Hydrolyse

Allgemeine Säuren-Basen
Katalyse (Histidin)



Ribozyme – katalytisch aktive Ribonukleinsäuren - Metallenzyme

1982 entdeckt

2 Gruppen

35 – 155 Nukleotide: Hammerhead, Hairpin, Hepatitis Delta
Liefern 2',3'-cyclo-Phosphate und 5'-OH (analog RNase A)

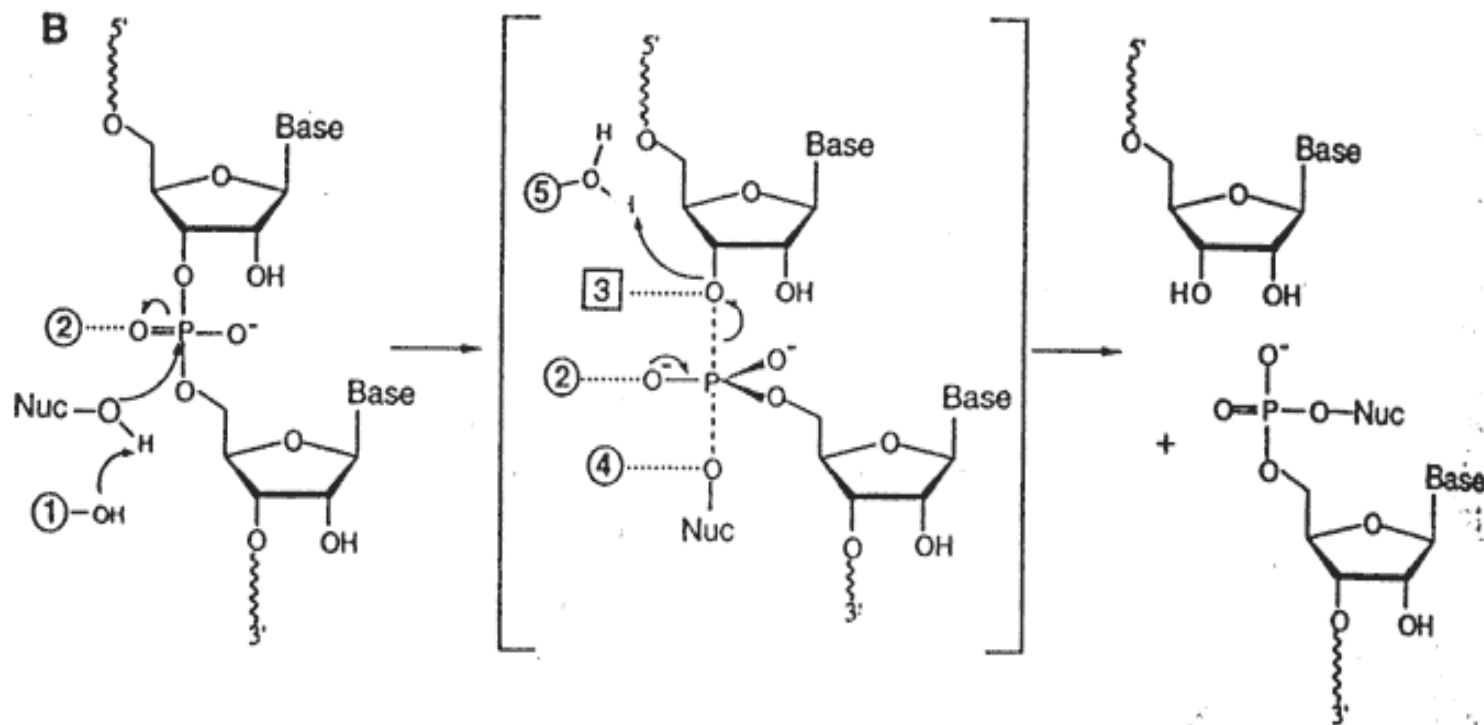
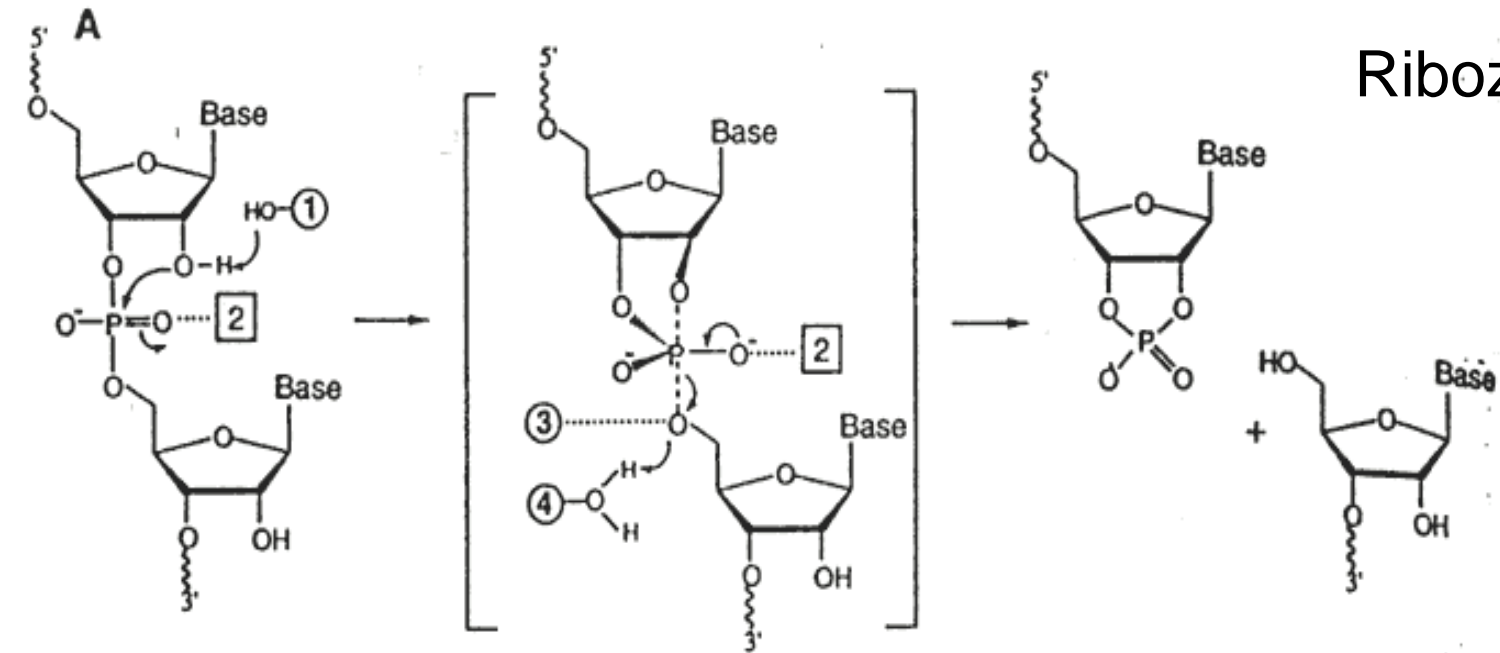
100- 3000 Nukleotide: RNase P, Group I and II Introns
Liefern 5'-Phosphate (und 3'-OH)

Selbstmodifikation, ausgenommen RNase P (Prozessiert t-RNA Precursor)

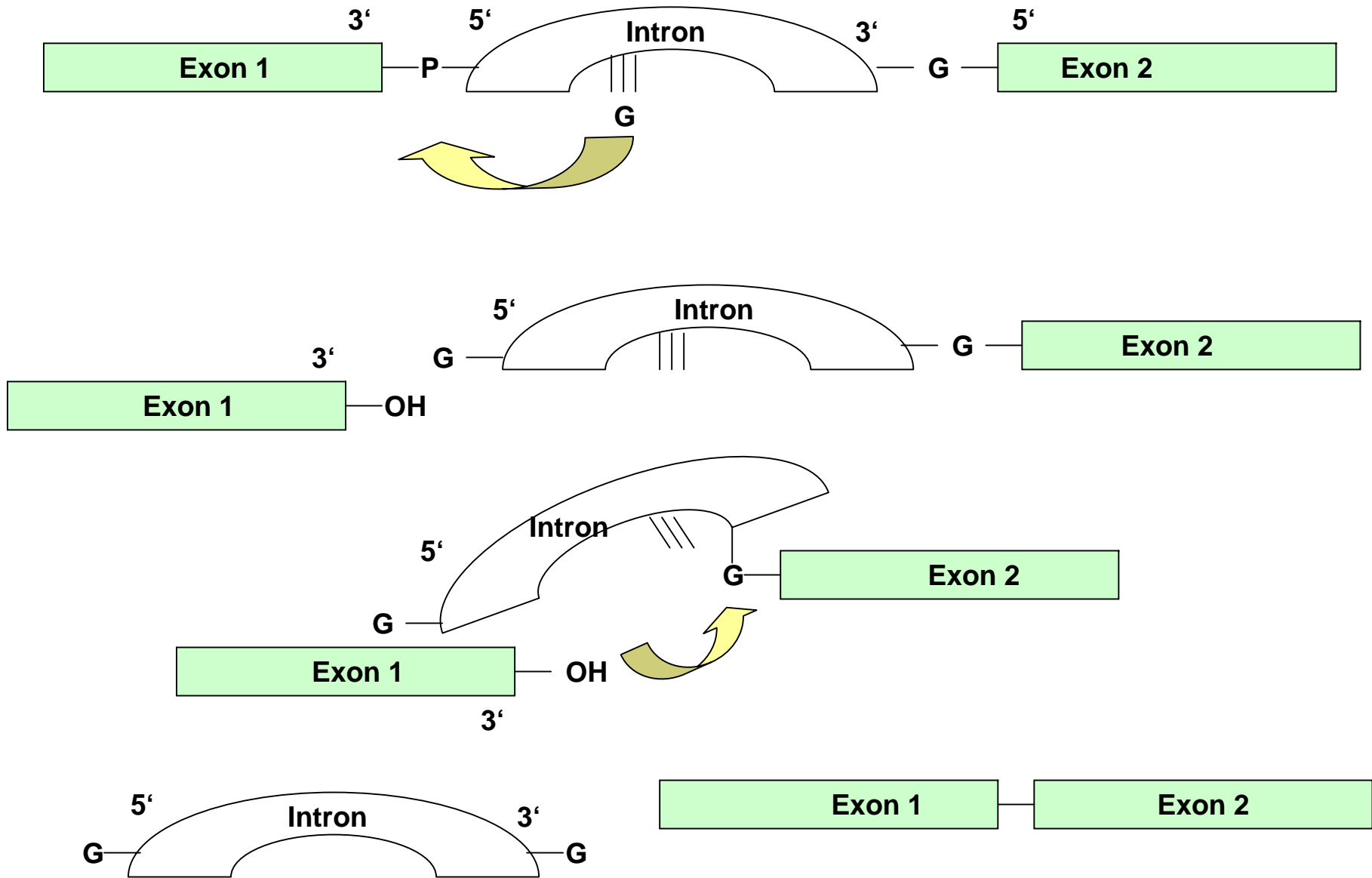
Reaktionsbeschleunigung: $\sim 10^{11}$

Essentiell: Mg^{2+}

Ribozyme



Group I Intron-Splicing



Magnesium:

Koordiniert nur mit O (Mn²⁺ auch mit N)

6 Liganden (Ca²⁺ > 6)

Senkt pKs des Wassers auf 11.4

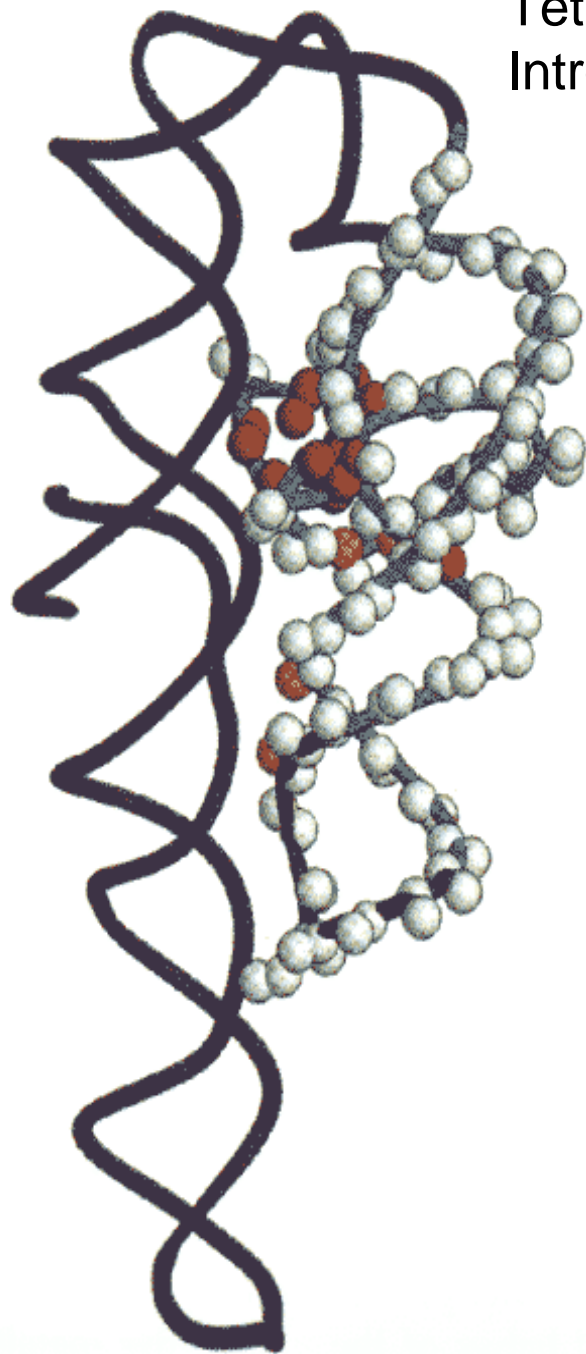
Kleinste katalytisch aktive RNA:

UUU

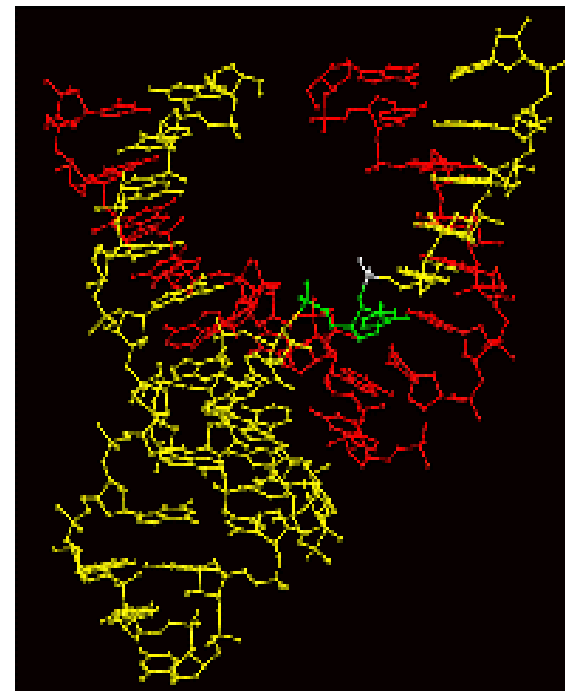
Spaltet in Gegenwart von Mn²⁺ GAAA

Schwächste Codon-Wechselwirkung

Tetrahymena Group I Intron



Hammerhead-RNA



Simulated
Annealing

Refinement

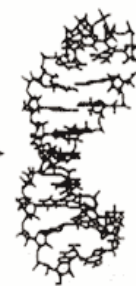
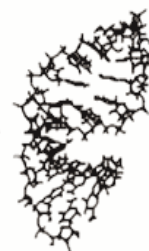
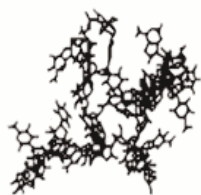
Minimization

nOe Constraints On

Dihedral constraints On

Electrostatic Off
VdW Off

(Electrostatic On)
VdW On



Random starting
structure

Global fold

Refined structure

Final structure