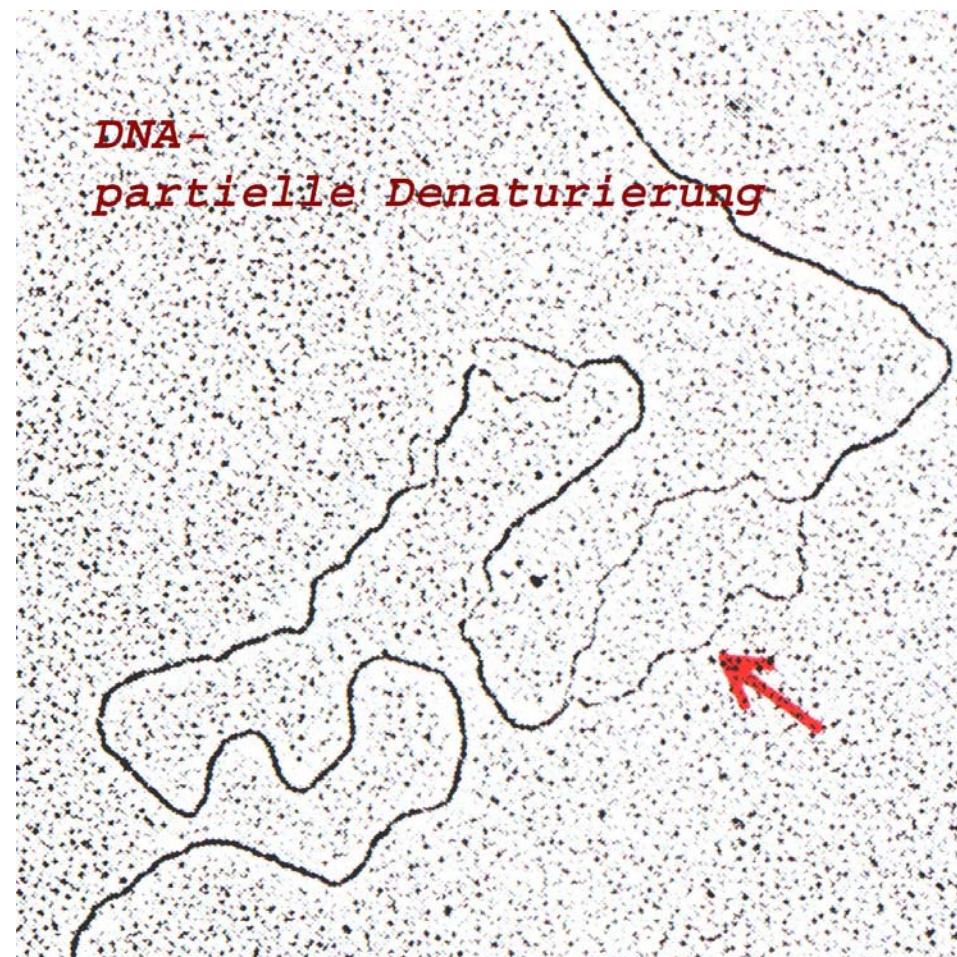


Klassische Verfahren zur Analyse von Eukaryoten-DNA

Die DNA-Schmelzanalyse:



Genome unterscheiden sich erheblich in der Basenzusammensetzung (GC-Gehalt)

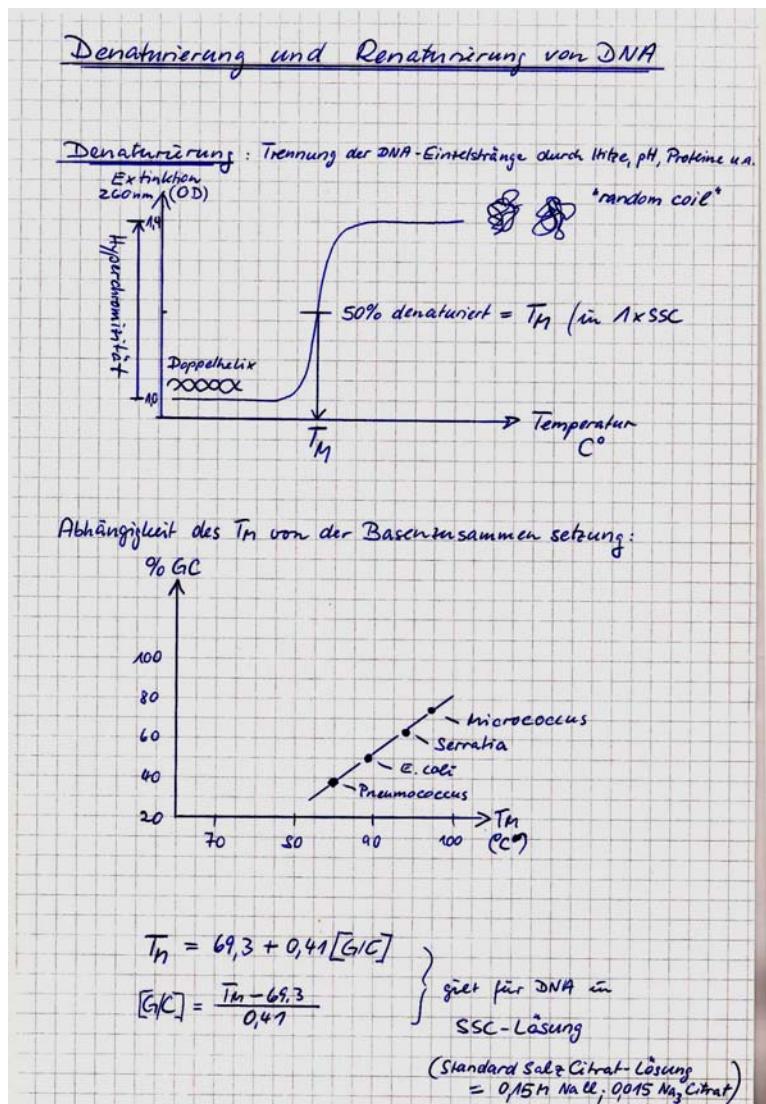
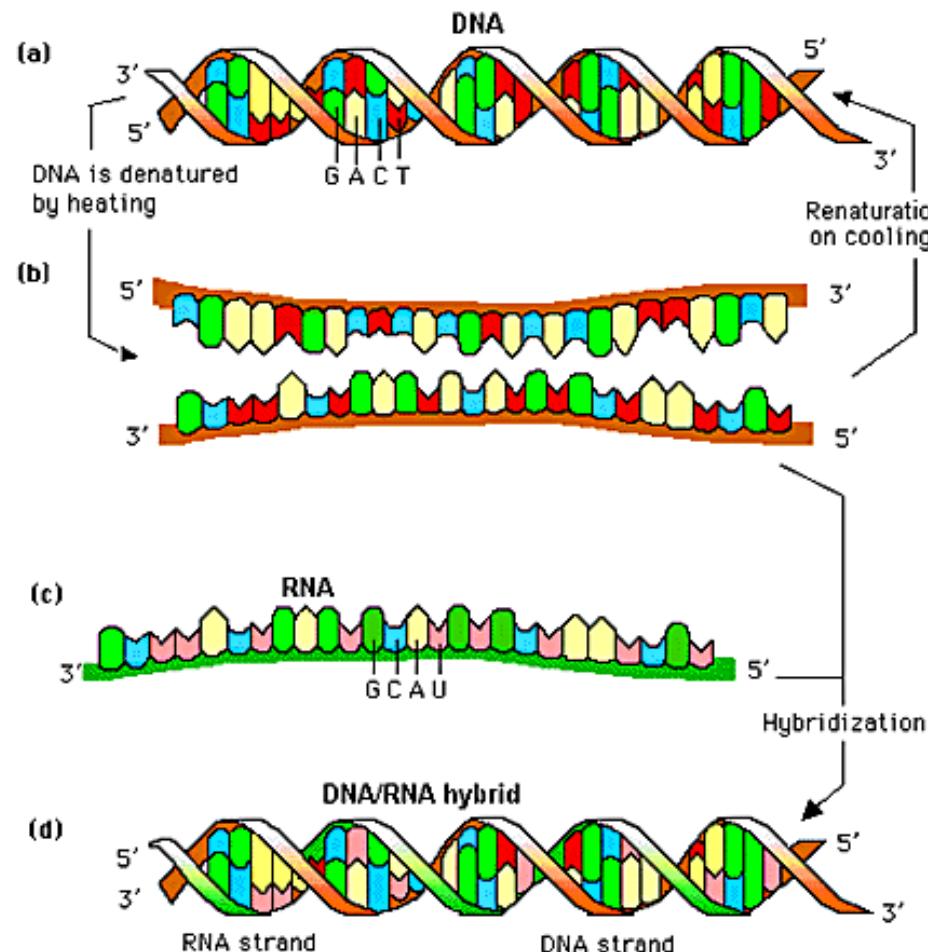


Table 6.3 Relative G + C Contents of Various DNAs

Sources of DNA	Percent (G + C)
<i>Dictyostelium</i> (slime mold)	22
<i>Streptococcus pyogenes</i>	34
<i>Vaccinia virus</i>	36
<i>Bacillus cereus</i>	37
<i>B. megaterium</i>	38
<i>Hemophilus influenzae</i>	39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Calf thymus	40
Rat liver	40
Bull sperm	41
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
Wheat germ	43
Chicken liver	43
Mouse spleen	44
Salmon sperm	44
<i>B. subtilis</i>	44
T1 bacteriophage	46
<i>Escherichia coli</i>	51
T7 bacteriophage	51
T3 bacteriophage	53
<i>Neurospora crassa</i>	54
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
<i>Sarcina lutea</i>	72
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	72
Herpes simplex virus	72
<i>Mycobacterium phlei</i>	73

From Davidson, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 8th ed., revised by Adams, et al.
Copyright © Chapman & Hall, London.

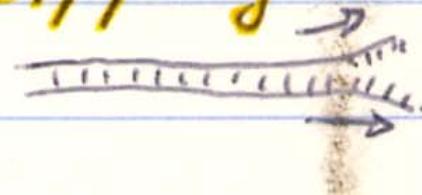
Denaturierte („geschmolzene“) DNA kann „reassoziiieren“ oder mit „hybridisieren“



Nucleic Acid Hybridization

Die DNA-Reassoziation

Reassoziation / Renaturierung : 2 Stufenprozess
1. Nukleation → 2. "Zipping"



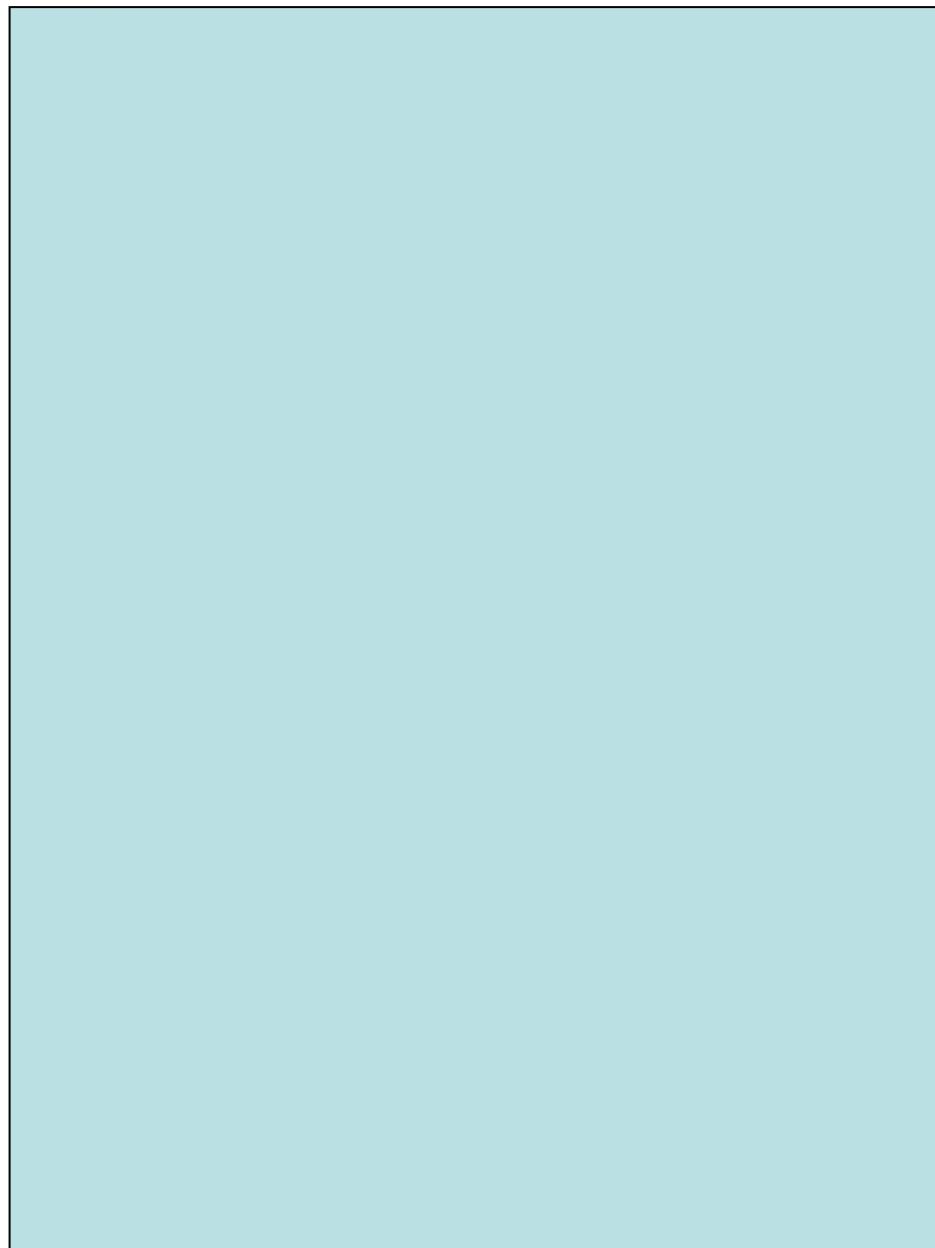
Die Kinetik der DNA-Reassoziation:

Die Reassoziationreaktion wird bestimmt durch Konzentration und Zeit

$$C_0 t$$

C_0 = Konzentration $t=0$
 C = Konzentration t

Figure 3.4 A DNA reassociation reaction is described by the $C_0 t_{1/2}$



Die Kinetik der DNA-Reassoziation:

Die Reassoziationreaktion wird bestimmt durch Konzentration und Zeit

$$C_0 t$$

C_0 = Konzentration t=0
 C = Konzentration t

Figure 3.4 A DNA reassociation reaction is described by the $C_0 t_{1/2}$

Rate of reaction

The reaction follows the second order equation

$$\frac{dC}{dt} = -kC^2$$

C is the concentration of DNA that is single-stranded at time t
 k is a reassociation rate constant.

Die Kinetik der DNA-Reassoziation:

Die Reassoziationreaktion wird bestimmt durch Konzentration und Zeit

$$C_0 t$$

C_0 = Konzentration t=0
 C = Konzentration t

Figure 3.4 A DNA reassociation reaction is described by the $C_0 t_{1/2}$

Rate of reaction

The reaction follows the second order equation

$$\frac{dC}{dt} = -kC^2$$

C is the concentration of DNA that is single-stranded at time t
 k is a reassociation rate constant.

Progress of reaction

Integrate the rate equation between the limits:
initial concentration of DNA = C_0 at time $t = 0$;
concentration remaining single stranded = C after time t

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k \cdot C_0 t}$$

Die Kinetik der DNA-Reassoziation:

Die Reassoziationreaktion wird bestimmt durch Konzentration und Zeit

$$C_0 t$$

C_0 = Konzentration t=0
 C = Konzentration t

Figure 3.4 A DNA reassociation reaction is described by the $C_0 t_{1/2}$

Rate of reaction

The reaction follows the second order equation

$$\frac{dC}{dt} = -kC^2$$

C is the concentration of DNA that is single-stranded at time t
 k is a reassociation rate constant.

Progress of reaction

Integrate the rate equation between the limits:
initial concentration of DNA = C_0 at time $t = 0$;
concentration remaining single stranded = C after time t

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k.C_0 t}$$

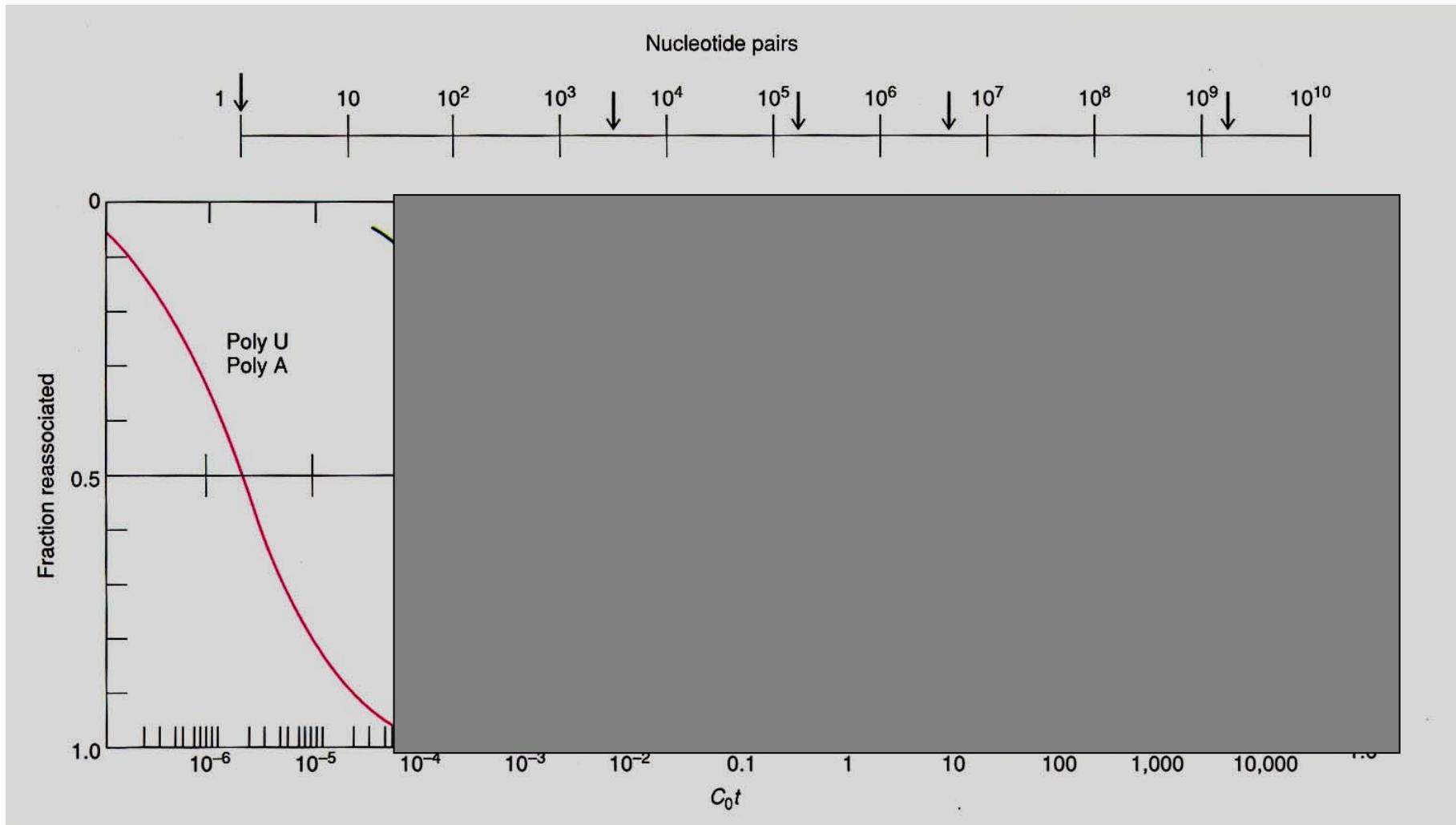
Critical parameter is $C_0 t_{1/2}$

When the reaction is half complete at time $t = 1/2$

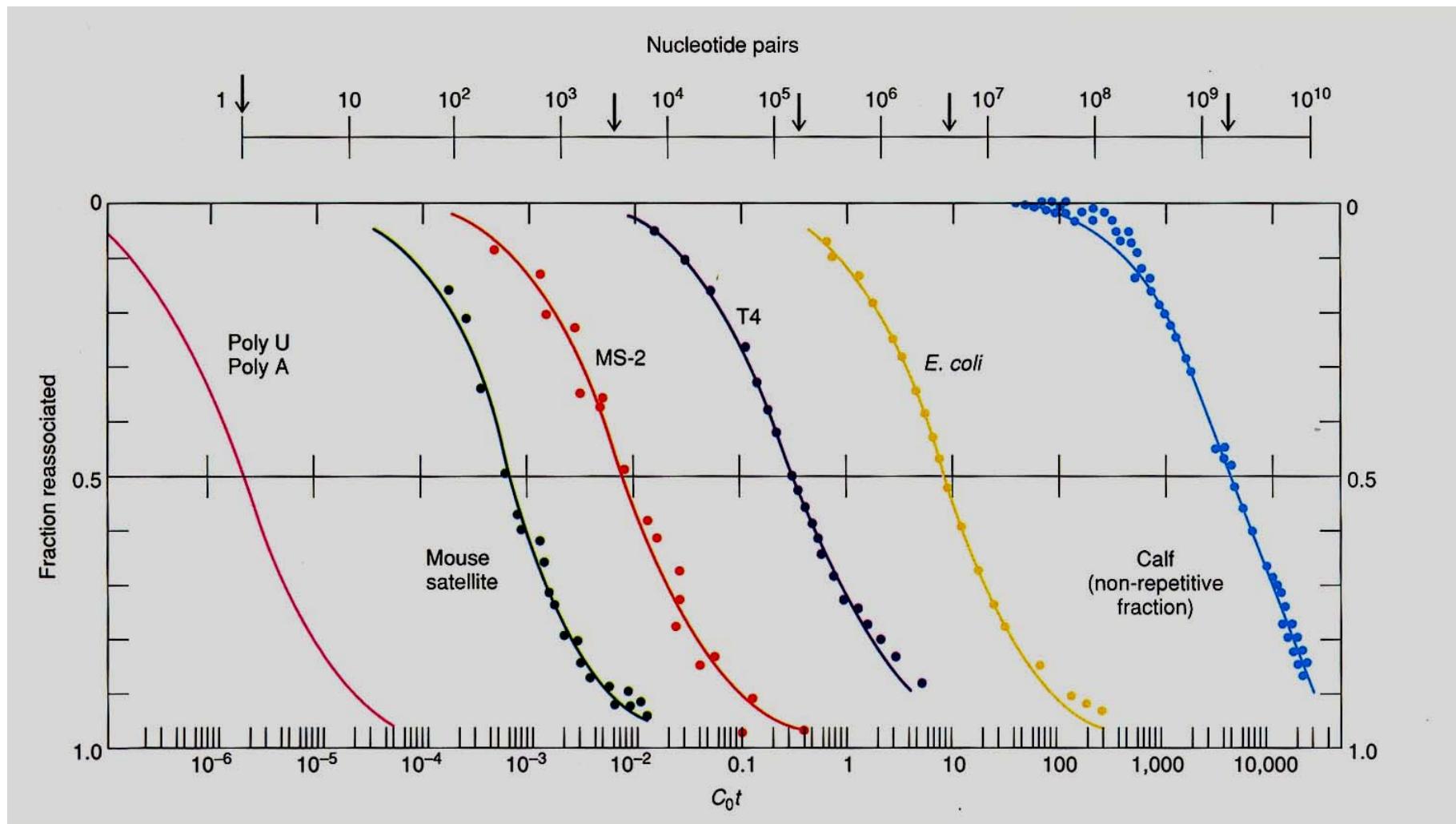
$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + k.C_0 t_{1/2}}$$

$$\text{Therefore } C_0 t_{1/2} = \frac{1}{k}$$

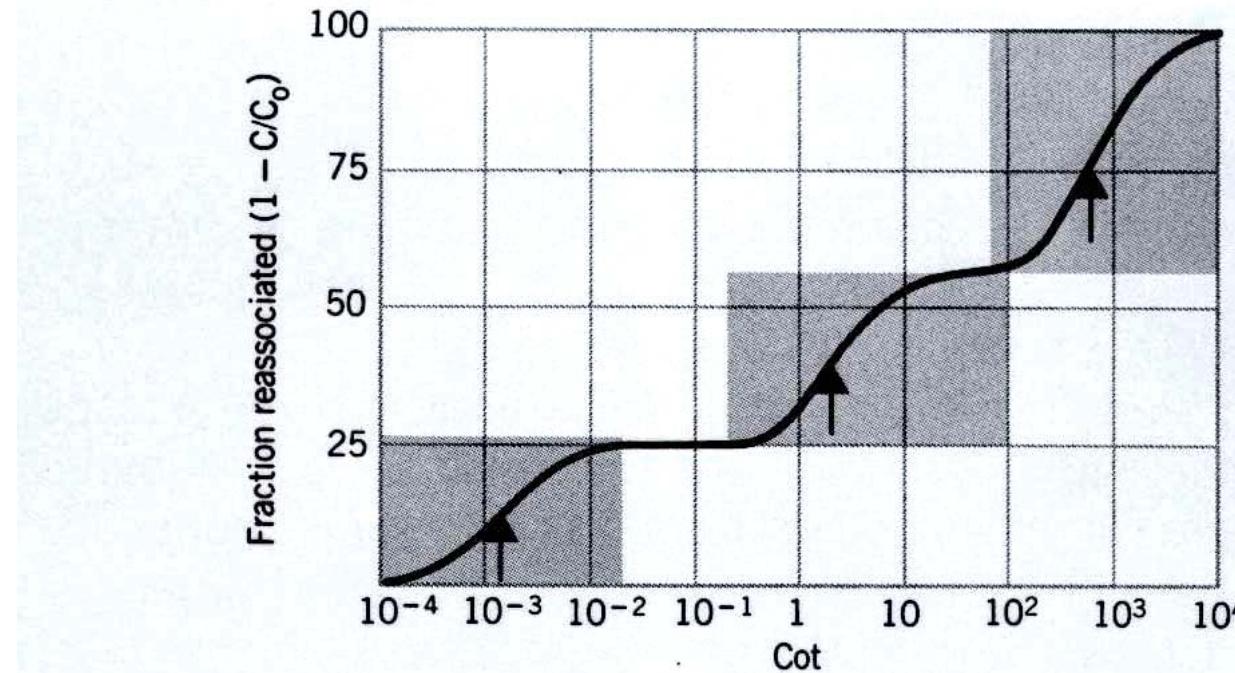
Der zeitliche Verlauf einer DNA-Reassoziation ergibt die C_0t -Kurve



Die Reassoziationsgeschwindigkeit ist ein Maß für die „Komplexität“ einer DNA



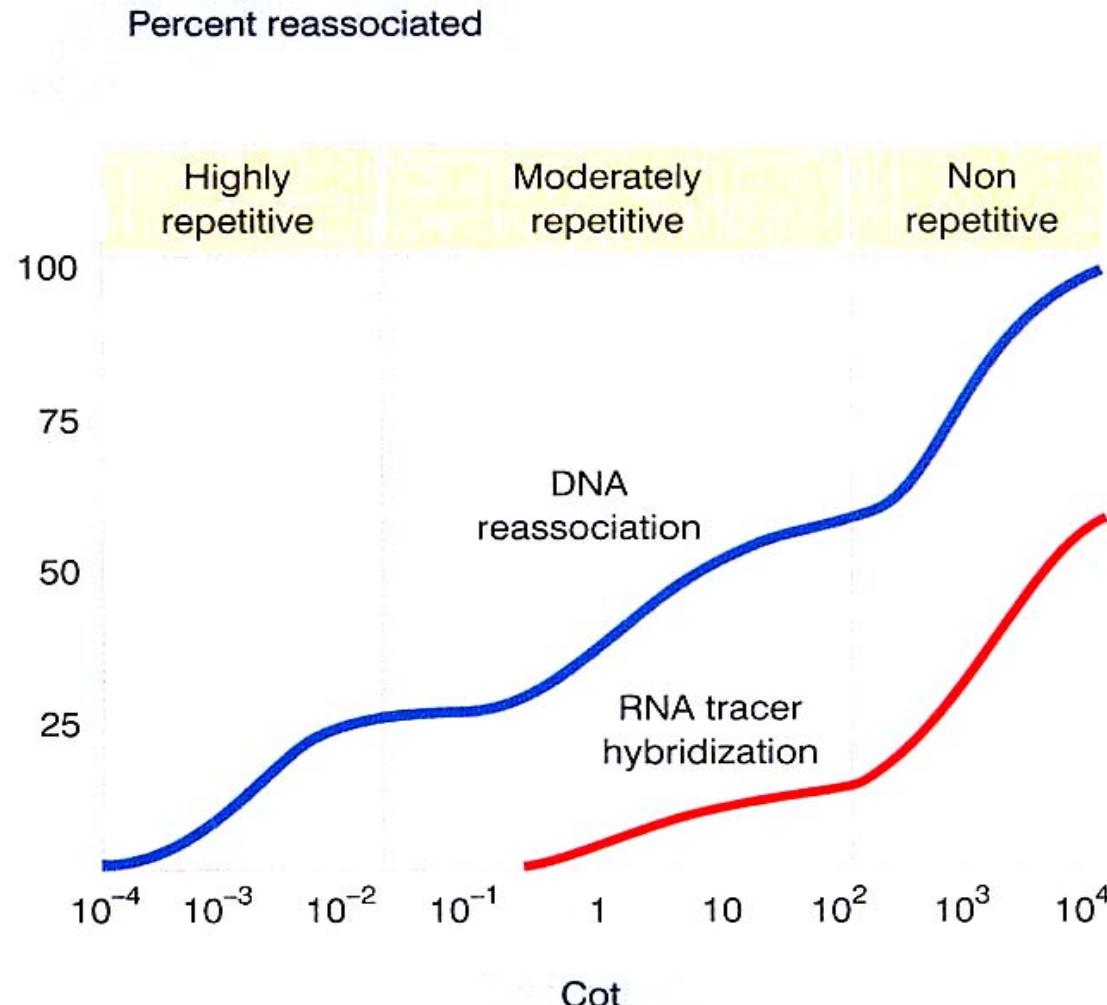
Eukaryotische DNAs zeigen eine „mehrstufige“ C_0t -Kurve



	Fast Component	Intermediate Component	Slow Component
Percent of genome	25	30	45
$Cot_{1/2}$	0.0013	1.9	630
Complexity, bp	340	6.0×10^5	3.0×10^8
Repetition frequency	500,000	350	1

Die unterschiedlich schnell
reassoziiierenden Fraktionen
entsprechen DNA-Elementen
mit unterschiedlichen
Repetitionsgraden

RNAs hybridisieren überwiegend zusammen mit der „single copy“ DNA



Die hochrepetitive DNA-Fraktion ($C_0 t^{1/2} < 0,01$):

Palindrome und „inverted repeats“ $C_0 t^{1/2} = 0$

Satelliten DNA $C_0 t^{1/2} < 0,01$

Die „sehr schnell“ reassozierende DNA-Fraktion ($C_0 t^{1/2} < 0,01$):

Die sehr schnell reassozierende DNA-Fraktion besteht aus mind. drei Komponenten

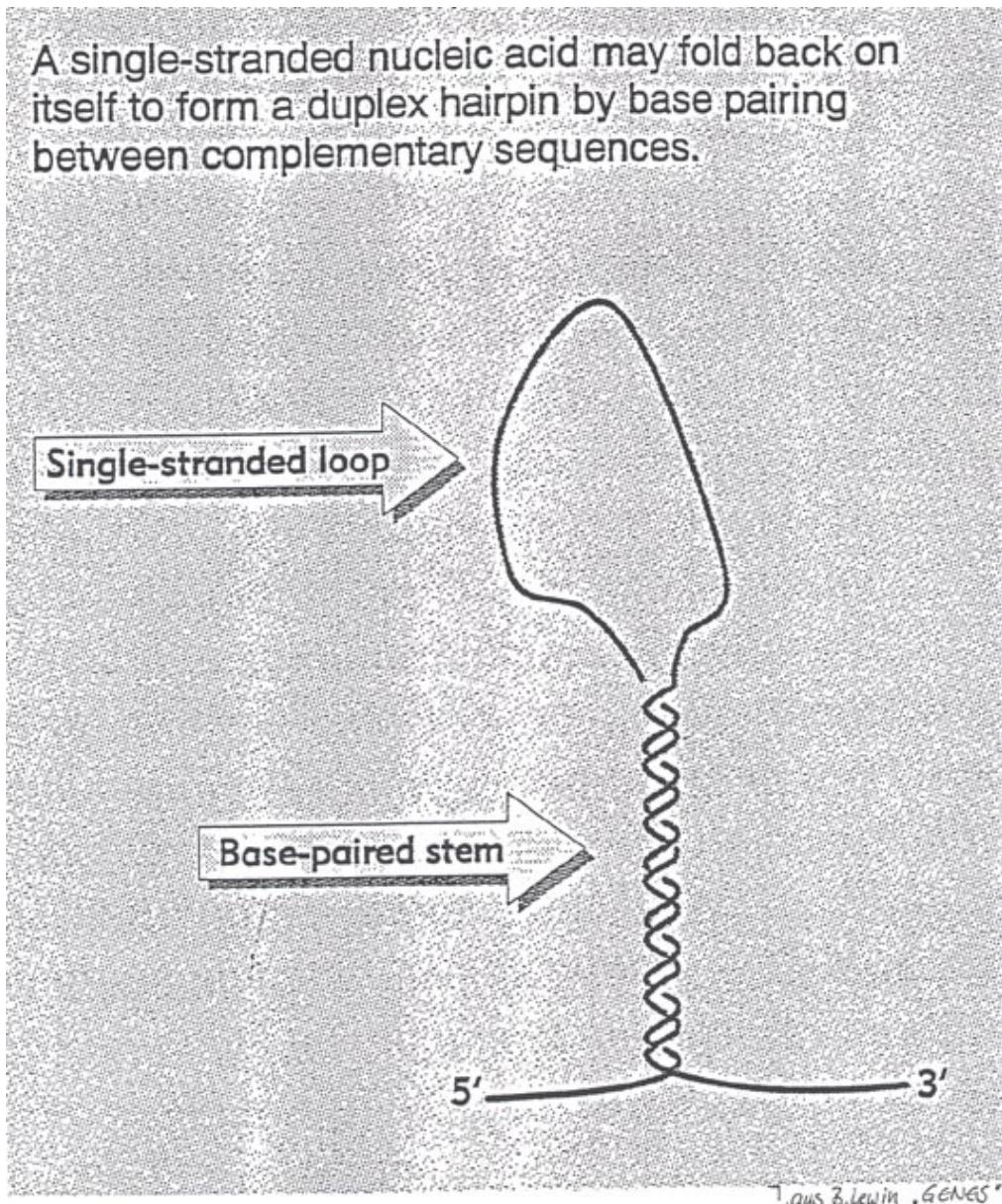
Palindrome und „inverted repeats“ $C_0 t^{1/2} = 0$

Satelliten DNA

Hochrepetitive, interspergierte DNA-Elemente

Palindrome und „inverted repeats“ können durch Rückfaltung eine Doppelhelix bilden:

A single-stranded nucleic acid may fold back on itself to form a duplex hairpin by base pairing between complementary sequences.



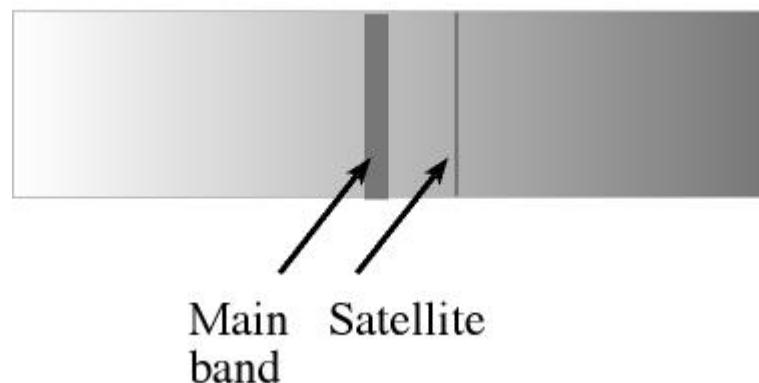
Die Rückfaltung ist unabhängig von der Diffusion und ist deshalb weder von der Zeit noch von der Konzentration der Einzelstrang-DNA abhängig.

Die Rückfaltung erfolgt daher mit einer sog. „Null-Kinetik“, d.h. mit so hoher Geschwindigkeit, dass ein zeitlicher Verlauf nicht messbar ist.

Die hochrepetitive DNA-Fraktion ($C_0 t^{1/2} < 0,01$):

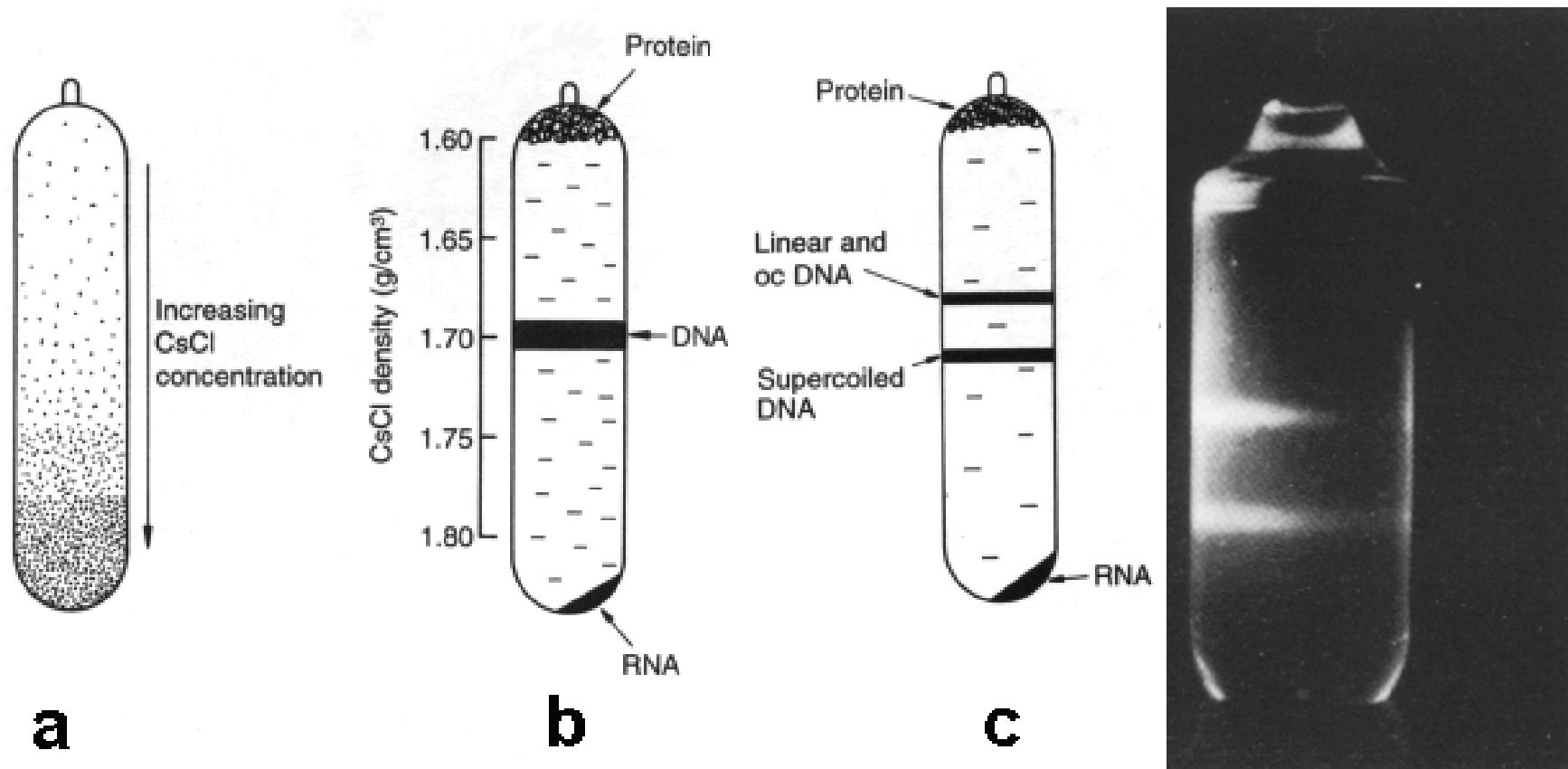
Satelliten DNA renaturiert
Mit einem $C_0 t^{1/2} < 0,01$

Satelliten DNA ist ursprünglich dadurch definiert, dass sie sich durch CsCl-Dichtgradientenzentrifugation von der Masse der DNA abtrennbar ist



CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Die DNA konzentriert sich im Dichtgradienten an der Position, die ihrer Schwebdichte entspricht



Die Schwebdichte einer DNA ist
abhängig von ihrer
Basenzusammensetzung und z. T.
von ihrer Konformation (ss od. ds)

Je höher der GC-Gehalt
umso höher ist die Schwebdichte

Die meisten Eukaryoten haben Satelliten-DNAs

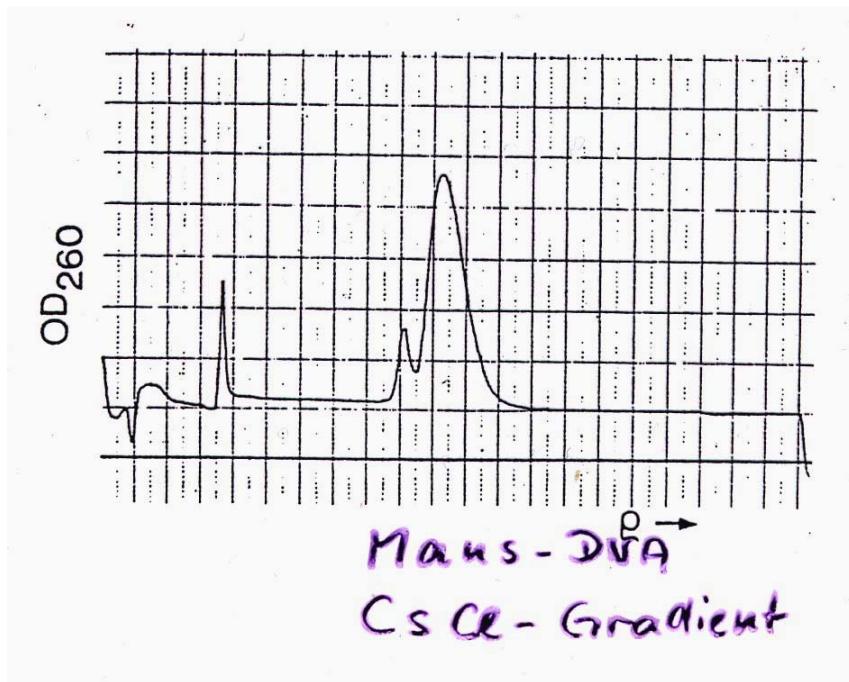
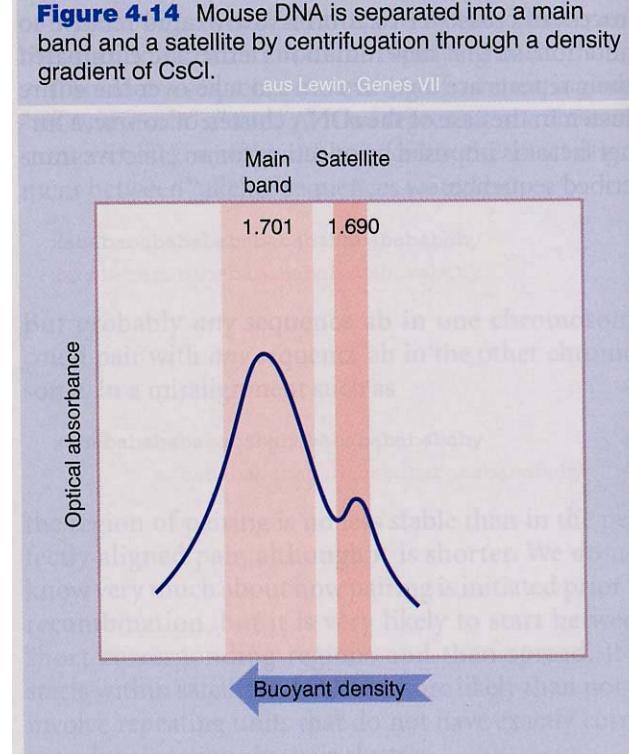
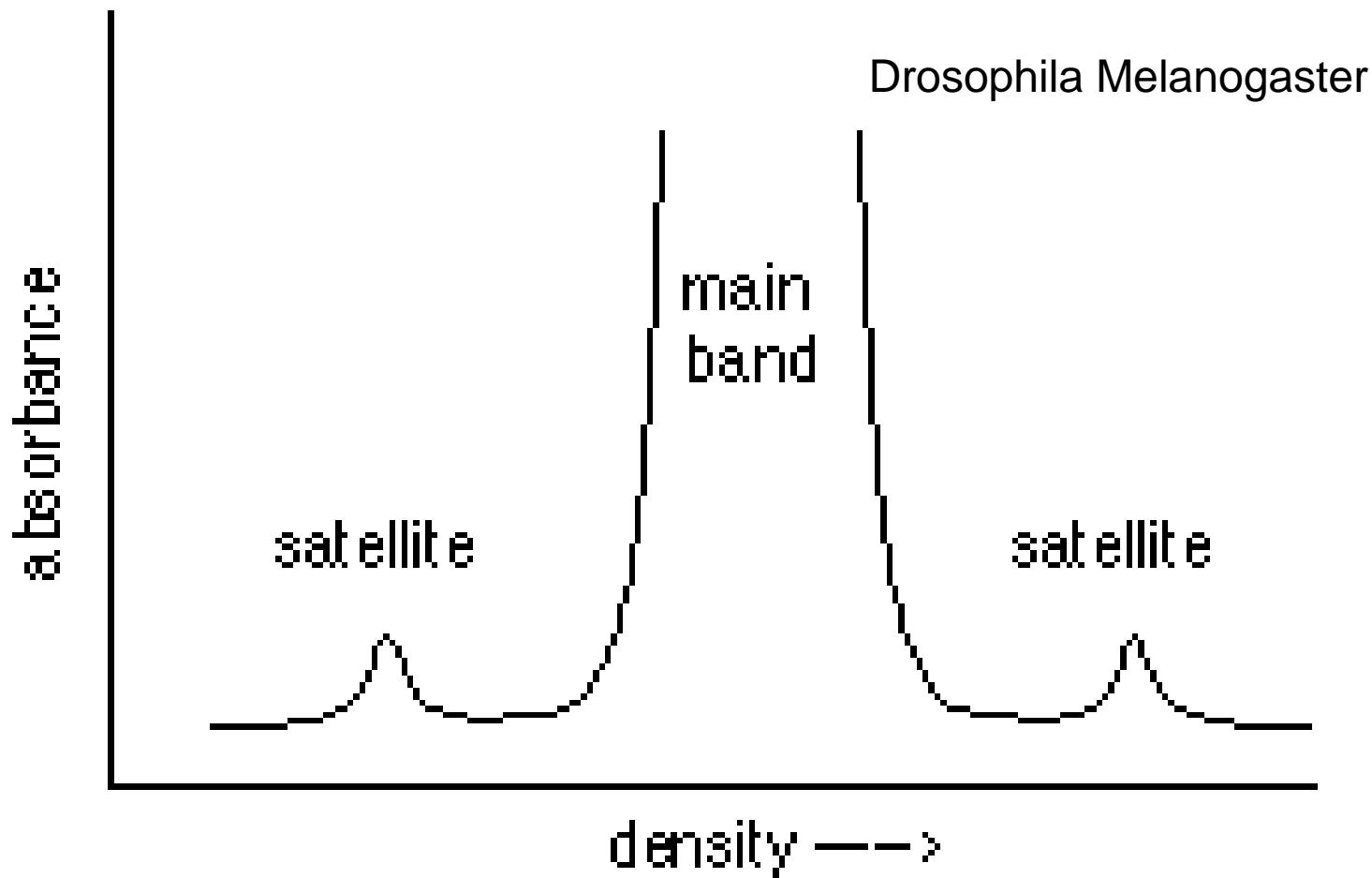


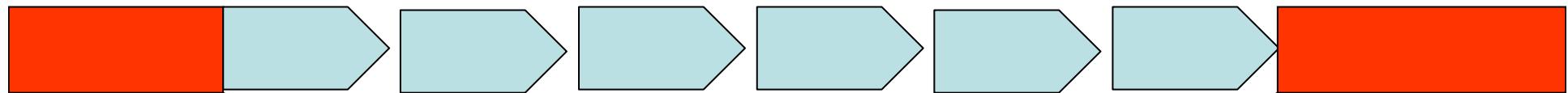
Figure 4.14 Mouse DNA is separated into a main band and a satellite by centrifugation through a density gradient of CsCl.
aus Lewin, Genes VII



Manche Organismen besitzen viele verschiedene Satelliten-DNAs



Satelliten-DNAs bestehen aus großen Clustern tandem repetitiver Elemente



„head-to-tail“ tandem repeats
z.T. in Millionen Kopien

Satelliten-DNAs werden heute in
Makro-, Mini- und Microsatelliten
unterteilt

Die Unterscheidung in diese Kategorien ist nicht eindeutig:
Unterscheidungskriterium ist i. A. die **Repeatlänge**

Makro-Satelliten-DNAs

Makrosatelliten haben typischerweise Repeats von 50 bis 5000 Bp Länge

z. B. der humane alpha-Satellit hat 172 bp

Oft sind Makrosatelliten-Repeats aus Sub-Repeats aufgebaut Beispiel Maus Major-Satellit:

Figure 4.17 The repeating unit of mouse satellite DNA contains two half-repeats, which are aligned to show the identities (in color).

The figure shows two rows of DNA sequence aligned horizontally. The top row starts at position 10 and ends at 110. The bottom row starts at position 120 and ends at 230. Colored boxes highlight identical nucleotides between the two rows. A yellow box highlights positions 10-110, and a pink box highlights positions 120-230. Positions are numbered along the top and bottom axes.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
GGACCTGGAATATGGCAGAAAAACTGAAAATCAOGGAAAATGAGAAAATACACACTT^GAGGACGTGAAATATGGCGAGAAA^ACTGAAAAAGTGAAAATTAGAAATGTCAC^TGTA
120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230
GGACGTGGAATATGGCAGAAAAACTGAAAATCA^TGGAAAATGAGAAA^CATCCACTTGACGACTGAAAATGAOGAA^ATC^ACTA^AAAAACGTGAAAAATGAGAAATGCAC^ACTGAA

Figure 4.18 The alignment of quarter-repeats identifies homologies between the first and second half of each half-repeat. Positions that are the same in all 4 quarter-repeats are shown in color; identities that extend only through 3 quarter-repeats are indicated by grey letters in the pink area.

The figure shows four rows of DNA sequence aligned vertically. The top row starts at position 10 and ends at 50. The second row starts at position 60 and ends at 110. The third row starts at position 120 and ends at 170. The bottom row starts at position 180 and ends at 230. Colored boxes highlight identical nucleotides between the rows. Pink boxes highlight positions where identities extend only through three quarter-repeats. Positions are numbered along the left and right axes.

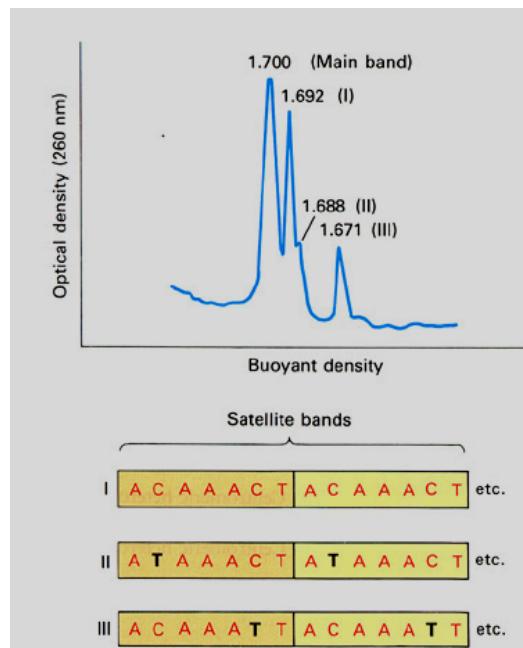
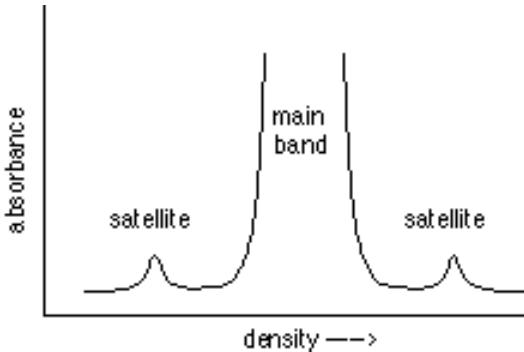
10 20 30 40 50
G G A C C T G G A A T A T G G C G A G A A A C T G A A A A T C C A C G G A A A A T G A G A A A T T A C A C A C T T T A
60 70 80 90 100 110
G G A C G T G G A A A T A T G G C G A G A A A C T G A A A A A G G T G G A A A A T T A G A A A A T G T C C A C T G T A
120 130 140 150 160 170
G G A C G T G G A A T A T G G C A A G A A A C T G A A A A T C C A T G G A A A A T G A G A A A C A T C C A C T T G A
180 190 200 210 220 230
C G A C T T G A A A A A T G A C G A A A T C A C T A A A A A C G T G A A A A A T G A G A A A T T G C A C A C T G A A

Makrosatelliten sind typischerweise im pericentrischen Heterochromatin lokalisiert



Figure 12-9 Autoradiographic localization of simple-sequence mouse DNA to the centromeres. A radioactive probe for simple-sequence DNA was added to chromosomes whose DNA had been denatured. (Note that all mouse chromosomes have their centromeres at one end.) (From M. L. Pardue and J. G. Gall, *Science* 168, 1970, 1356.)

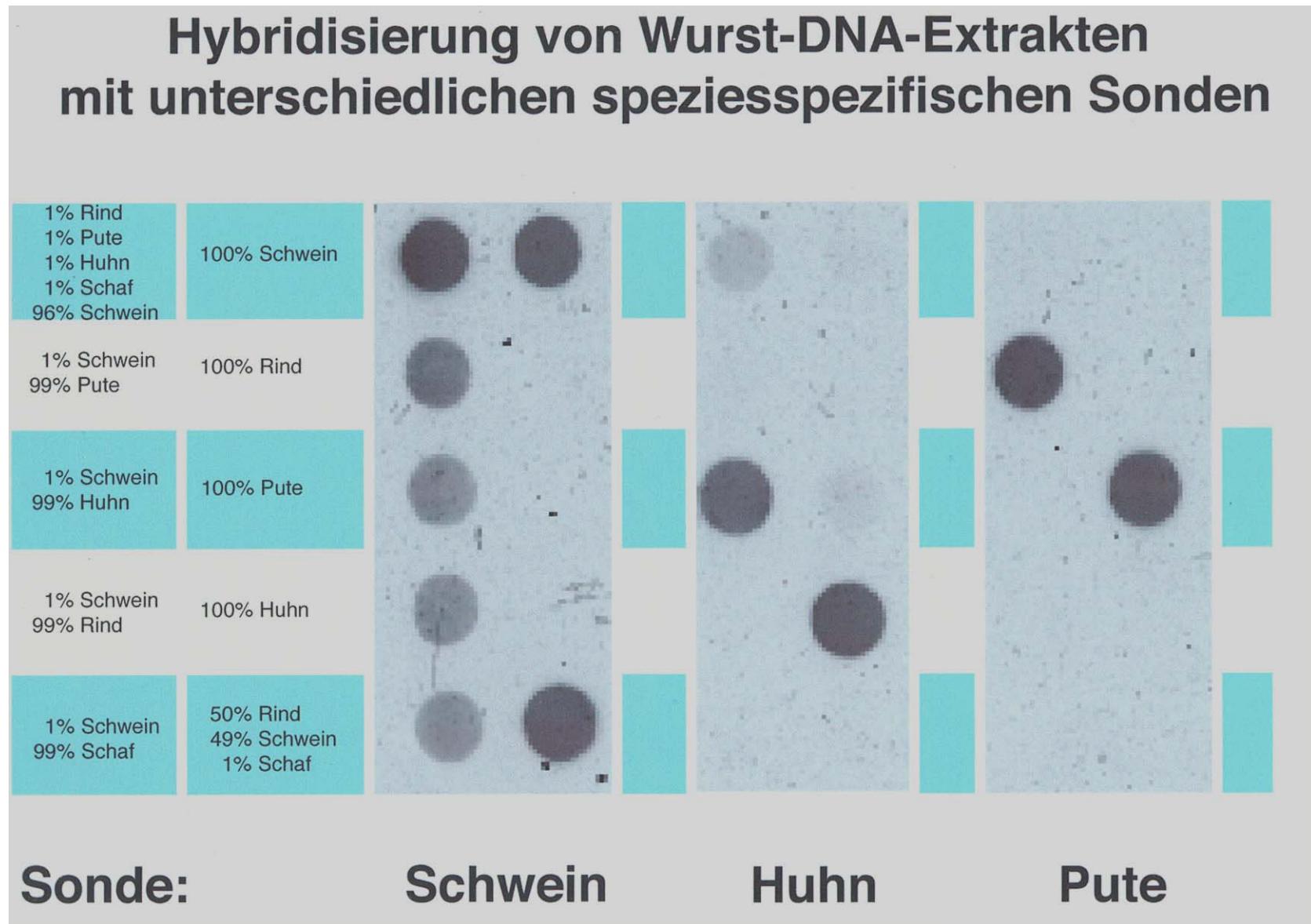
Nahe verwandte Arten können sich erheblich in ihrer Satelliten-DNA unterscheiden: *Drosophila melanogaster* und *D. virilis*



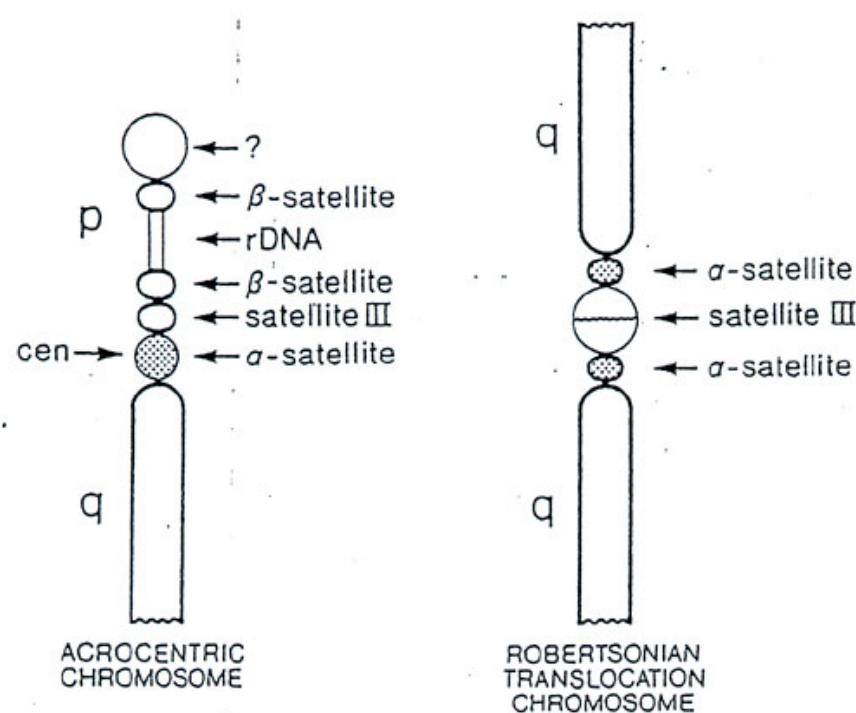
Nahe verwandte Arten können sich erheblich in ihrer Satelliten-DNA unterscheiden: *Chironomus thummi* und *Ch. piger*



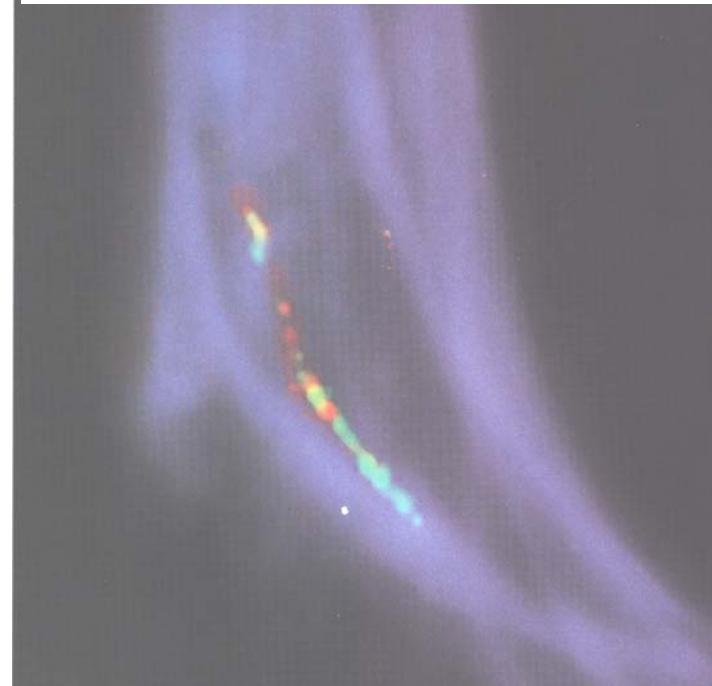
Arten können anhand ihrer Satelliten-DNA identifiziert werden: Anwendung in der Lebensmittelüberwachung



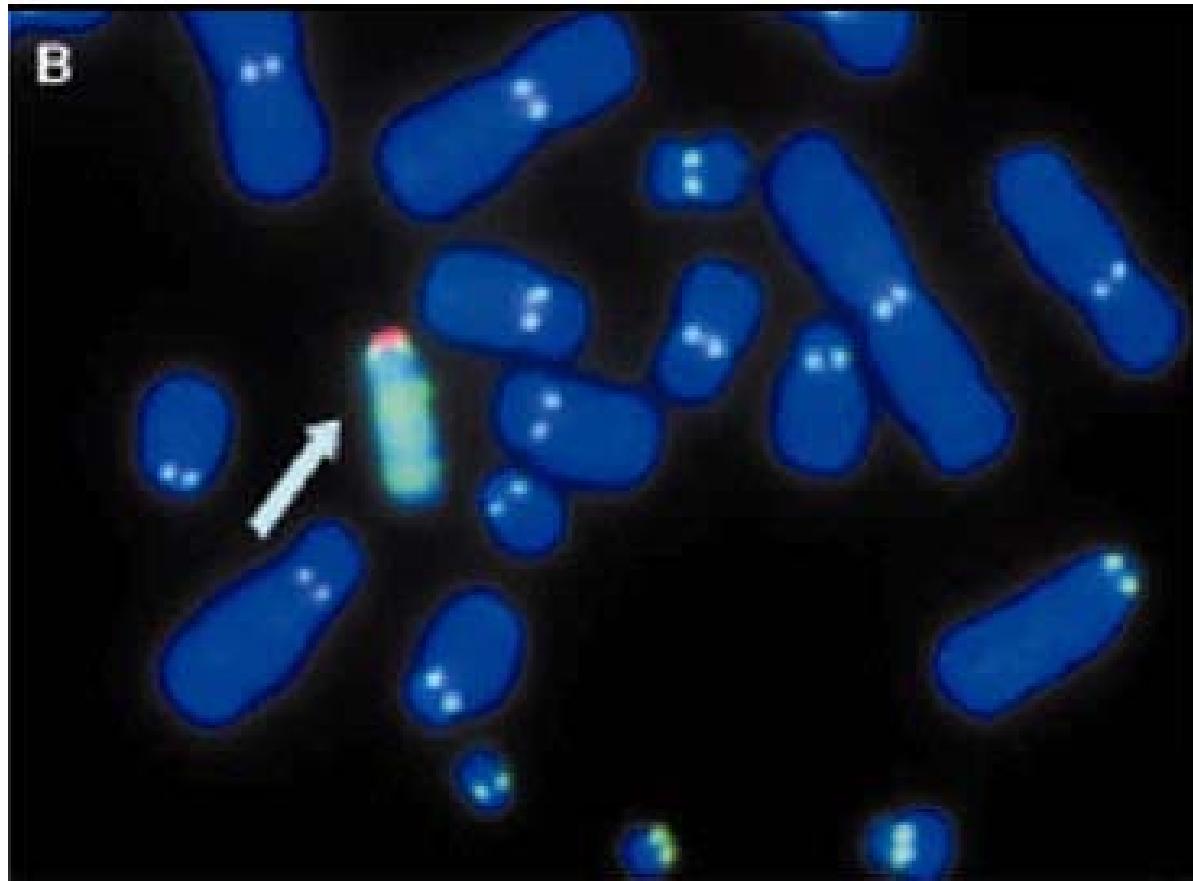
Die Centromerregionen sind aus einer komplexen Abfolge verschiedener Satelliten-DNAs aufgebaut: Beispiel Mensch



Multicolor In situ Hybridisierung
Versch. Sat-DNAs an
gespreiteten
Centromer



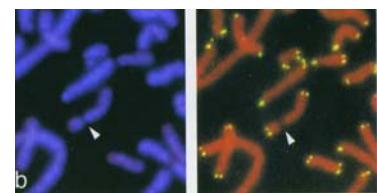
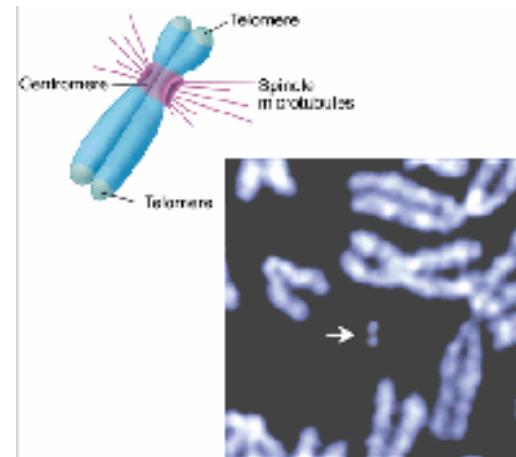
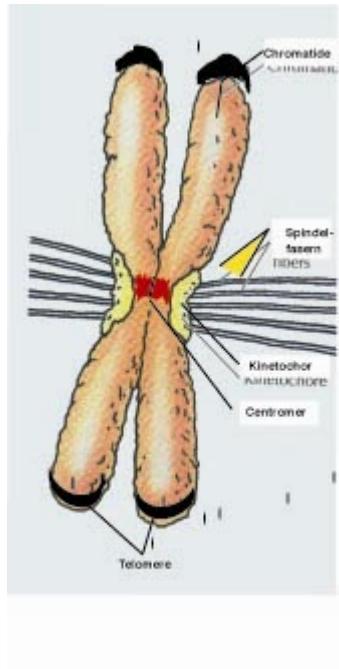
Die Funktion von Satelliten DNA ist nur partiell bekannt:
z.B. die humane **alpha-Sat-DNA** ist in der Lage,
Centromere zu bilden



Hamster/Mensch Hybridzelllinie, mit dem Humanchromosom 15 (Pfeil).
Die Centromere von Hamster und Mensch sind mit anti-Cen-Antikörper gefärbt
Der Human-alpha-Satellit ist durch insitu Hybrisierung rot dargestellt

Gyula Hadlaczky *Current Opinion in Molecular Therapeutics* (2001) 3(2):125-132

Mit Hilfe von **alpha-Satelliten-DNA** können
künstliche Chromosomen erzeugt werden



Mit Hilfe von alpha-Satelliten-DNA können künstliche Chromosomen erzeugt werden

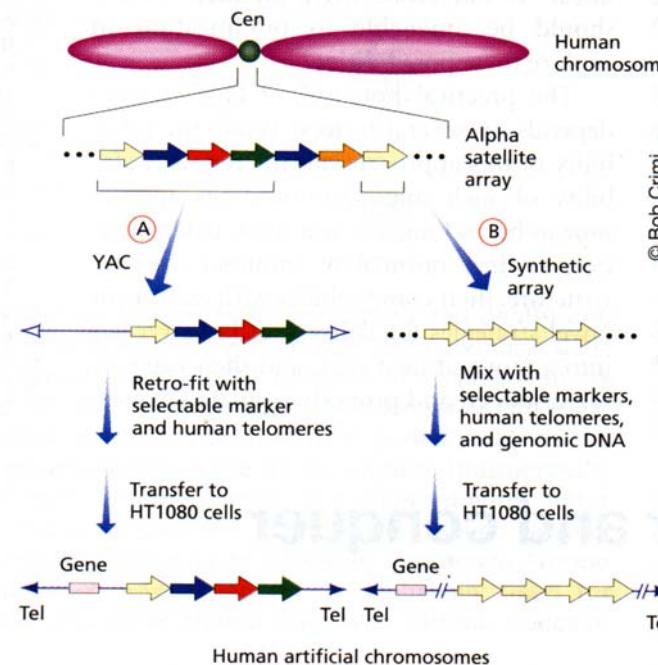
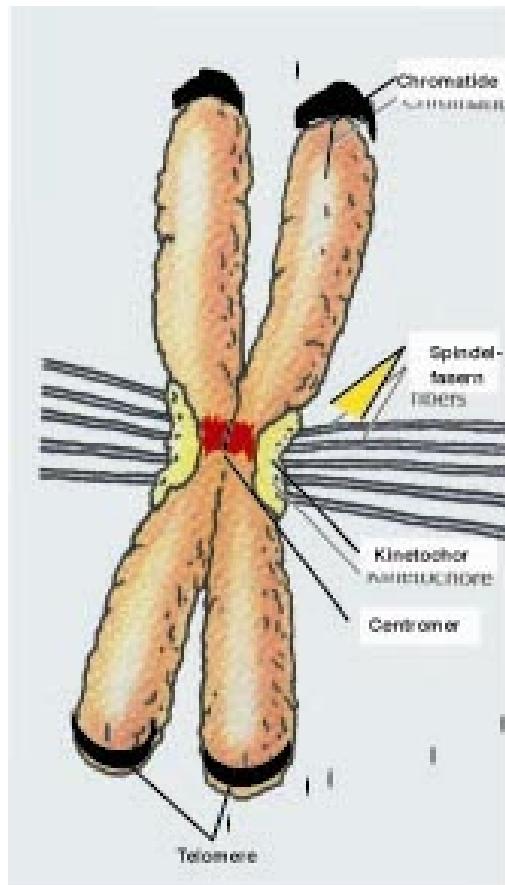
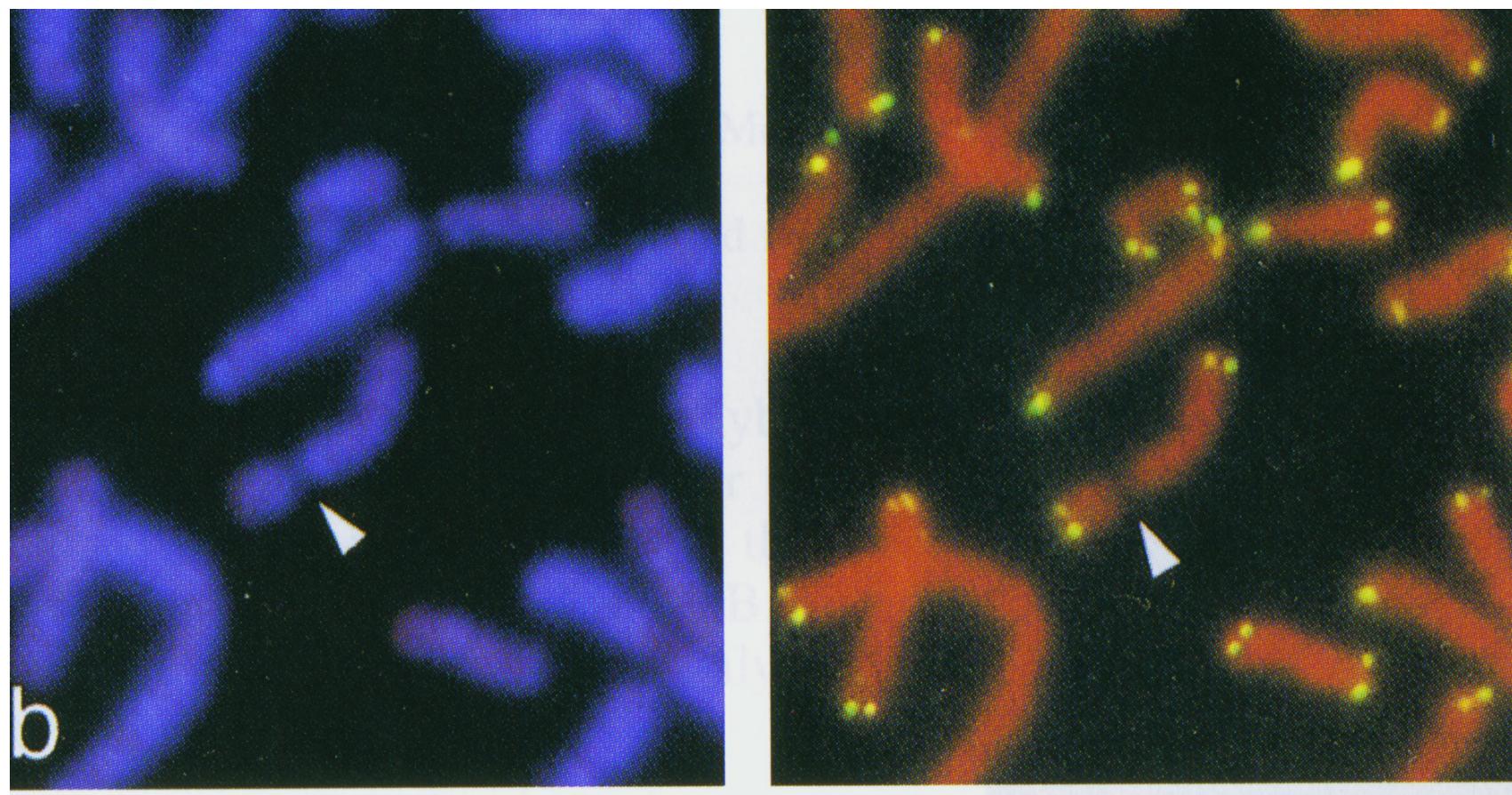
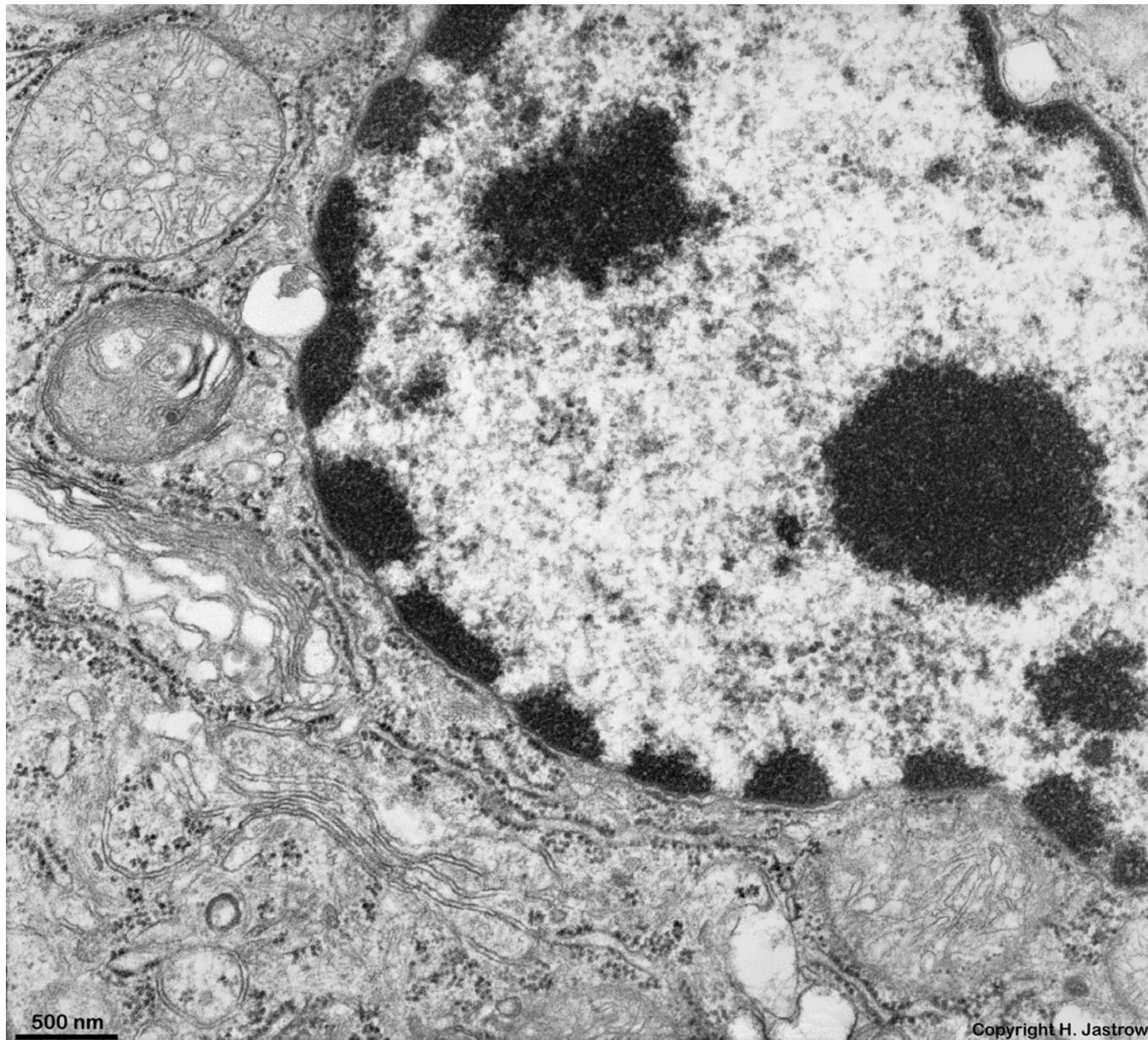


Figure 1. Schematic view of two strategies for formation of human artificial chromosomes (HACs). (A) Matsumoto and colleagues modified YACs containing human alpha satellite and generated HACs in human HT1080 cells at high efficiency. **(B)** Harrington et al.³ synthesized arrays of alpha satellite in vitro from a single copy of the repeat, mixed the synthetic arrays with other components, including genomic DNA, and generated several stable HACs, also in HT1080 cells³. In both strategies, the resulting HACs would ideally contain the sequences shown at the bottom.

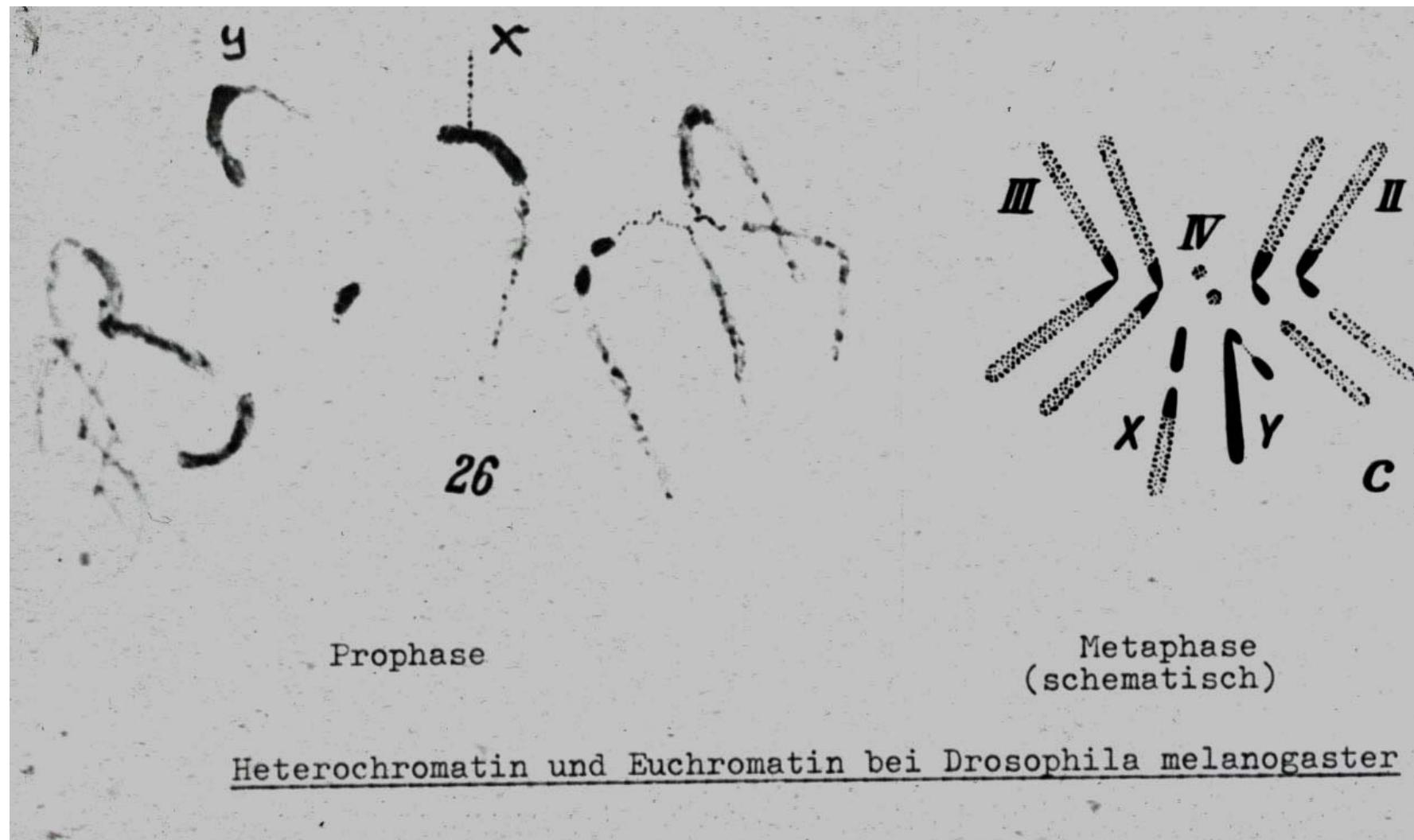
Nicht nur Centromere, sondern auch
Telomere enthalten tandem-repetitive DNA



Heterochromatin im EM



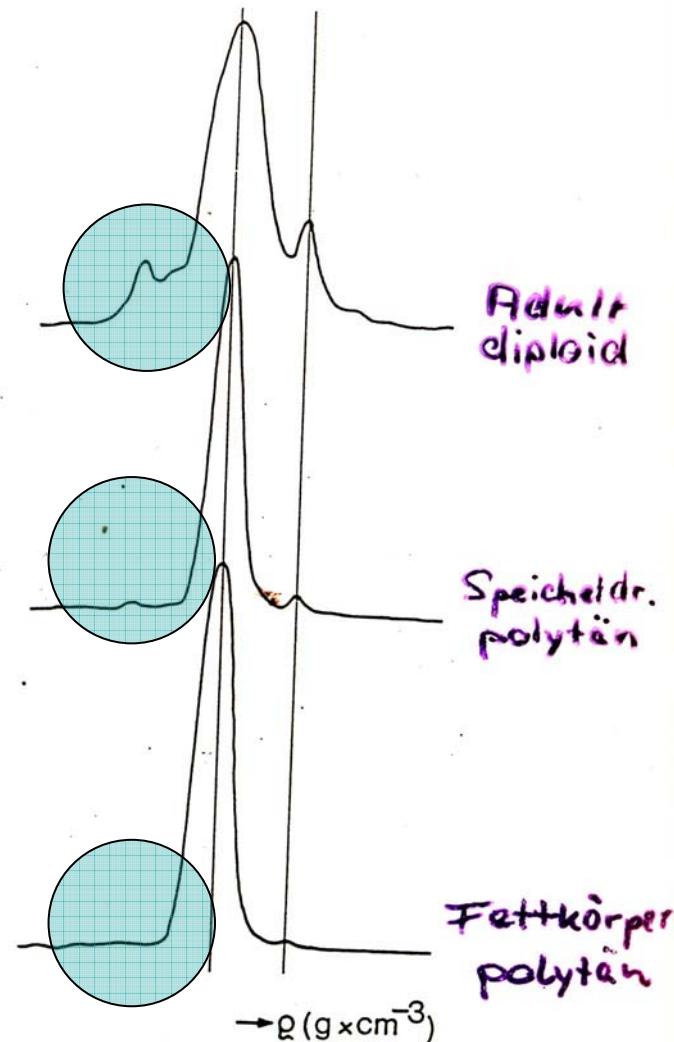
Heterochromatin ist inaktives Chromatin,
Es erscheint kondensiert und heteropyknotisch



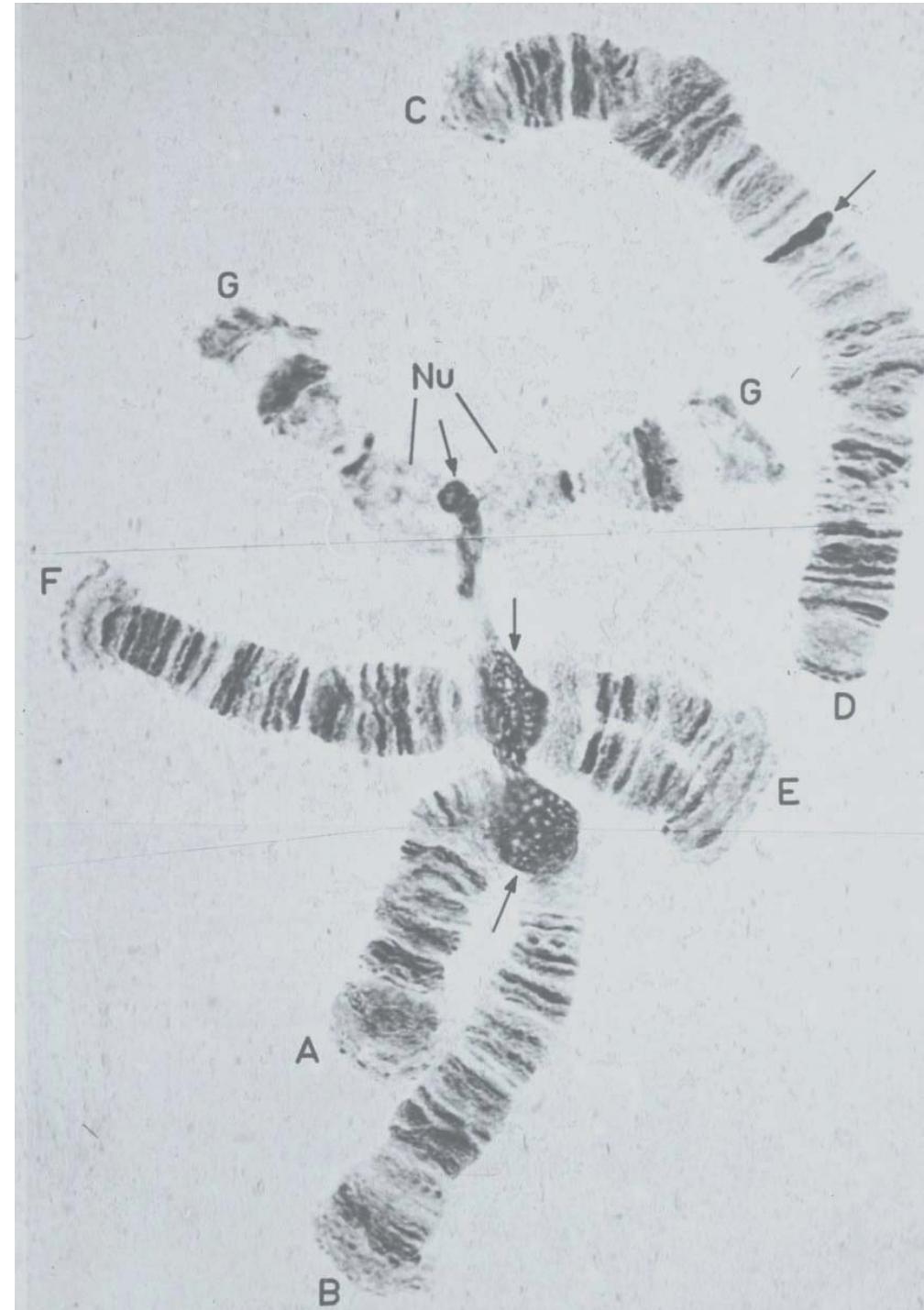
Heterochromatin ist inaktives Chromatin,
es wird häufig unterrepliziert,
Es wird unterschieden in alpha und beta H.



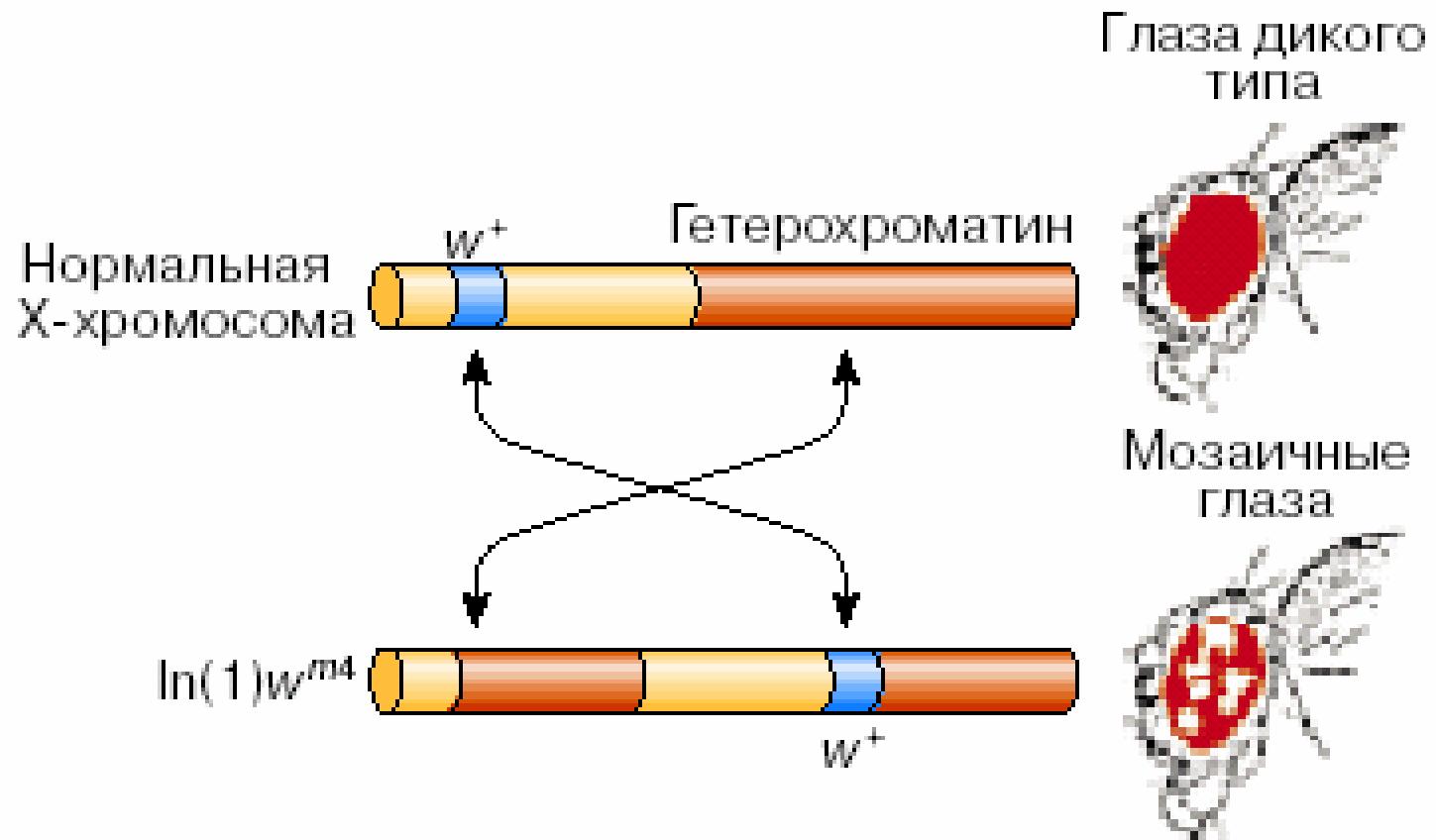
Die Unterreplikation von Heterochromatin zeigt sich im Fehlen von Satelliten-DNA in polytänen Geweben:



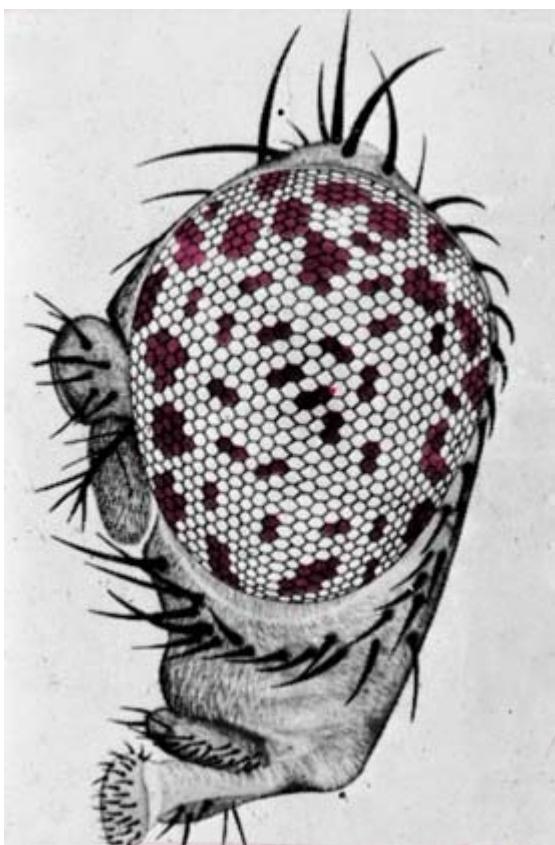
Heterochromatin
ist inaktives
Chromatin,
es wird häufig
unterrepliziert,
Manchmal aber
auch nicht:
Beispiel
Chironomus



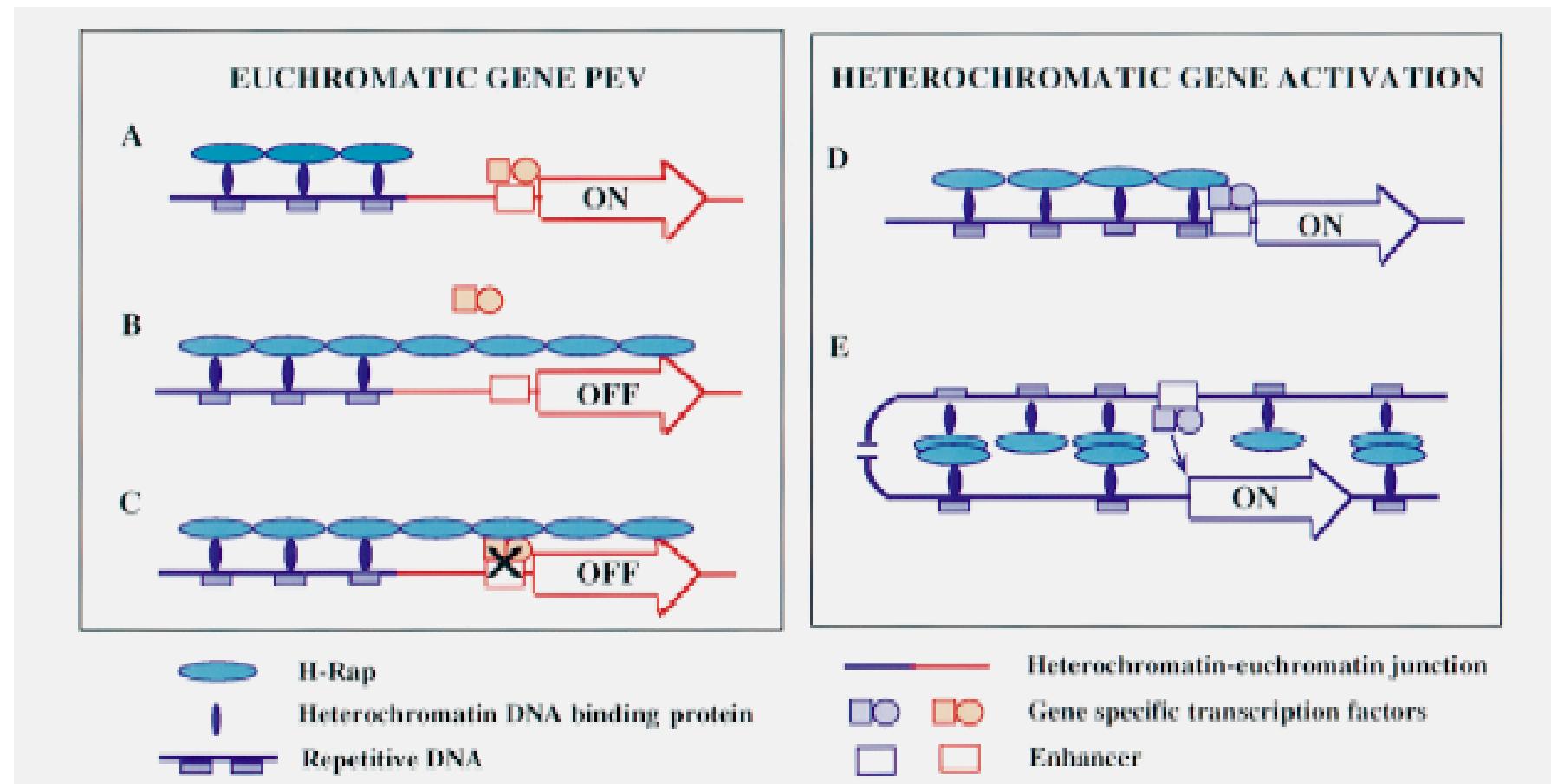
Heterochromatin verursacht Positions Effekt Variegation (PEV)



White mottled-4-Mutante



PEV-Entstehung



Mini –und Mikrosatelliten

Im Gegensatz zu Makrosatelliten handelt es sich bei Mikro- und Minisatelliten um relativ kurze Cluster mit kurzen bis extrem kurzen Repetitionseinheiten

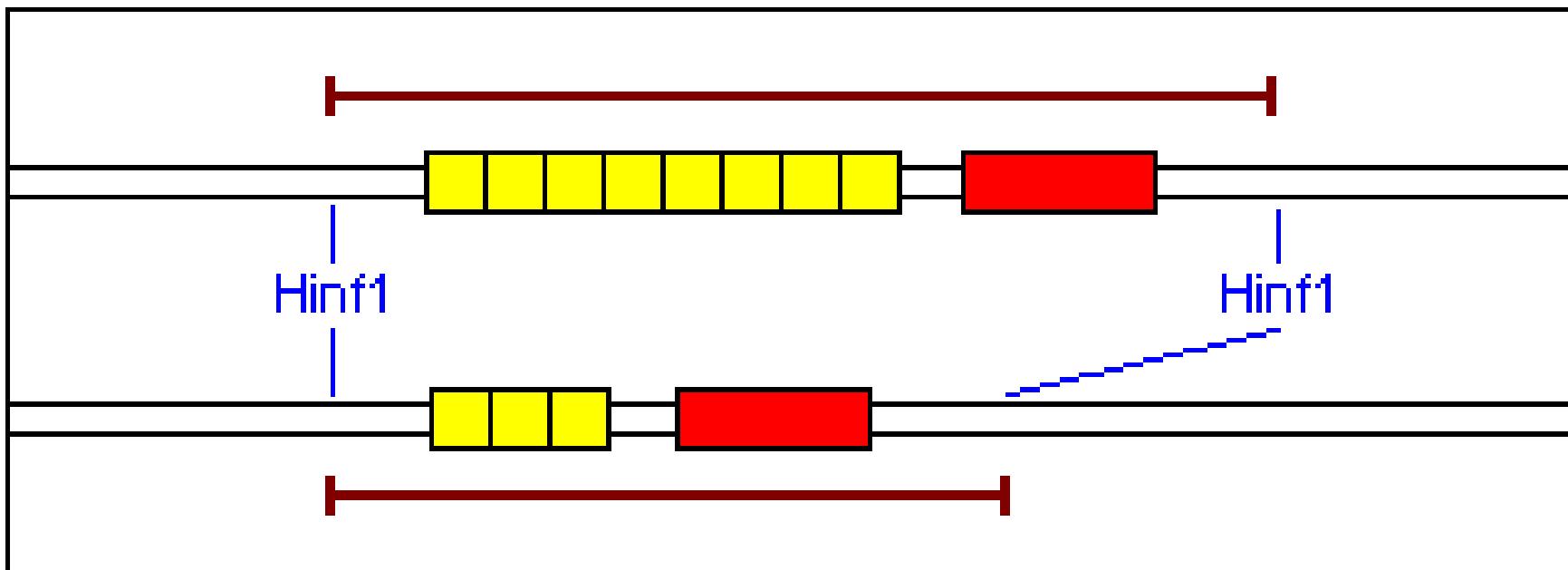
Die Cluster sind im Euchromatin interspersiert:



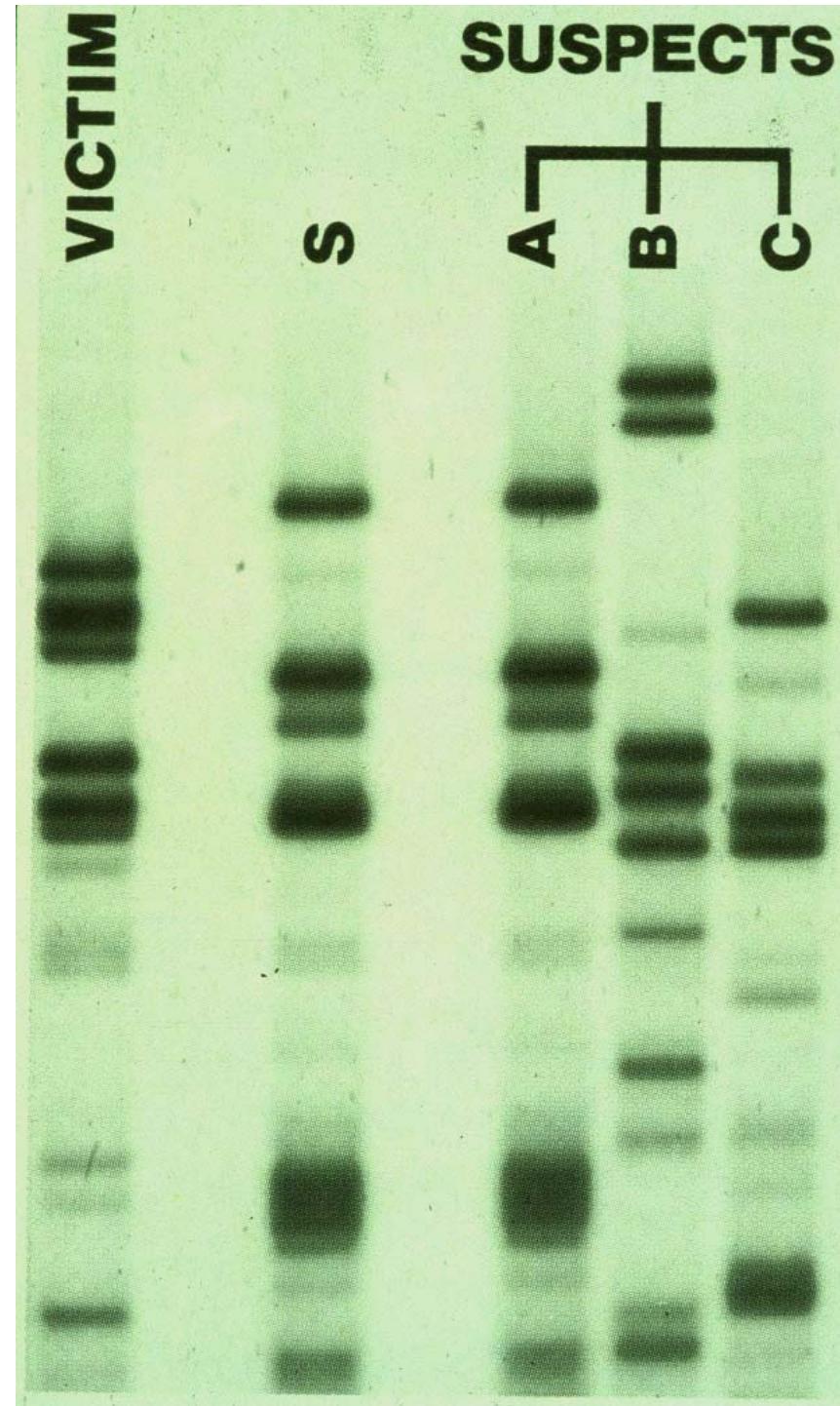
Mini –und Mikrosatelliten

Mini- und Mikrosatelliten variieren in der
Zahl der Repeats pro Lokus
auch genannt:

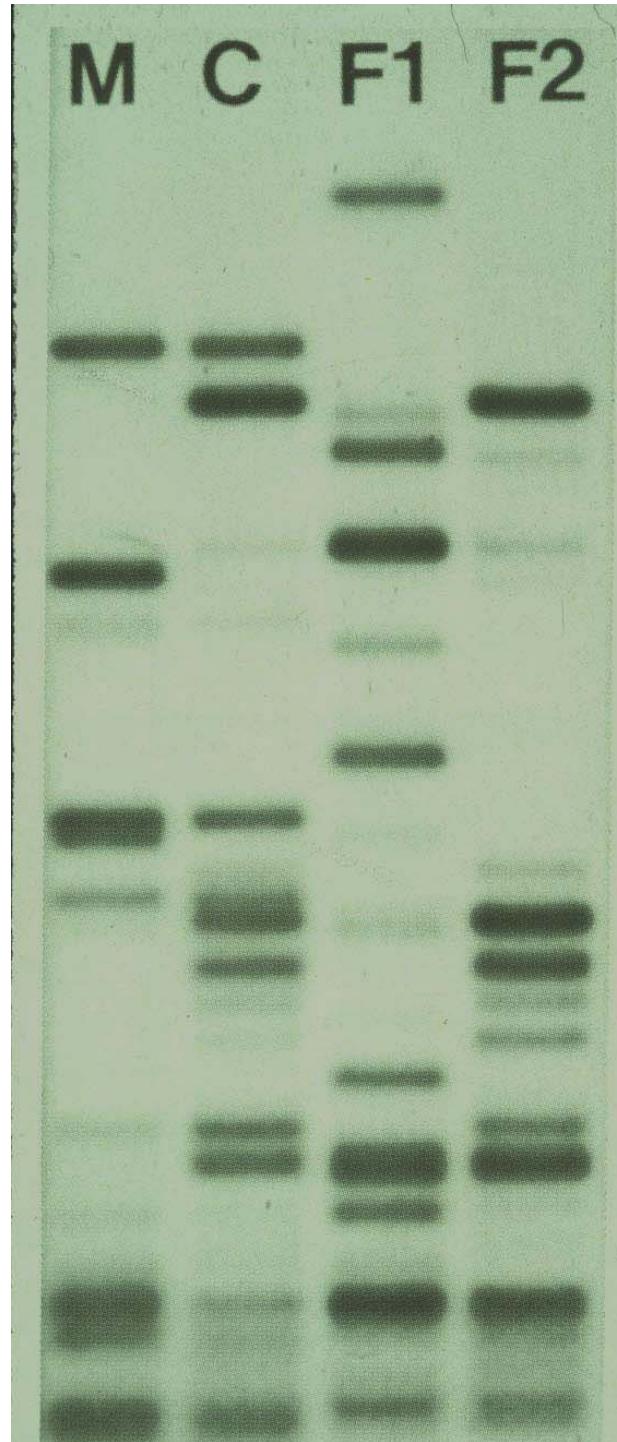
VNTR= variable number of tandem repeats



Mini- und
Mikrosatelliten
können wegen
ihrer
hoch-
polymorphen
Struktur zum
DNA-
Fingerprinting
eingesetzt
werden:



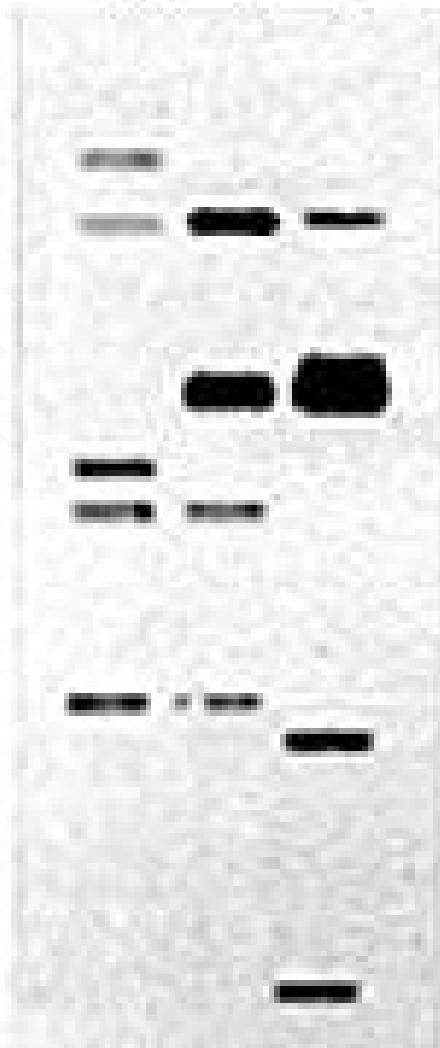
Mini- und
Mikrosatelliten
können wegen
ihrer
hoch-
polymorphen
Struktur zum
DNA-
Fingerprinting
eingesetzt
werden:



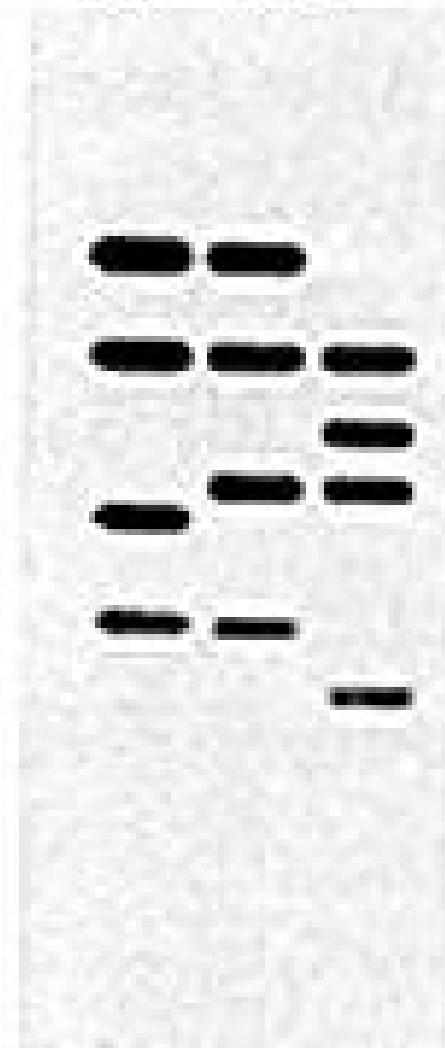
Vaterschaftsbestimmung

Probe Set 1 Probe Set 2

M C F

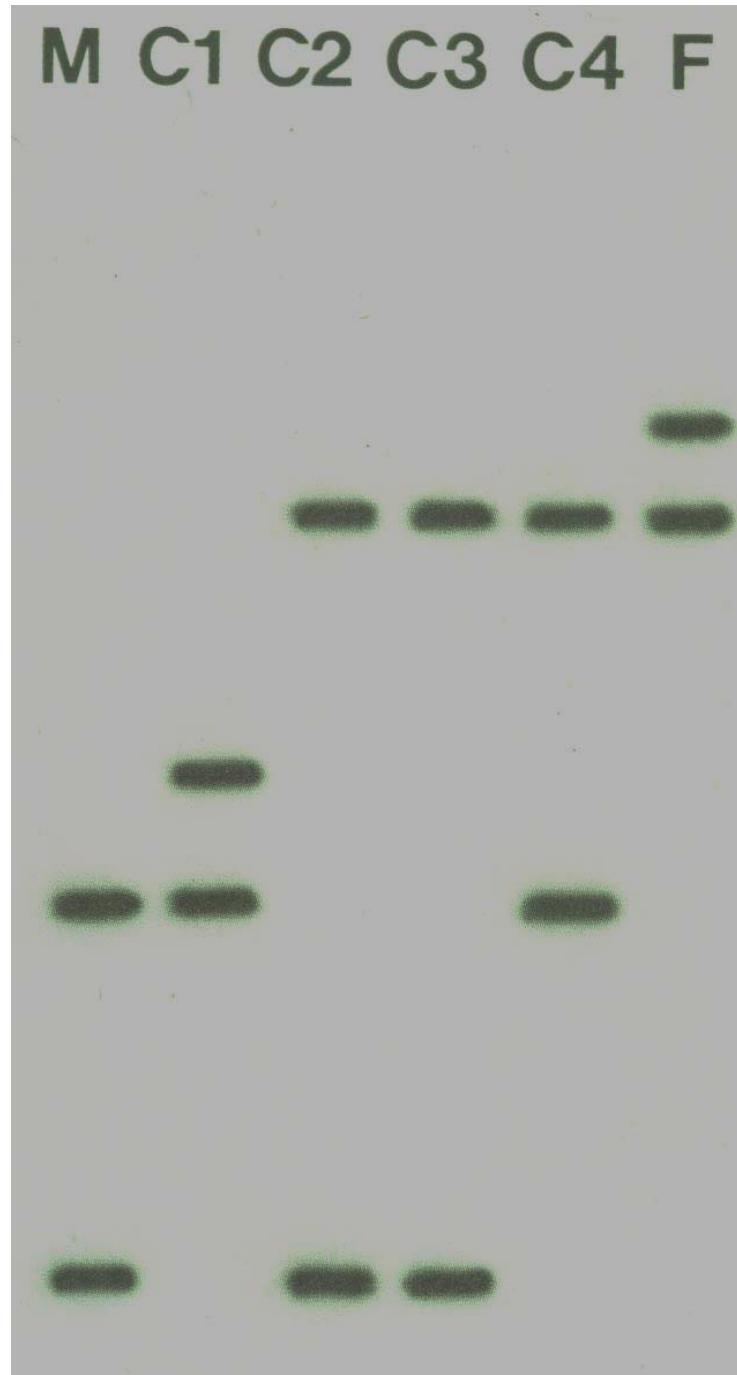


M C F



M C1 C2 C3 C4 F

Eindeutig?



Gentests in der Kritik

Frankfurter Allgemeine Zeitung 03.2003

Gene in falschen Händen

Europäische Studie: Mit Gentests wird liederlich umgegangen

Mehr als 730 000 Gentests, nicht einge-rechnet die Abertausenden Vaterschafts-tests und die in immer größerer Zahl gefor-derten Erbgutanalysen von Rechtsmedizi-nern in Strafprozessen, sind im vergange-nen Jahr in Europa vorgenommen worden. Ein gewaltig expandierendes Medizingewer-be. Und ein zunehmend undurchsichtiges, mit Qualitätsmängeln und vielen Fragezei-chenen verschehen Gewerbe, wie ein vor wenigen Tagen vom Joint Research Centre der Europäischen Kommission vorgestellter Be-richt klarstellt. Dabei geht es keineswegs um die moralischen, datenschutzrechtlichen oder sonstwie juristischen Fragen, die die massenhafte Anwendung medizinischer Gentests mit sich bringt. Bemängelt wird viel mehr in einer selten so nachdrücklich wie klar formulierten Weise der zuweilen laxen Umgang mit der Gendiagnostik in zahl-reichen europäischen Labors und Kliniken. Die Entwicklung könnte nach Ansicht der Autoren, wenn nicht bald etwas Durch-greifendes bei der Qualitätssicherung ge-schieht, angesichts der enormen Wachs-tumsraten rasch aus dem Ruder laufen.

Die Defizite werden nicht zum ersten Mal angesprochen. Vor einem halben Jahr

Natur und Wissenschaft

Weitere Berichte täglich auf der zweiten Seite des Feuilletons

schon hatte die Deutsche Forschungsge-meinschaft in einer Stellungnahme zur prä-diktiven genetischen Diagnostik eine ver-besserte, gesetzlich geregelte Qualitätssiche- rung eingefordert. Adressat war seinerzeit vor allem das Bundesgesundheitsministe-rium, das seit fast drei Jahren an einem „Gen-test-Gesetz“ bastelt. Doch wie in dem ursprünglichen Eckpunktepapier beschränkt man sich in dem noch immer weitgehend geheimgehaltenen Referentenentwurf dar-auf, bei der Qualitätssicherung auf den so-ge-nannten „Arztvorbehalt“ zu bauen. Da-bei geht es darum, sicherzustellen, daß ge-ne-tische Untersuchungen „nur durch hier-für qualifizierte Ärztinnen und Ärzte veran-laßt werden“ und die „Durchführung nur auf deren Veranlassung nach fachlicher Weisung unter ihrer Aufsicht oder durch eine von ihr beauftragte und dafür qualifi-zierte Person oder Organisation“ zu erfolgen habe. Das Ergebnis der Untersuchungen darf zudem „dem genetisch untersuchten nur durch den veranlassenden Arzt mitge-teilt werden“.

Daß sich allein mit solchen Anforderun-

Frankfurter Allgemeine Zeitung 03.2003

Gene in falschen Händen

Europäische Studie: Mit Gentests wird liederlich umgegangen

Mehr als 730 000 Gentests, nicht einge-rechnet die Abertausenden Vaterschafts-tests und die in immer größerer Zahl gefor-derten Erbgutanalysen von Rechtsmedizi-nern in Strafprozessen, sind im vergange-nen Jahr in Europa vorgenommen worden. Ein gewaltig expandierendes Medizingewer-be. Und ein zunehmend undurchsichtiges,

Segmenten ein kleiner Posten. Nur etwa 15 Prozent der mehr als 750 Laboratorien, die Gentests anbieten, werden auf kommerziel-ler Basis betrieben. Mehr als die Hälfte gehört zu öffentlichen Krankenhäusern. In Deutschland, das mit etwa 90 Labors euro-paweit einen der vorderen Plätze ein-nimmt, sind allerdings schon annähernd die Hälfte davon in privaten Händen.

Kommerzialisierung freilich, das hat die von den Wissenschaftlern in 21 Ländern vorgenommene mehrstufige prospektive Studie verdeutlicht, gibt offenbar nur dort Anlaß zur Sorge, wo die Patentierung gene-tischer Sequenzen oder ganzer Testfahnen die Preise unangemessen in die Höhe zu treiben droht. Noch aber sind die Preise nach Ansicht der Experten mit durch-schnittlich rund 573 Euro pro Test recht moderat. Die Preisunterschiede allerdings ha-ben den grenzüberschreitenden „Test-Tou-rismus“ wohl schon angeheizt. Wenn etwa ein Gentest in der Schweiz im Schnitt fast 700 Euro, in Großbritannien und Belgien aber knapp 200 und in Kroatien gar nur 100 Euro kostet, ist der Anreiz groß, die Probe ins Ausland zu schicken. Viele Labore, in ei-ner zitierten OECD-Studie annähernd die Hälfte, gaben in Befragungen an, Proben aus dem Ausland zu bearbeiten. Dieser Test-Tourismus wird noch dadurch geför-dert, daß Gentests für viele der Hunderte von Krankheiten, für die mittlerweile eine molekulargenetische Diagnose erhaltlich ist, nur in bestimmten Ländern angeboten werden. Die meisten Gentests, fast 200 000, wurden im Jahr 2001 in Italien vorgenom-men. Es folgten Großbritannien mit rund 60 000 und Belgien mit etwa 50 000.

Wie sorgfältig aber dort und anderswo gearbeitet wird, läßt sich nach den Untersu-chungen der europäischen Forschergruppe kaum ermessen. Denn die wenigsten Laboratori-en kümmern sich ihren Ermittlungen zufolge um ein adäquates Qualitätsmanage-ment. Nirgendwo in der Europäischen Union gibt es eine Akkreditierungspflicht. Die Teilnahme an nationalen Programmen zur Qualitätssicherung, wie es vor einiger Zeit etwa in Deutschland für bestimmte Krank-heiten initiiert wurde, sei bestenfalls „frag-menarisch und unvollständig“. Annähernd die Hälfte der untersuchten Labore unter-liegt keinerlei offiziellen Prüfungen, und mehr als ein Drittel bietet Tests an, deren Güte durch keinerlei externe Qualitätsprü-fung – der „Goldstandard“ der Qualitätssi cherung – belegt ist. Hinzu kommt, daß in verschiedenen Ländern völlig unterschied-liche Maßstäbe an die Anforderungen solcher Laboratori-en und an die Ausbildung des Personals gestellt werden. Von der Test-flut werden auch die Datenbanken, die ver-schiedentlich von nationalen Fachorganisa-

Mikrosatelliten, sog. **Triplett-Repeats** sind eine häufige Ursache genetisch bedingter Krankheiten

z. B. Chorea Huntington (Veitstanz)
oder Fragiles X-Syndrom

Dabei handelt es sich um instabile Anzahl von 3-Basen-Repeats in Genen,
Dies kann sowohl im codierenden wie auch im nicht-codierenden Bereich sein

Beispiel Fragiles X-Syndrom

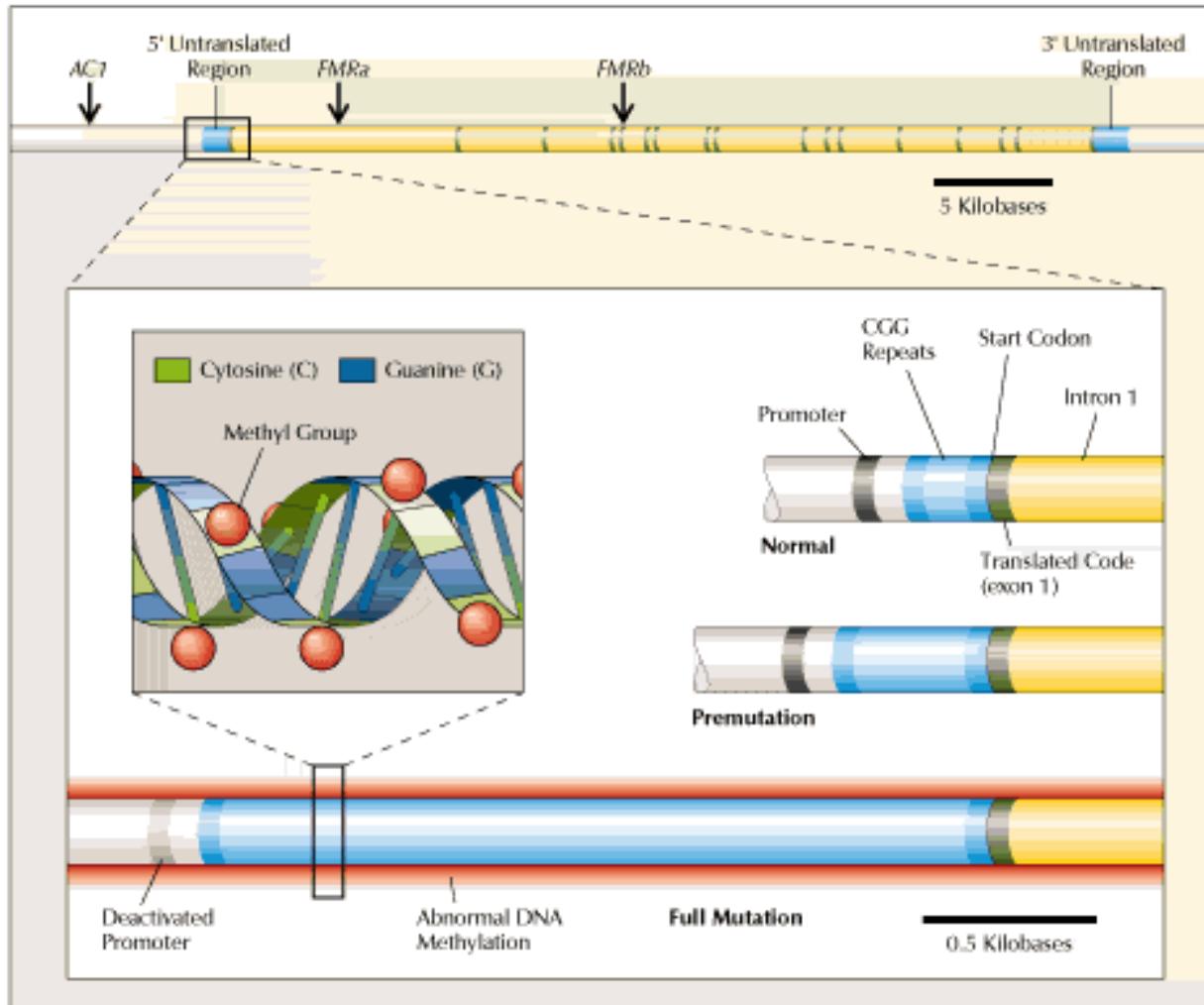
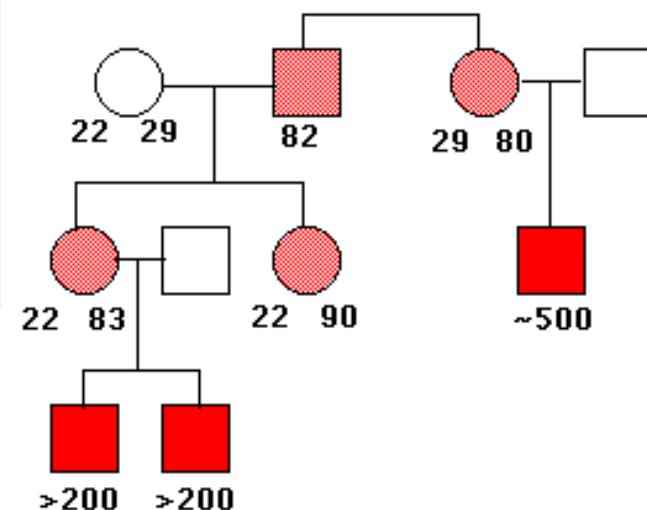
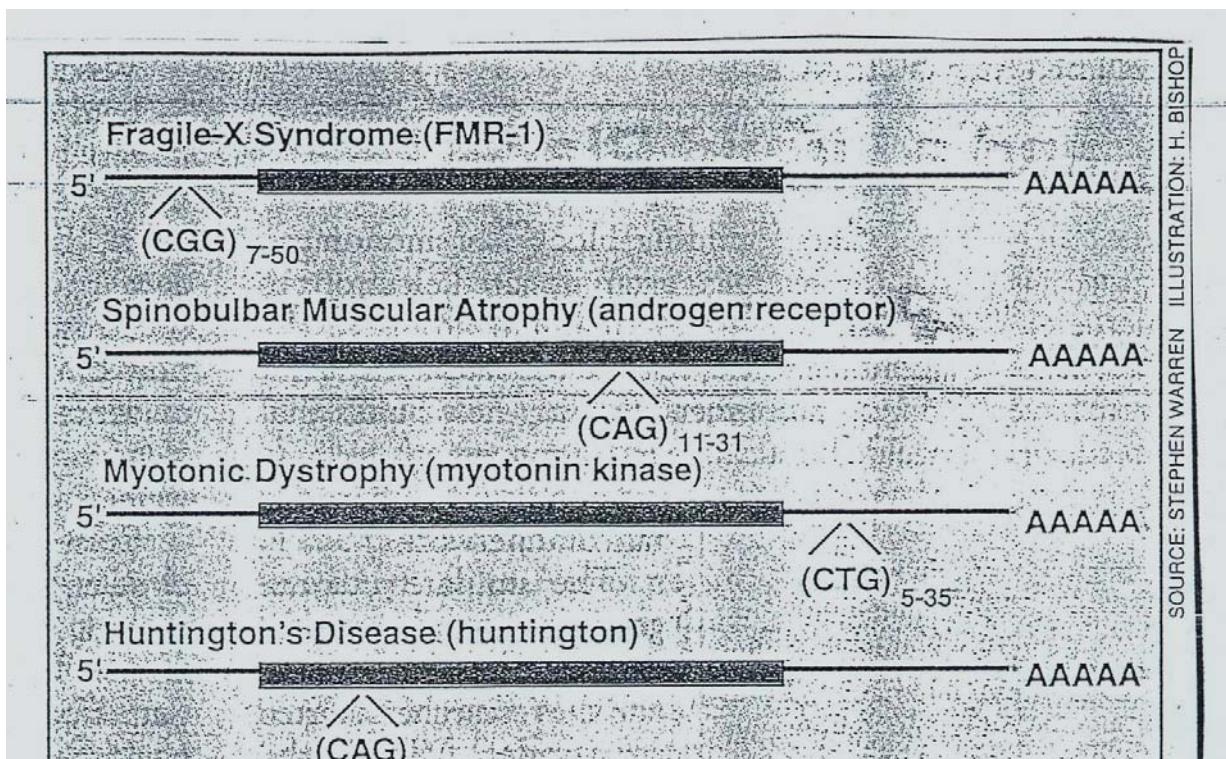


Figure 3. Trinucleotide expansion responsible for fragile X syndrome lies in an unexpressed part of the X-linked gene *FMR1*. The gene itself (top) divides its code into 17 exons spread over 38 kilobases. Its first and last exons include regions transcribed into messenger RNA that are not represented in the final translated protein. In turn, the 5' untranslated region (in exon 1) includes a sequence of CGG repeats (bottom). Normally, the tract is polymorphic, ranging from 7 to 52 repetitions. The example shown is the most common, with 30. In a premutation, the number is 60 to 200; the example has 96. In a full mutation, the number is almost always several hundred; the example has 720. When the number exceeds 230, the entire region is hypermethylated (inset), receiving a methyl group at the C in each CG dinucleotide along both strands of the DNA double helix. The gene's promoter is deactivated, and the gene becomes silent. Arrows in and near *FMR1* mark the locations of three polymorphisms.

Die Zahl der Repeats entscheidet über die Schwere der Krankheit
Je mehr Repeats, umso größer die Wahrscheinlichkeit, dass noch mehr Repeats entstehen.
Ab 200 Repeats ist die Krankheit voll entwickelt



Beispiele für Erkrankungen durch Trinukleotidrepeats



Where they're located. Trinucleotide repeats occur at different sites in genes. The numbers give their normal size ranges and the solid bars indicate the genes' protein-coding segments.

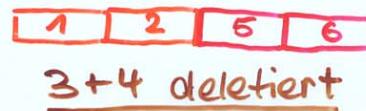
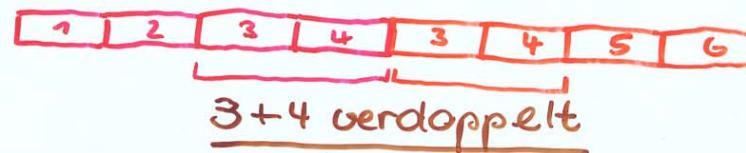
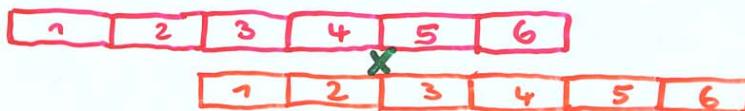
Science, Juni 93

Wie kann Satelliten- DNA entstehen?

Vermehrung von
"tandem repeats"
durch
"ungleiches Crossover"



"falsche" Paarung und Crossover (x)



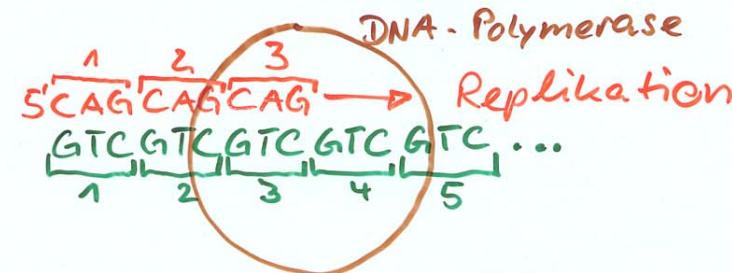
Für Mikro-Satelliten-DNA wird das Slippage-Replication-Modell angenommen

Entstehung von "simple repeats"

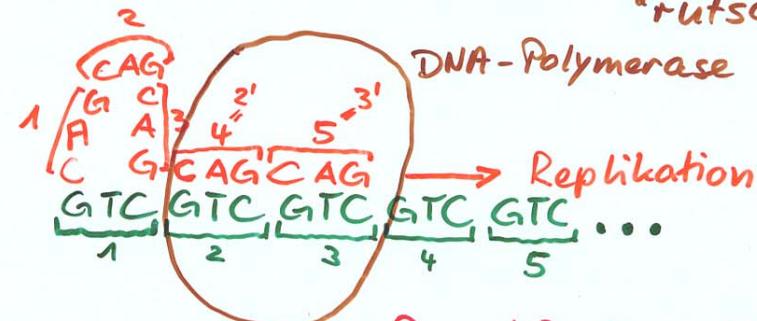
durch

"Slippage replication"

5' CAG CAG CAG CAG CAG 3'
3' GTC GTC GTC GTC GTC ...



"Slippage" (DNA-Polymerase "rutscht")



Repeat 2 + 3 werden verdoppelt!