

Klassische Verfahren zur Analyse von Eukaryoten-DNA

Die DNA-Schmelzanalyse:



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

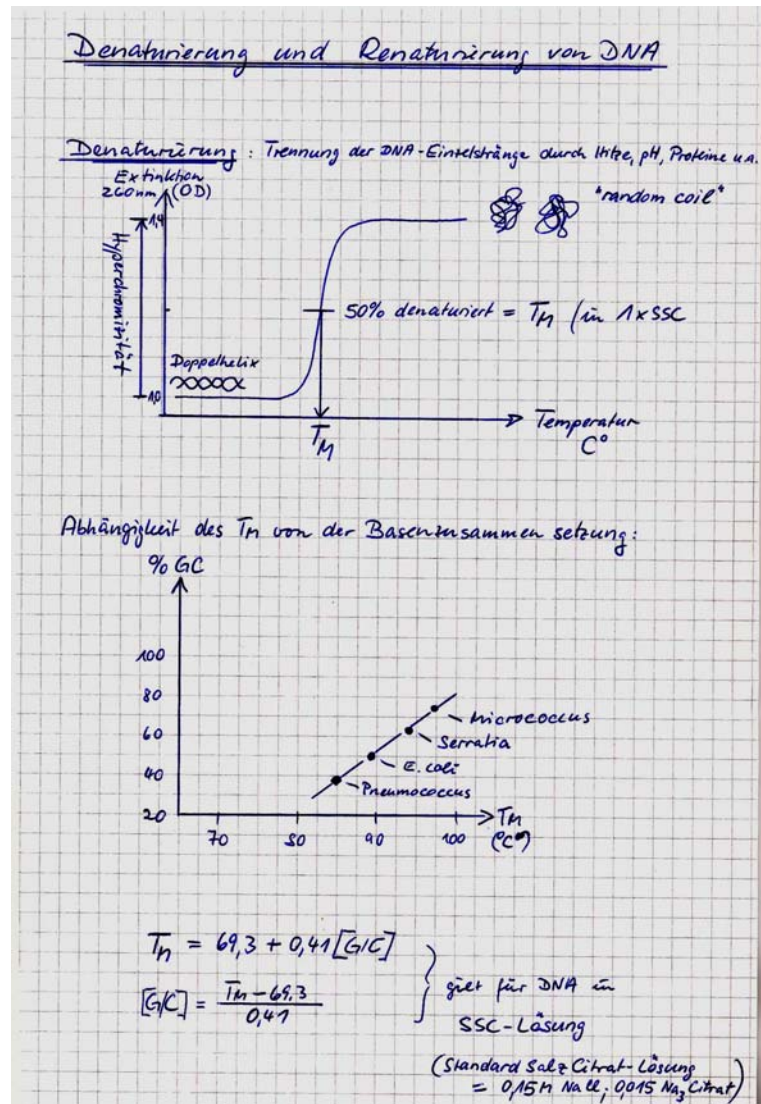
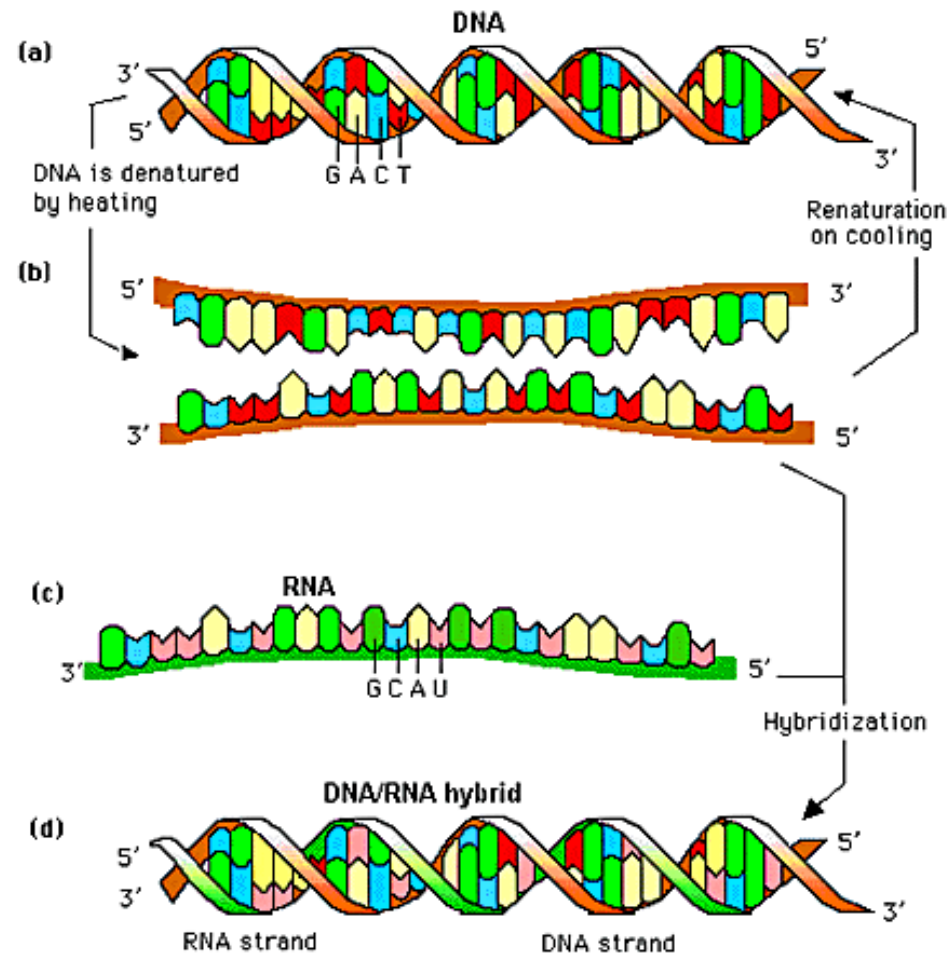


Table 6.3 Relative G + C Contents of Various DNAs

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

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

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




Nucleic Acid Hybridization

Die DNA-Reassoziatio

Reassoziatio / Renaturierung : 2 Stufenprozess

1. Nukleation → 2. "Zipping"



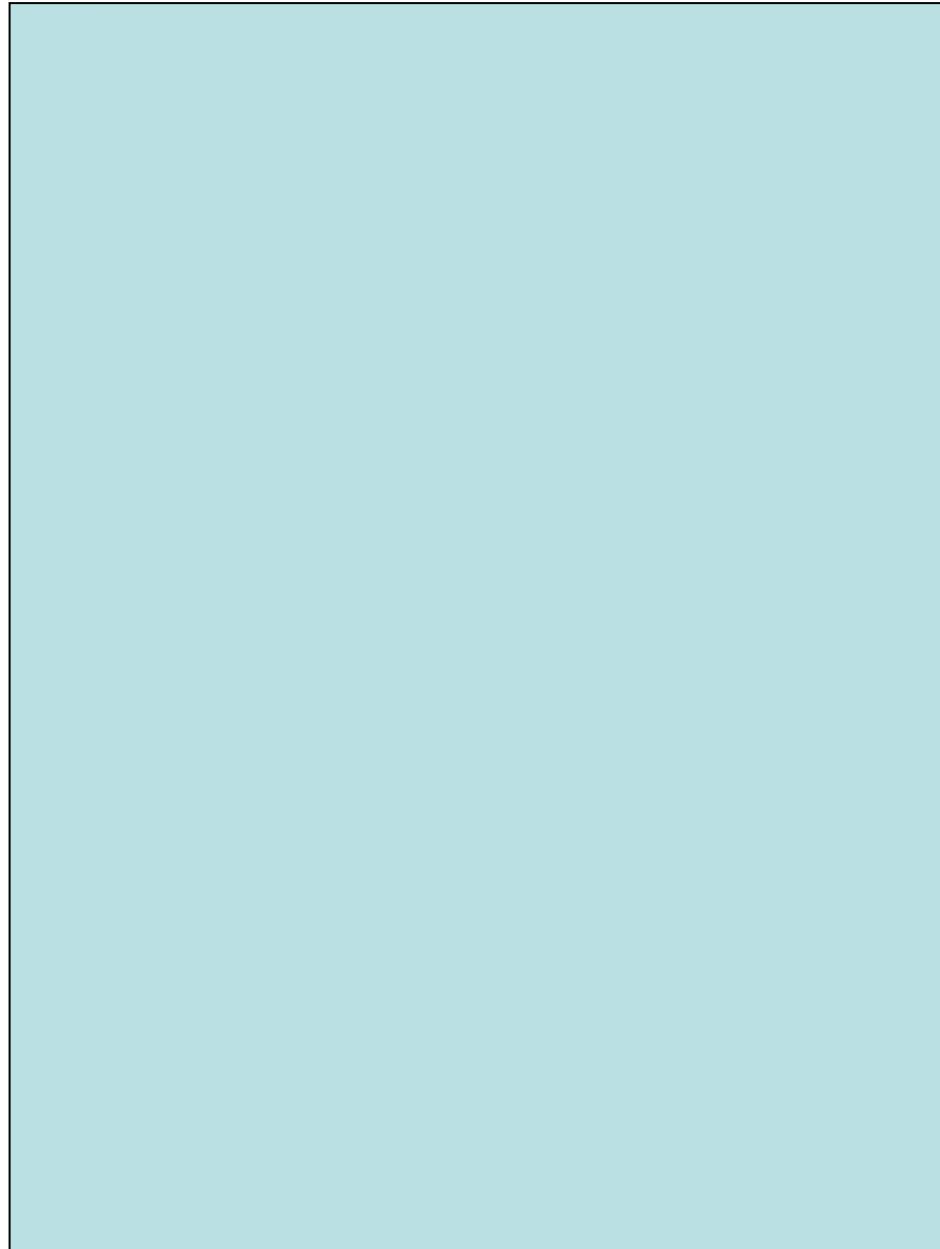
Die Kinetik der DNA- Reassoziatiön:

Die
Reassoziatiönreaktiön
wird bestimmt durch
Konzentratiön und Zeit
 C_0t

C_0 = Konzentratiön $t=0$

C = Konzentratiön t

Figure 3.4 A DNA reassociation reaction is described by the $C_0t_{1/2}$



Die Kinetik der DNA- Reassoziati

Die
Reassoziationsreaktion
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- Reassoziati

Die
Reassoziationsreaktion
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

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

Die Kinetik der DNA- Reassoziati

Die
Reassoziationsreaktion
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

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

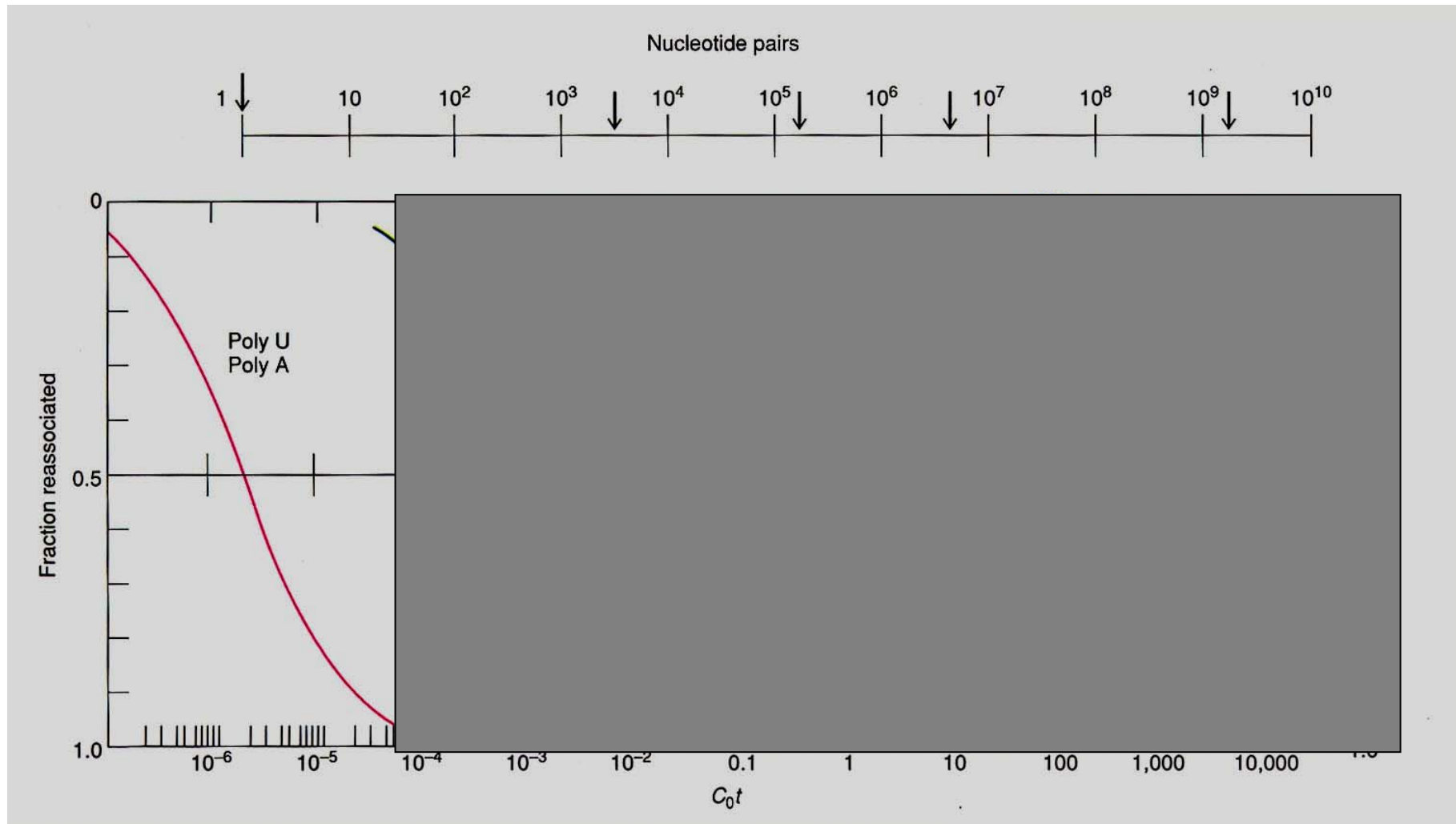
Critical parameter is $C_0 t_{1/2}$

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

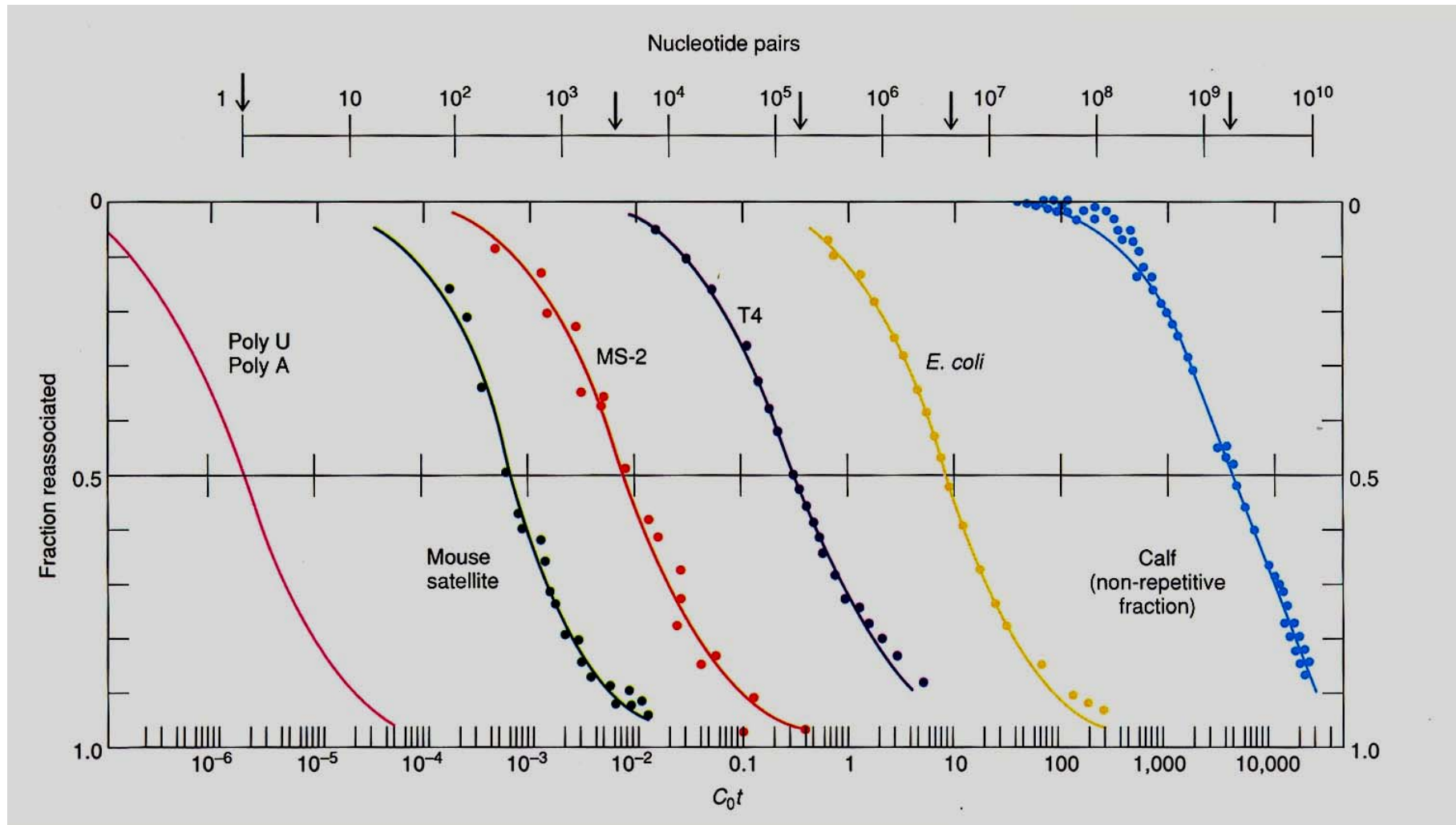
$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + k \cdot C_0 t_{1/2}}$$

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

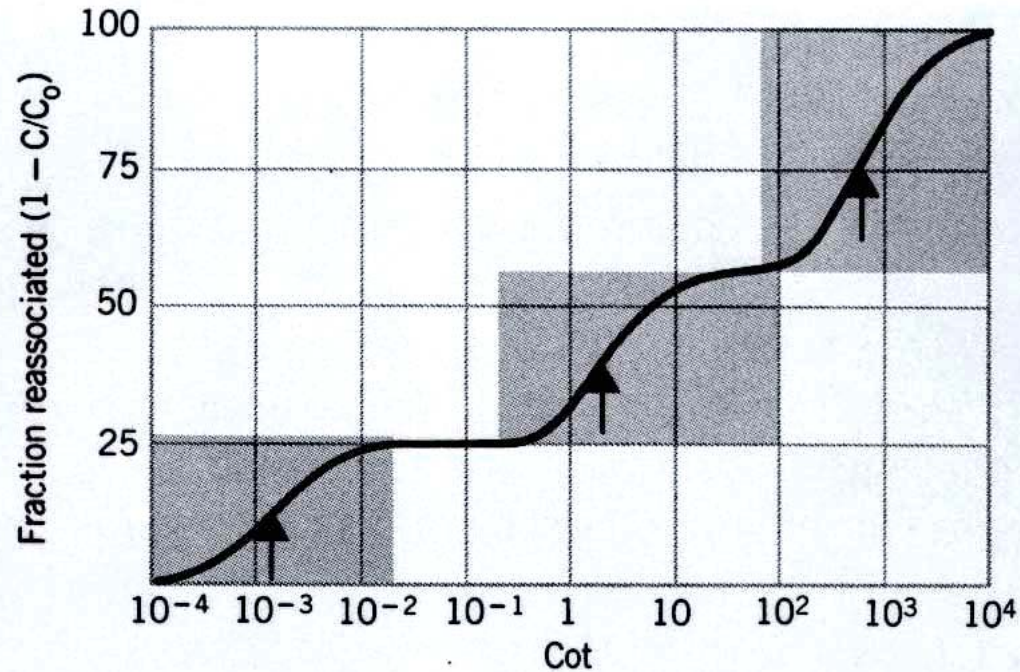
Der zeitliche Verlauf einer DNA-Reassoziaton ergibt die C_0t -Kurve



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



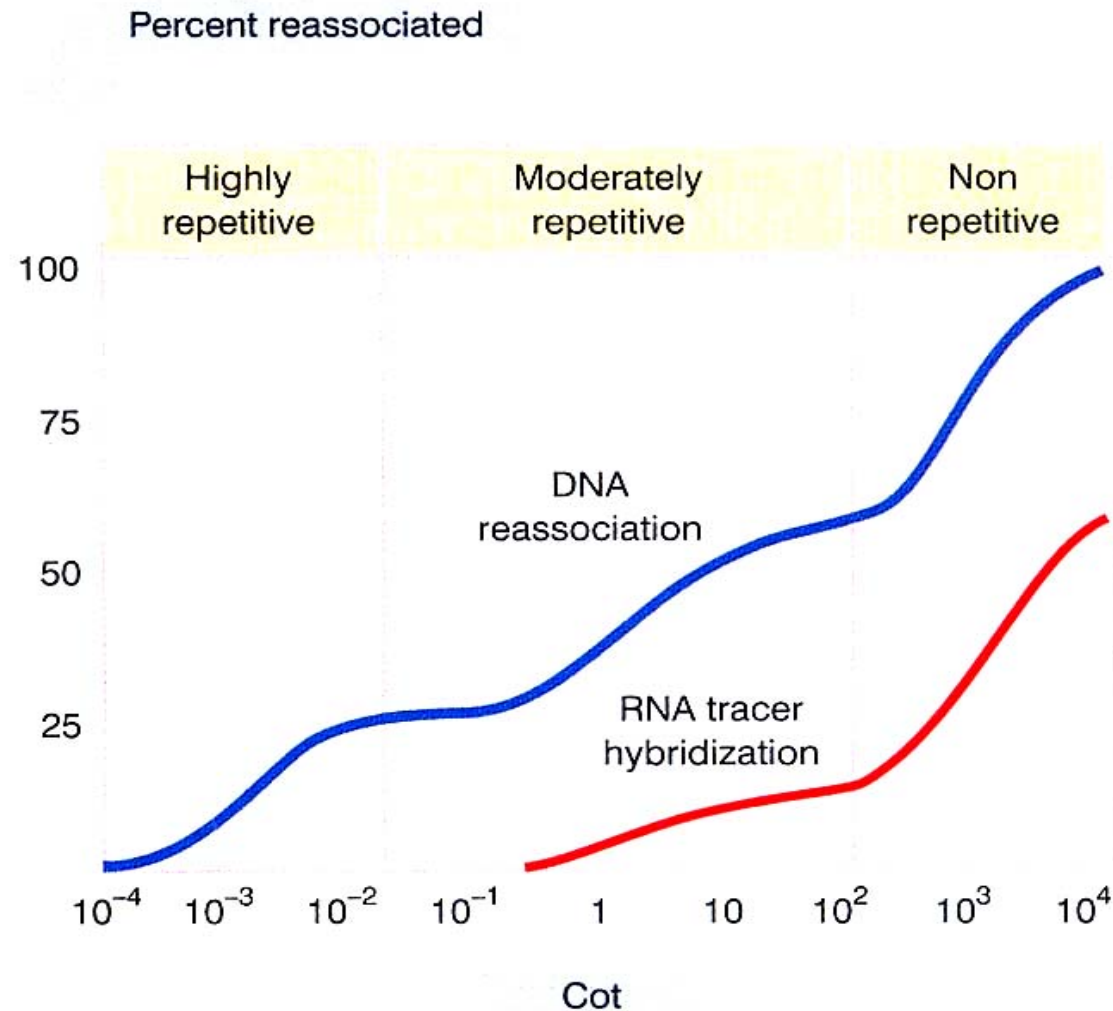
Eukaryotische DNAs zeigen eine „mehrstufige“ C_0t -Kurve



	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
reassoziierenden Fraktionen
entsprechen DNA-Elementen
mit unterschiedlichen
Repetitionsgraden

RNAs hybridisieren überwiegend zusammen mit der „single copy“ DNA



Die hochrepetitive DNA-Fraktion ($C_0t \frac{1}{2} < 0,01$):

Palindrome und „inverted repeats“ $C_0t \frac{1}{2} = 0$

Satelliten DNA $C_0t \frac{1}{2} < 0,01$

Die „sehr schnell“ reassoziierende DNA-Fraktion ($C_0t \frac{1}{2} < 0,01$):

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

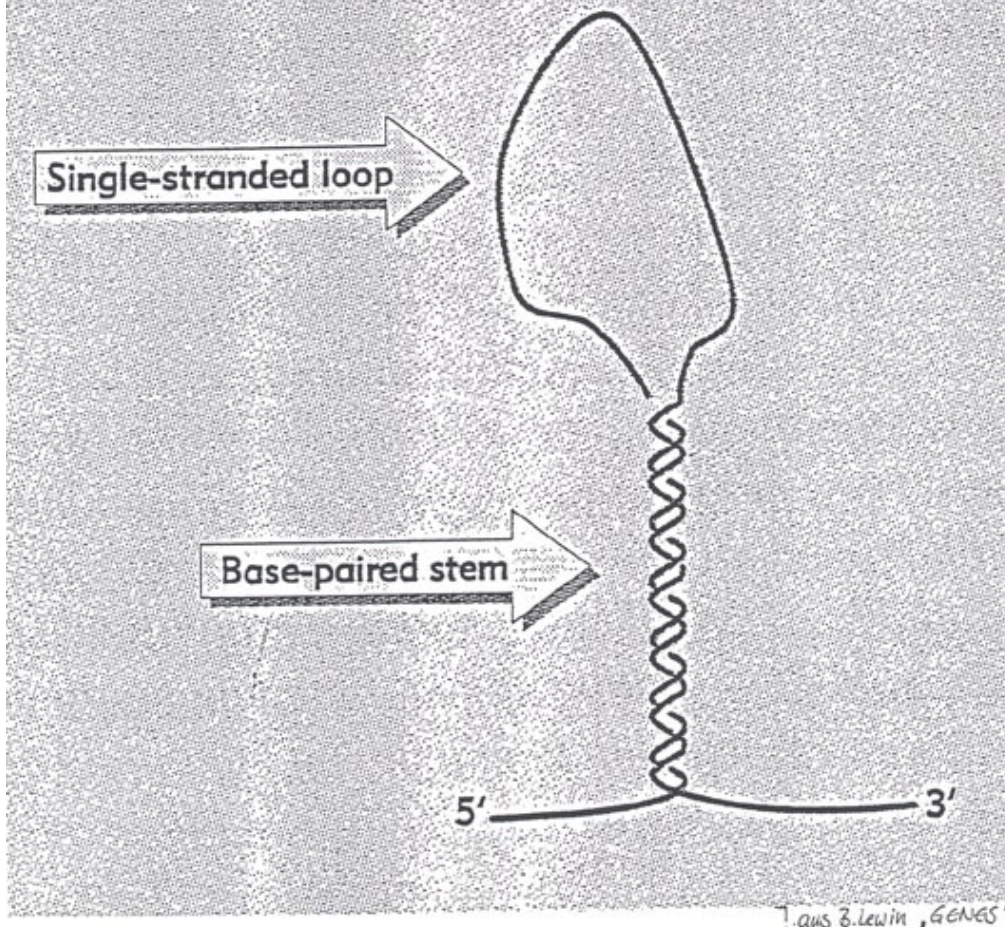
Palindrome und „inverted repeats“ $C_0t \frac{1}{2} = 0$

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.

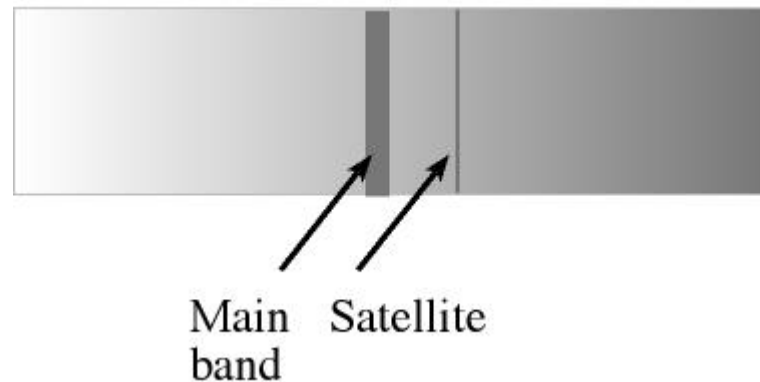


Die Rückfaltung ist unabhängig von der Diffusion und ist deshalb weder von der Zeit noch von der Konzentration der Einzelstrang-DNA abhängig. Die Rückfaltung erfolgt daher mit einer sog. „Null-Kinetik“, d.h. mit so hoher Geschwindigkeit, dass ein zeitlicher Verlauf nicht messbar ist.

Die hochrepetitive DNA-Fraktion
($C_0t \frac{1}{2} < 0,01$):

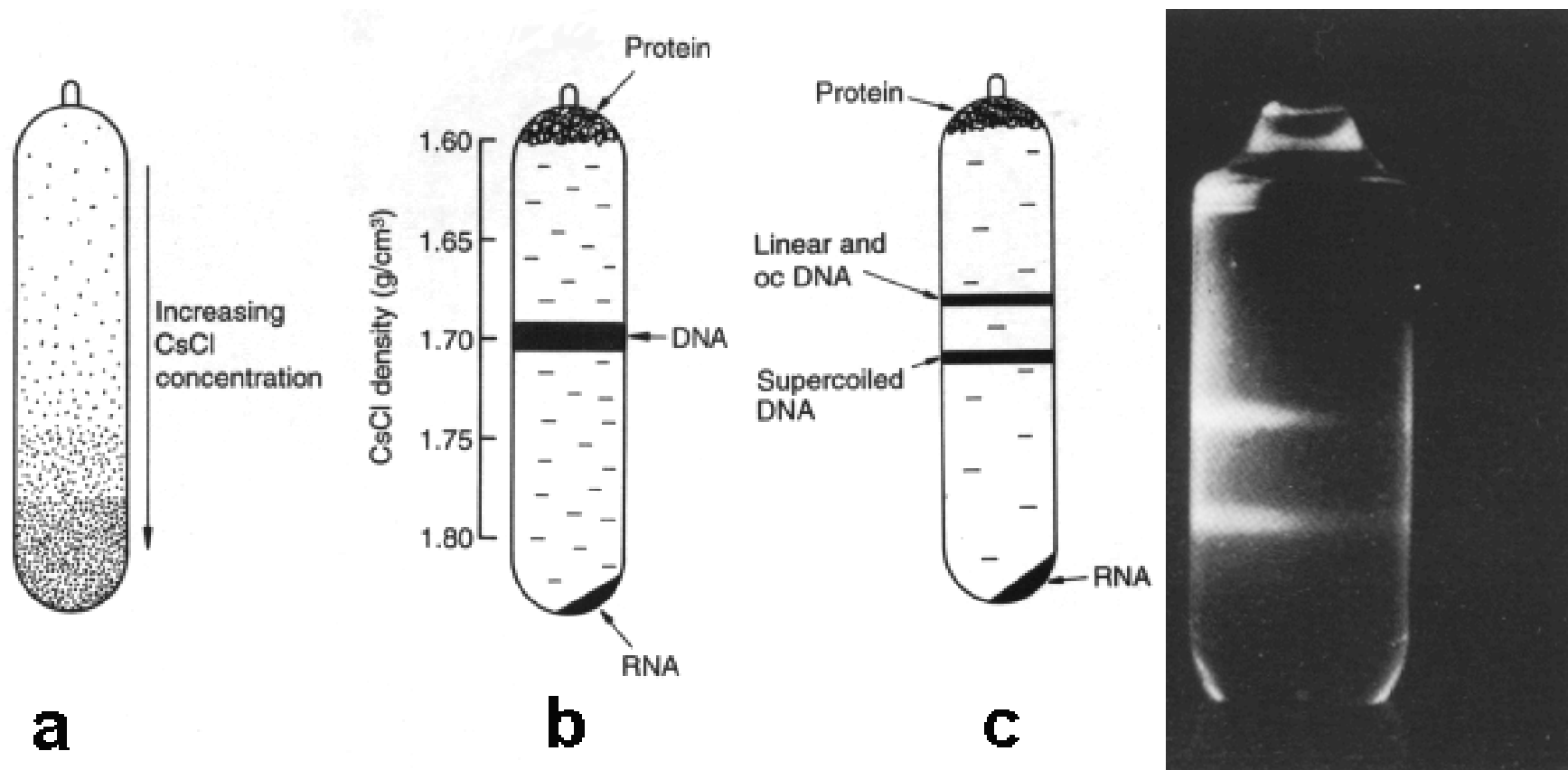
Satelliten DNA renaturiert
Mit einem $C_0t \frac{1}{2} < 0,01$

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

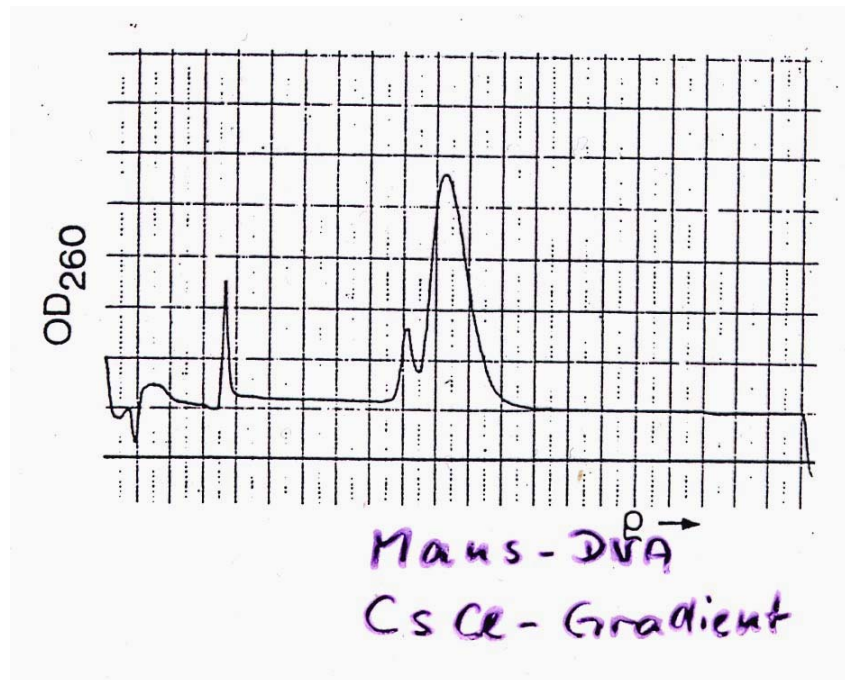
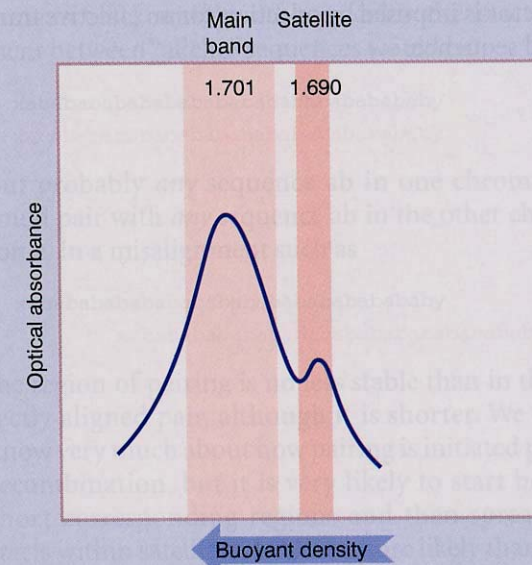
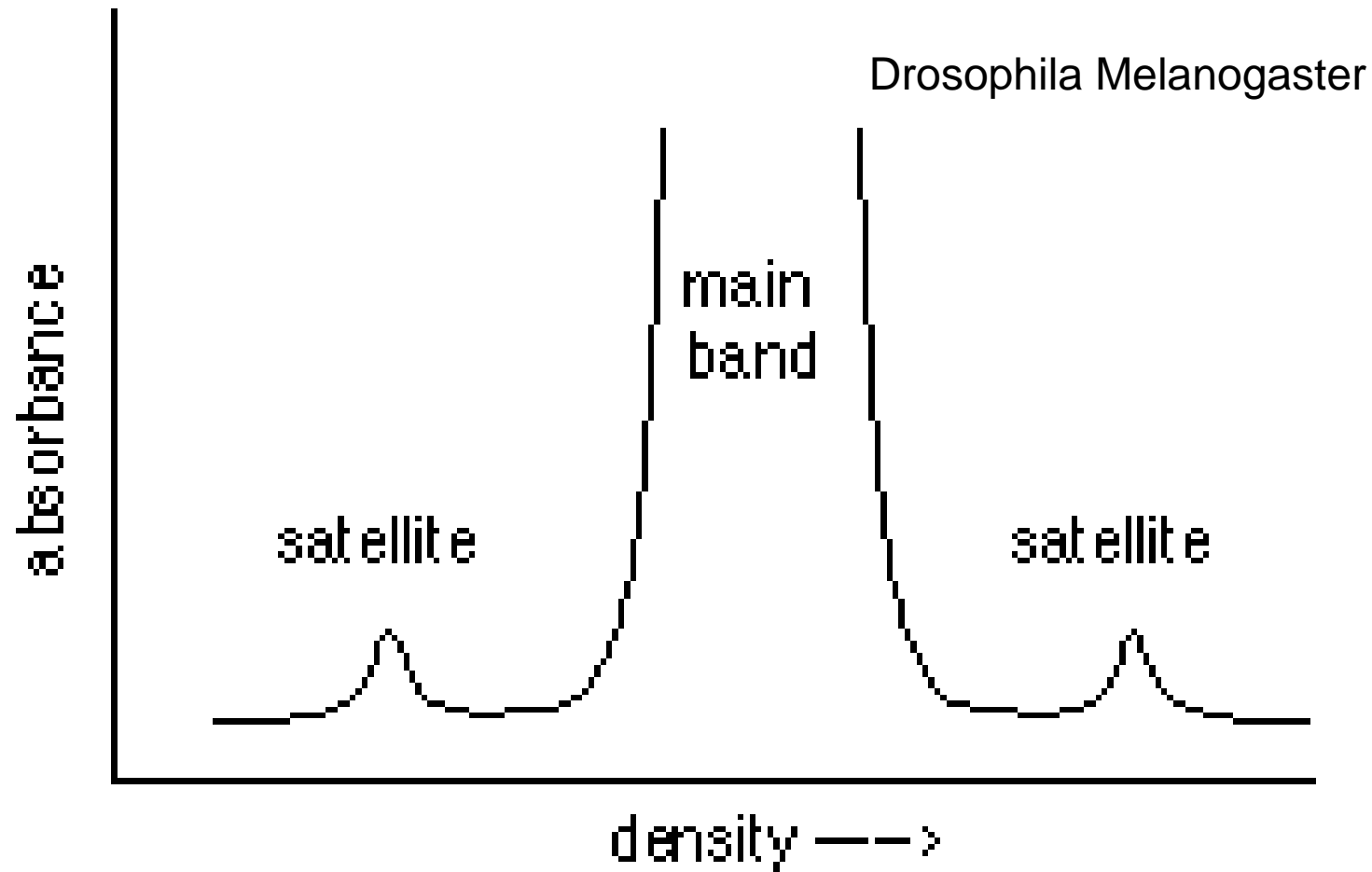


Figure 4.14 Mouse DNA is separated into a main band and a satellite by centrifugation through a density gradient of CsCl.

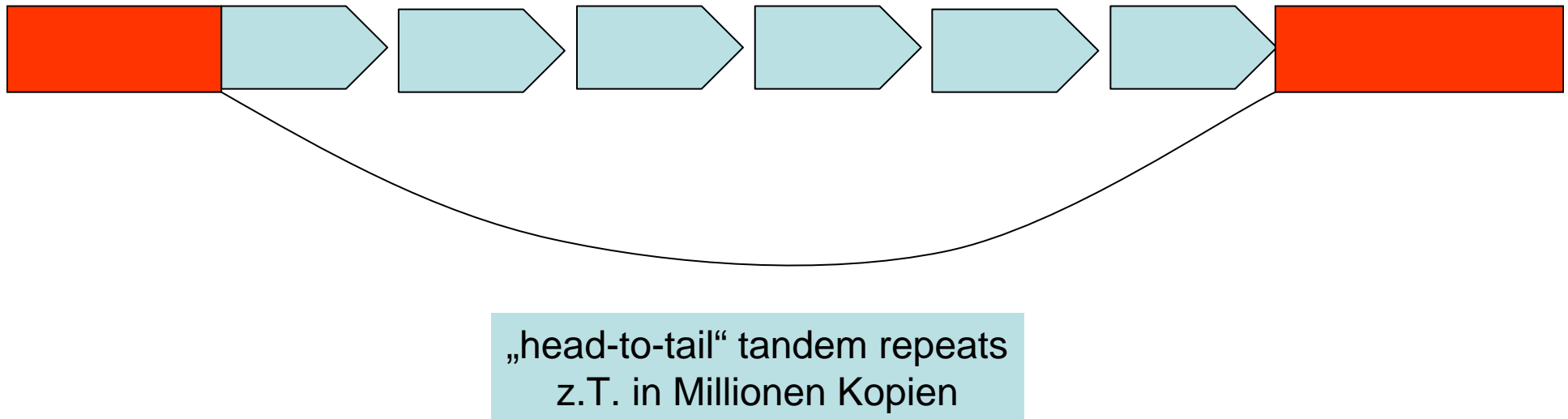
aus Lewin, Genes VII



Manche Organismen besitzen viele verschiedene Satelliten-DNAs



Satelliten-DNAs bestehen aus großen Clustern tandem repetitiver Elemente



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).

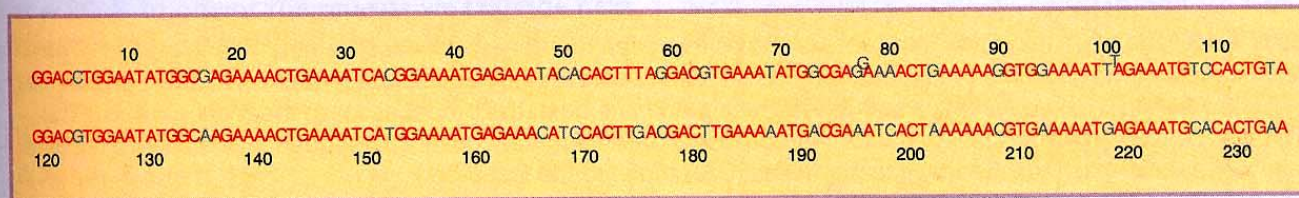
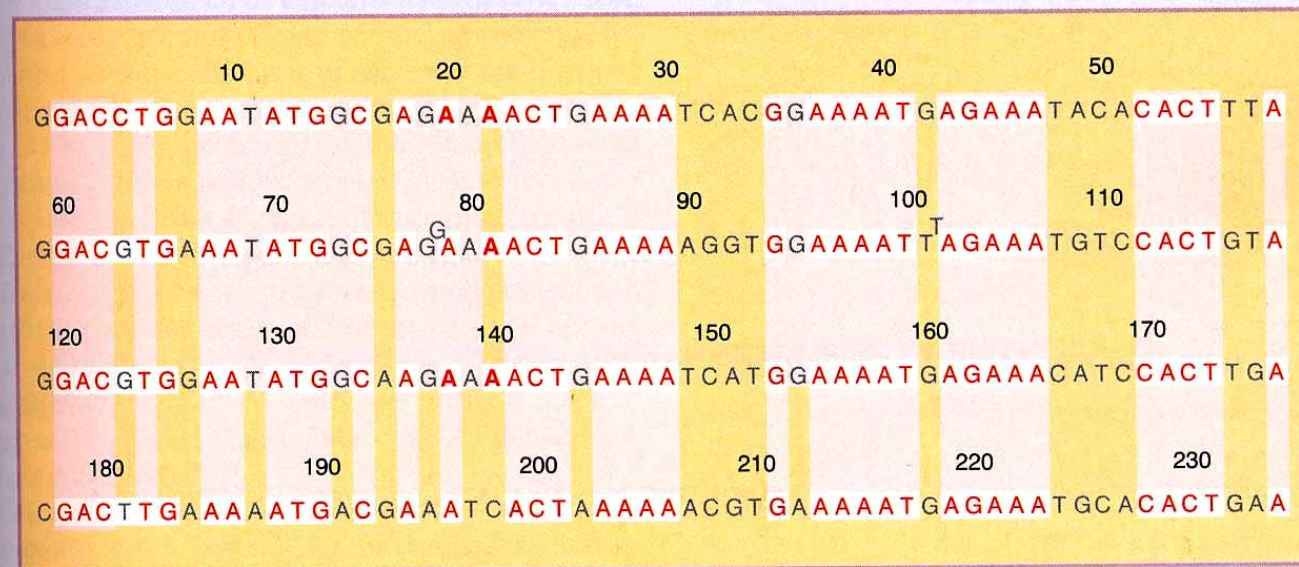


Figure 4.18 The alignment of quarter-repeats identifies homologies between the first and second half of each half-repeat. Positions that are the same in all 4 quarter-repeats are shown in color; identities that extend only through 3 quarter-repeats are indicated by grey letters in the pink area.



Makrosatelliten sind typischerweise im pericentrischen Heterochromatin lokalisiert

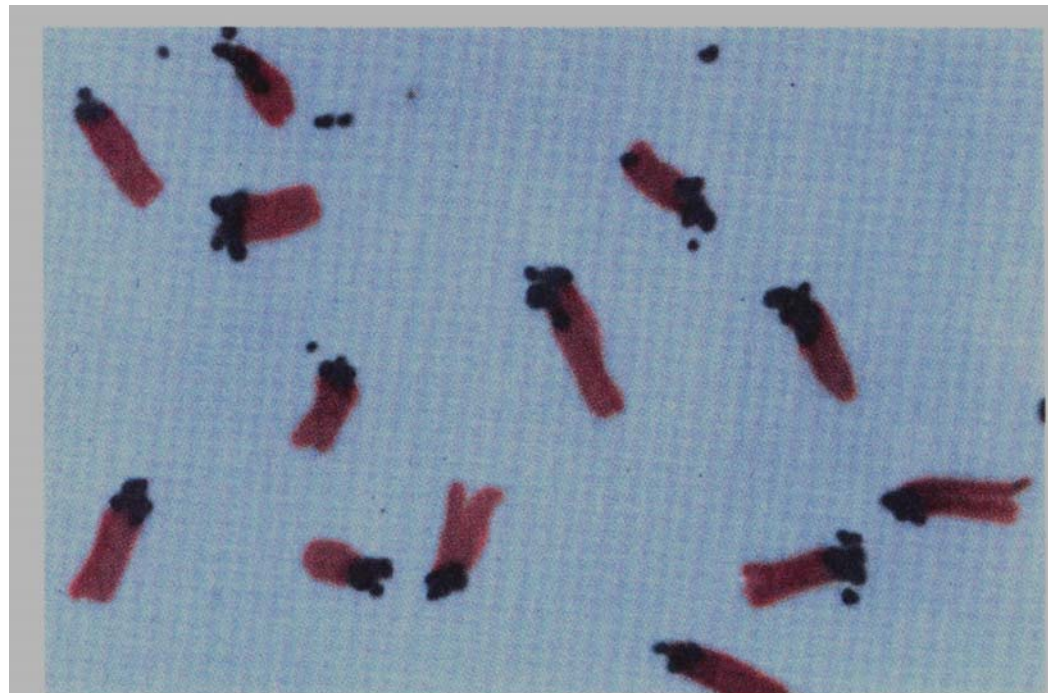
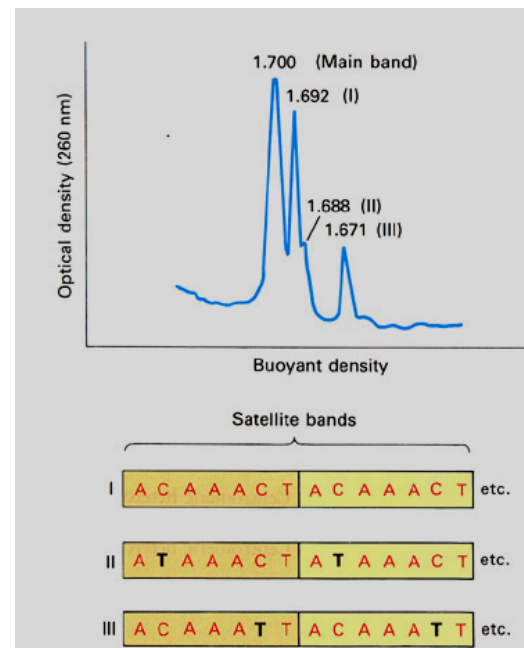
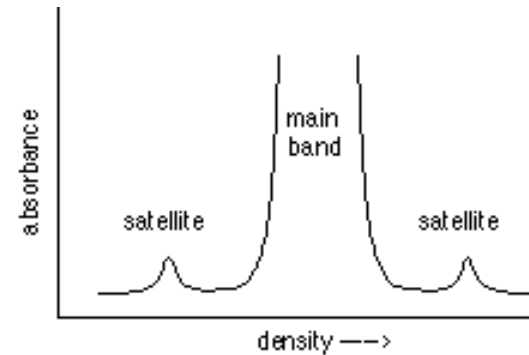


Figure 12-9 Autoradiographic localization of simple-sequence mouse DNA to the centromeres. A radioactive probe for simple-sequence DNA was added to chromosomes whose DNA had been denatured. (Note that all mouse chromosomes have their centromeres at one end.) (From M. L. Pardue and J. G. Gall, *Science*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

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

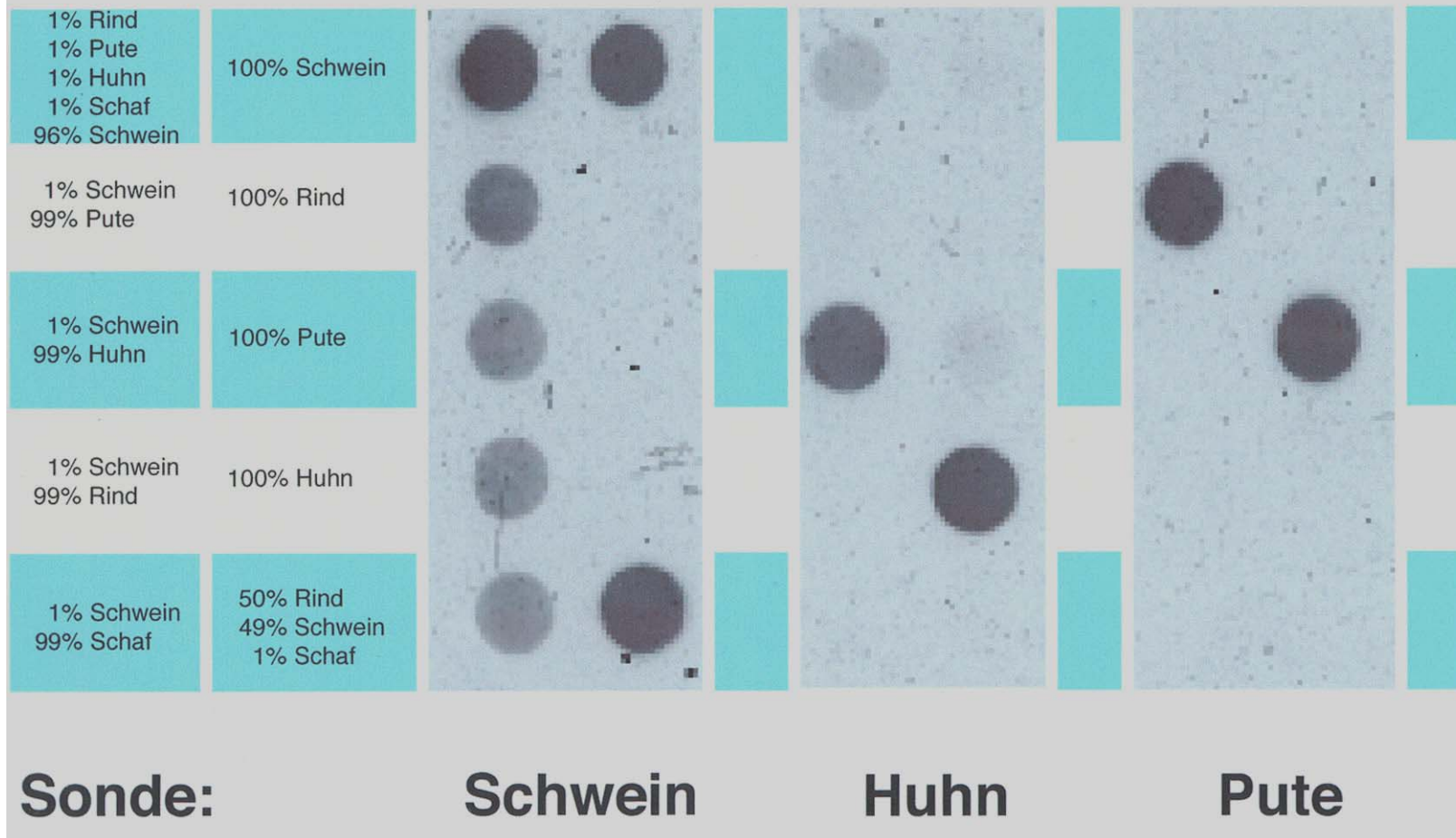


Nahe verwandte Arten können sich erheblich in ihrer Satelliten-DNA unterscheiden: *Chironomus thummi* und *Ch. piger*

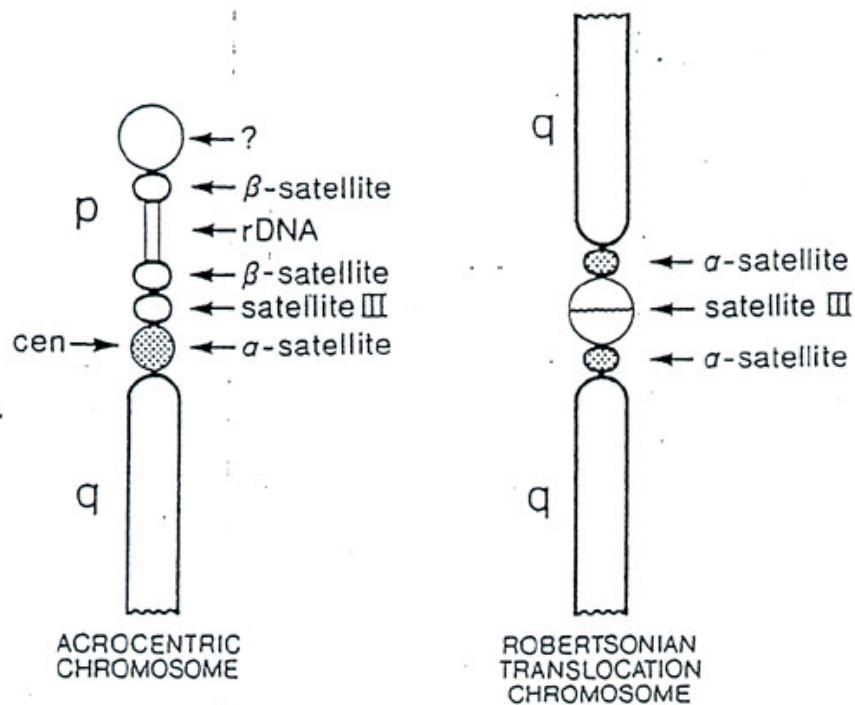


Arten können anhand ihrer Satelliten-DNA identifiziert werden: Anwendung in der Lebensmittelüberwachung

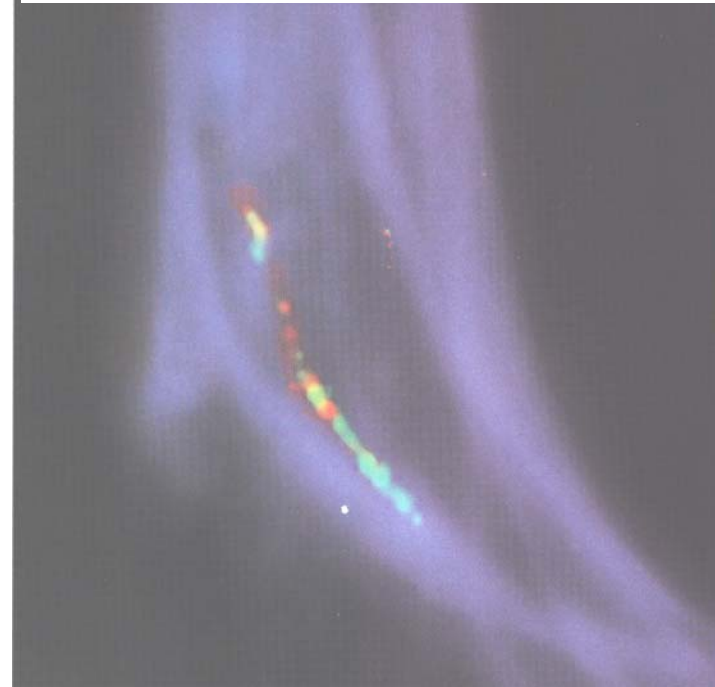
Hybridisierung von Wurst-DNA-Extrakten mit unterschiedlichen speziesspezifischen Sonden



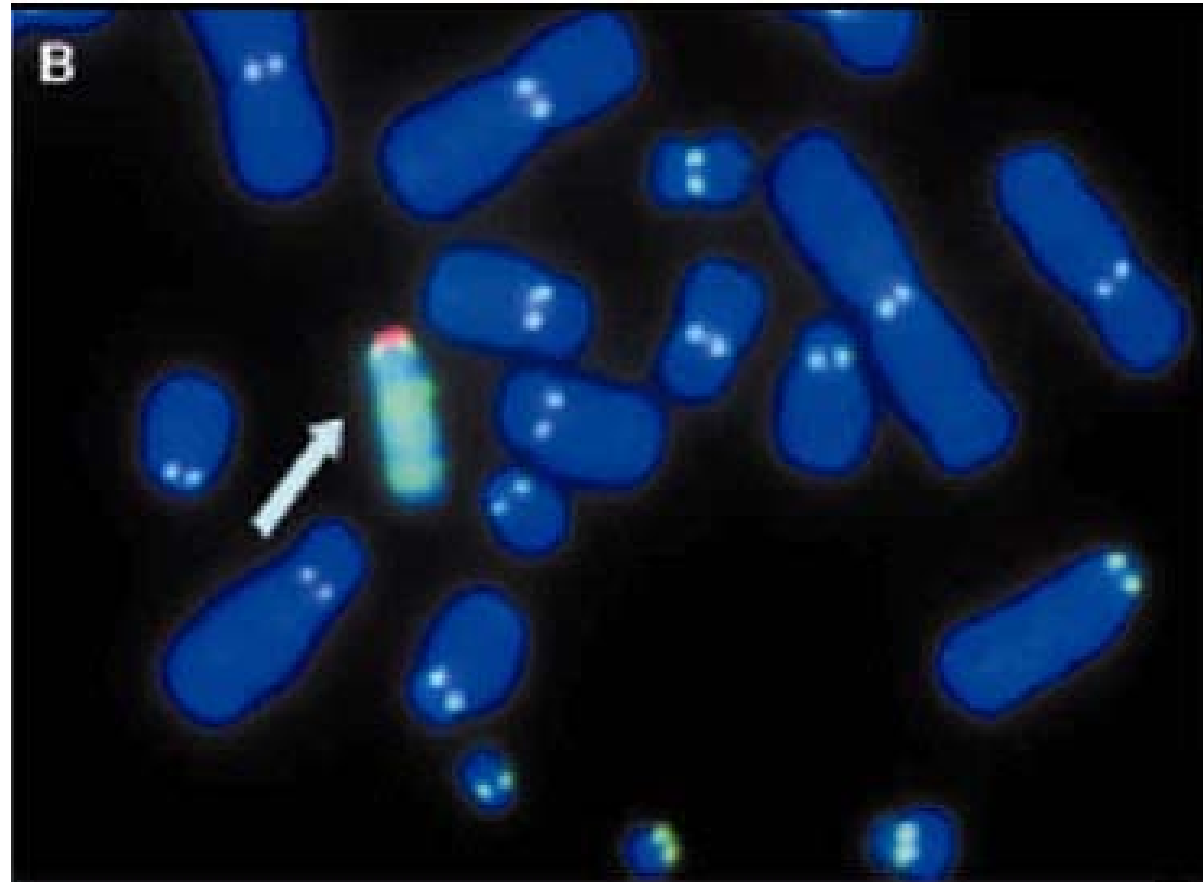
Die Centromerregionen sind aus einer komplexen Abfolge
verschiedener Satelliten-DNAs aufgebaut:
Beispiel Mensch



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



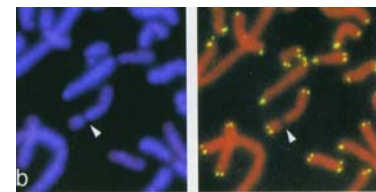
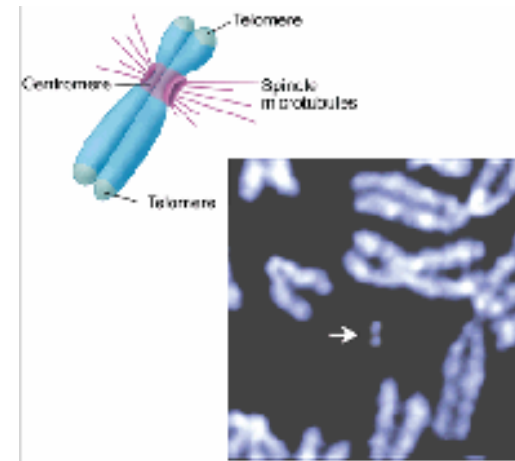
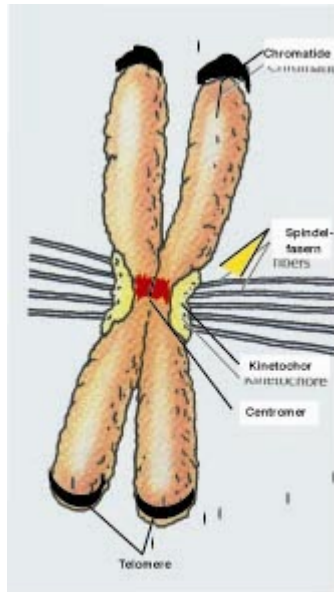
Die Funktion von Satelliten DNA ist nur partiell bekannt:
z.B. die humane **alpha-Sat-DNA** ist in der Lage,
Centromere zu bilden



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

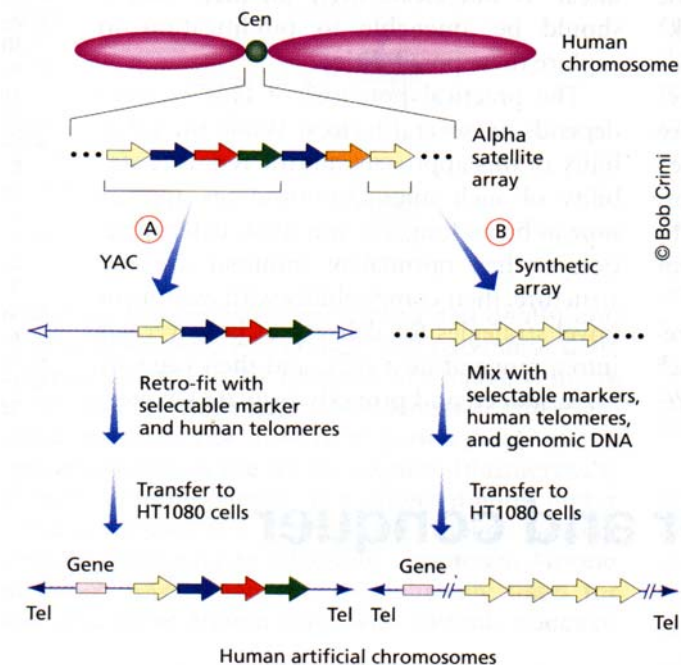
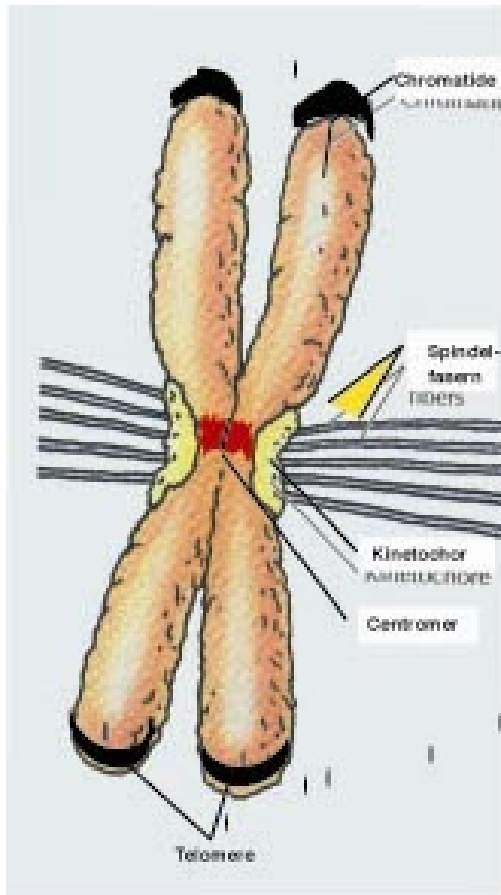
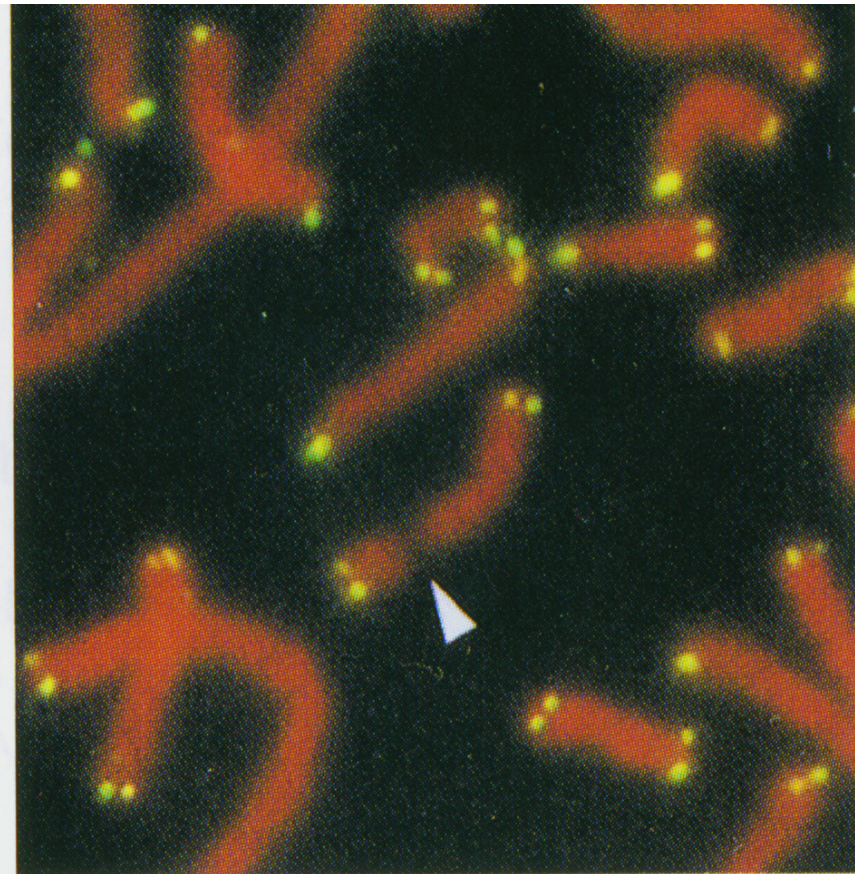
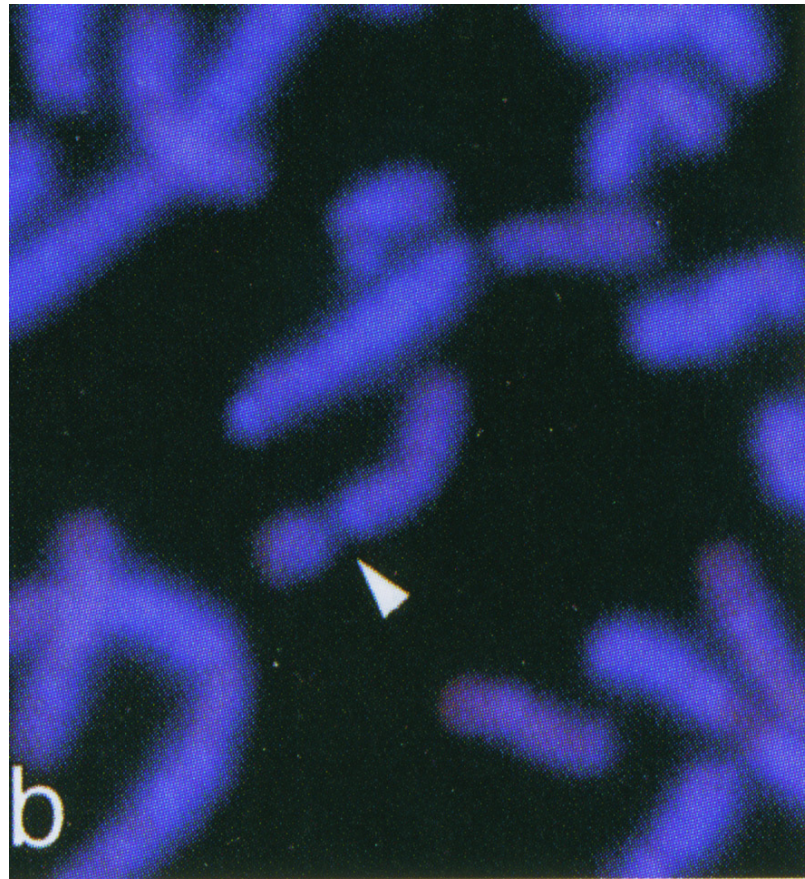
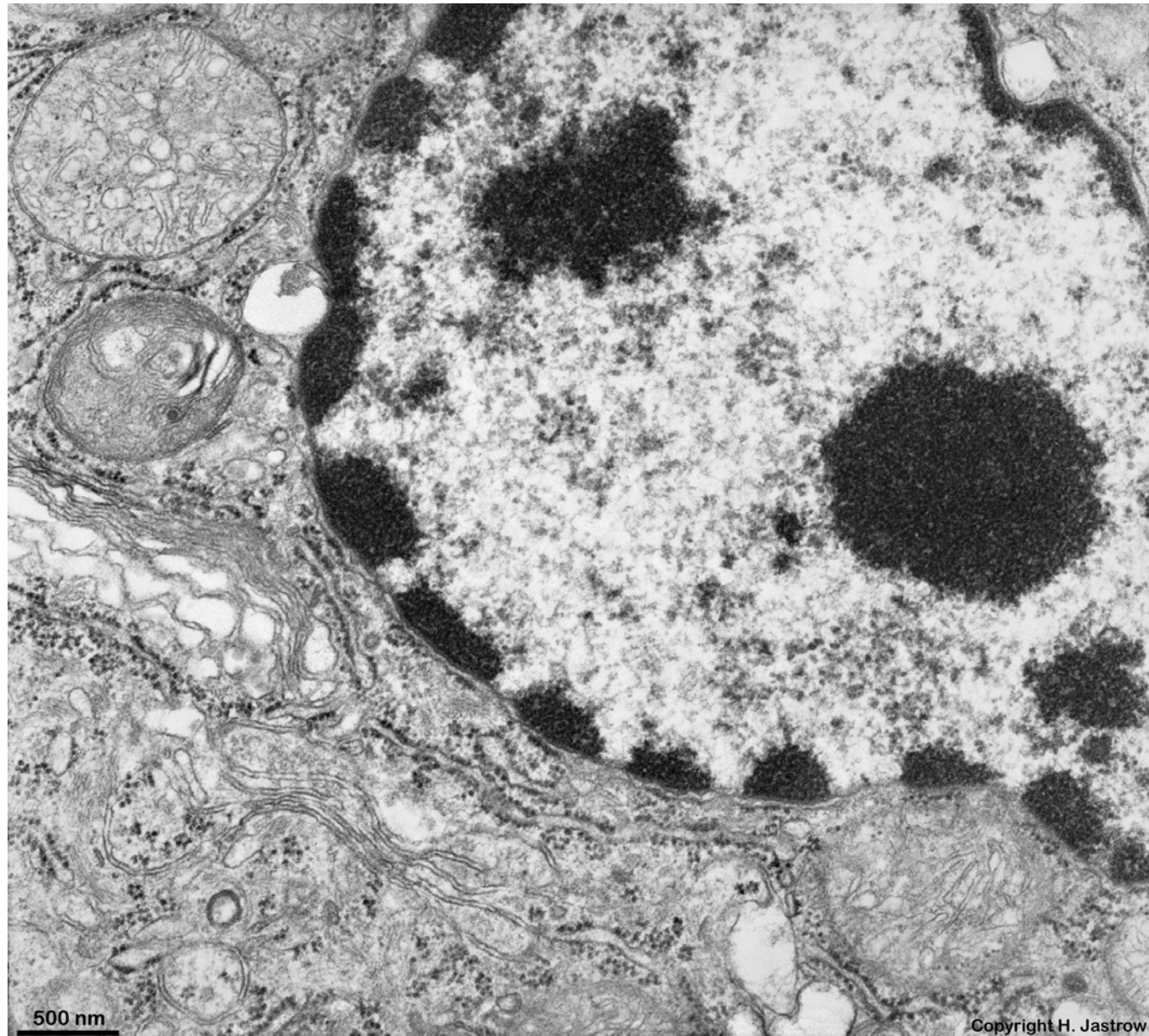


Figure 1. Schematic view of two strategies for formation of human artificial chromosomes (HACs). (A) Matsumoto and colleagues modified YACs containing human alpha satellite and generated HACs in human HT1080 cells at high efficiency. (B) Harrington et al.³ synthesized arrays of alpha satellite in vitro 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.

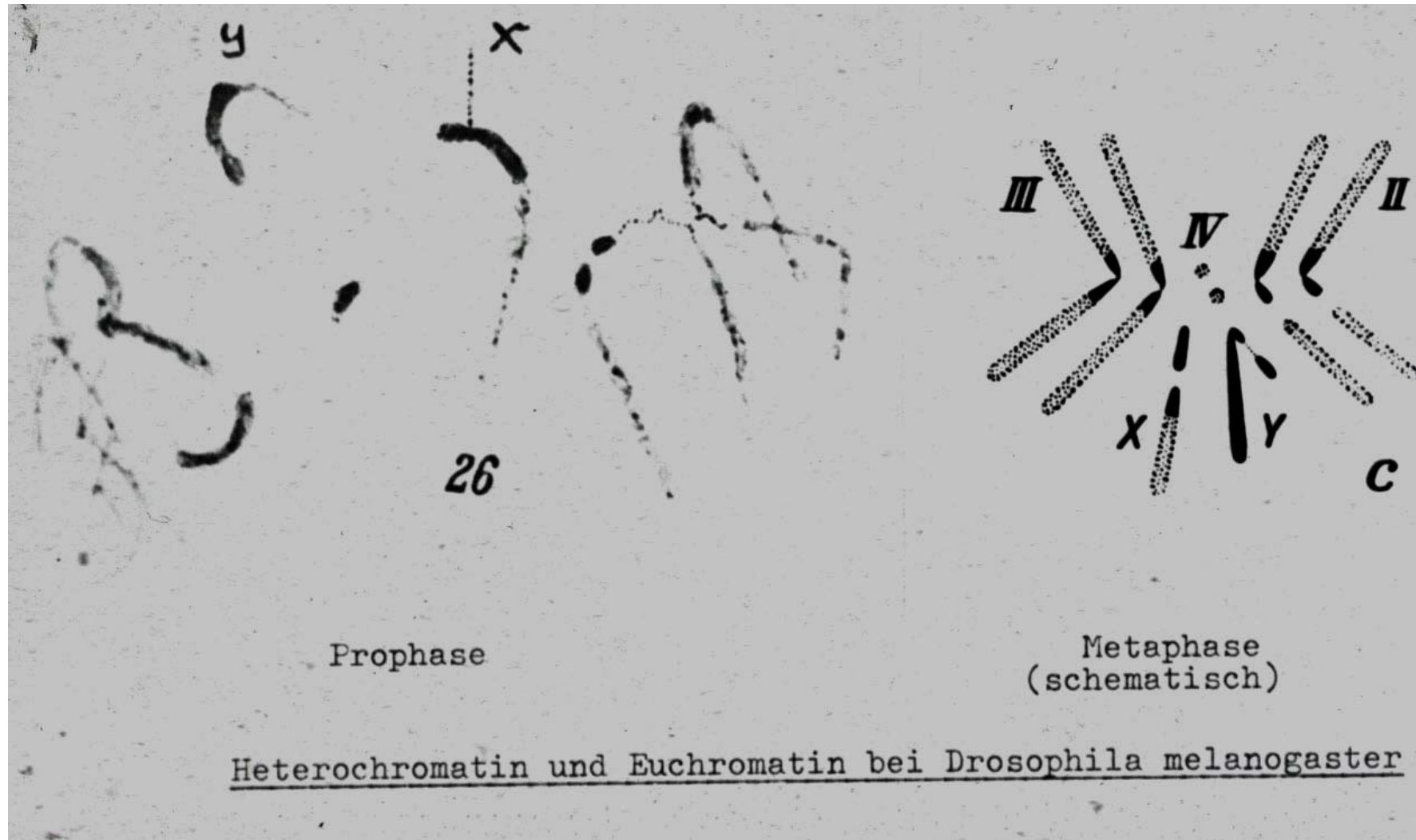
Nicht nur Centromere, sonder auch
Telomere enthalten tandem-repetitive DNA



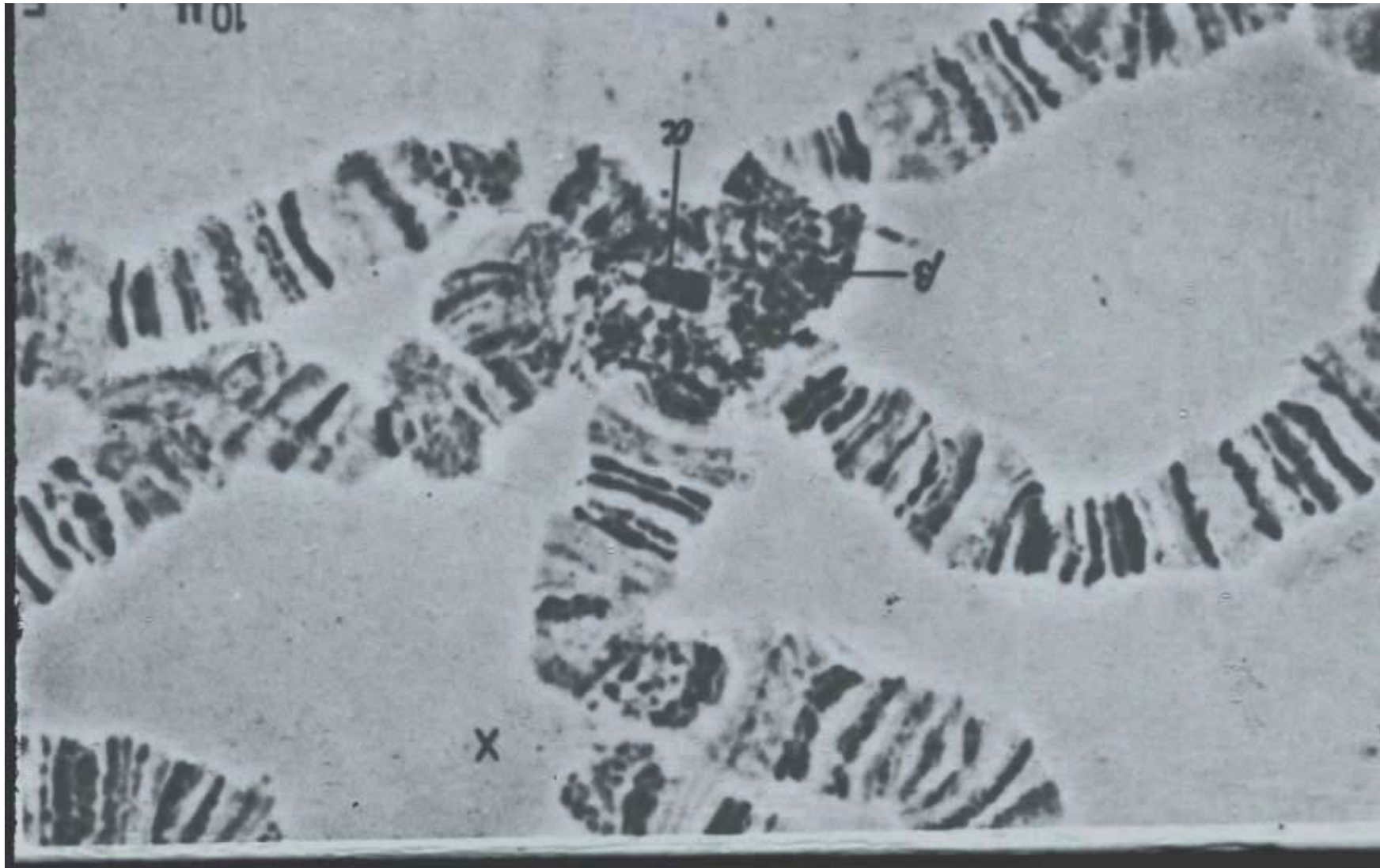
Heterochromatin im EM



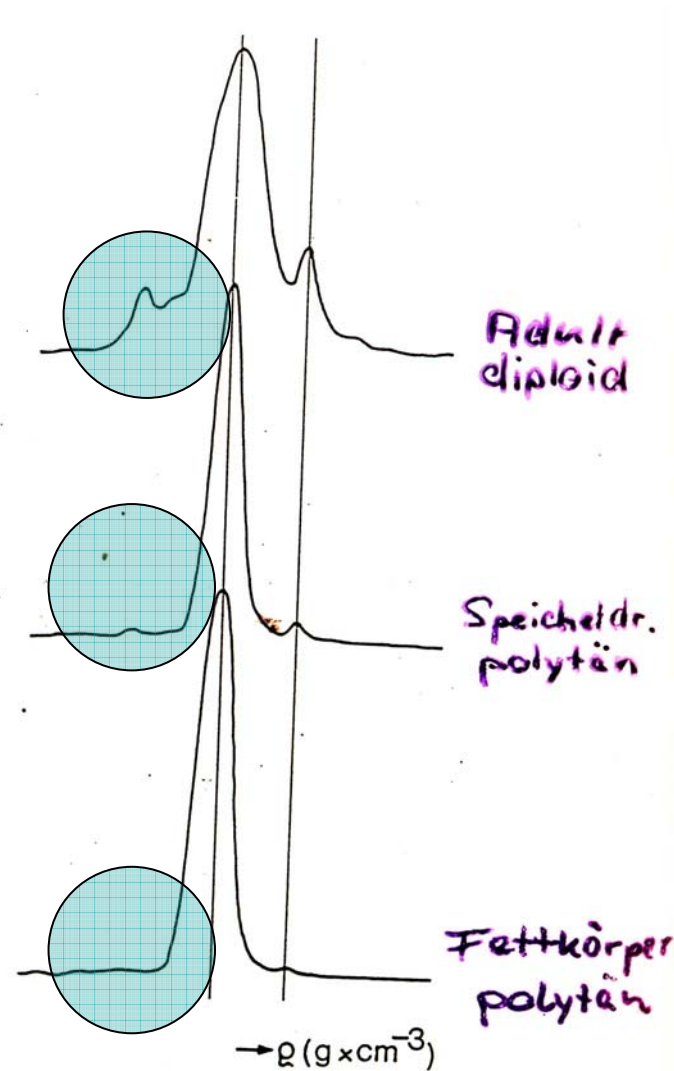
Heterochromatin ist inaktives Chromatin,
Es erscheint kondensiert und heteropyknotisch



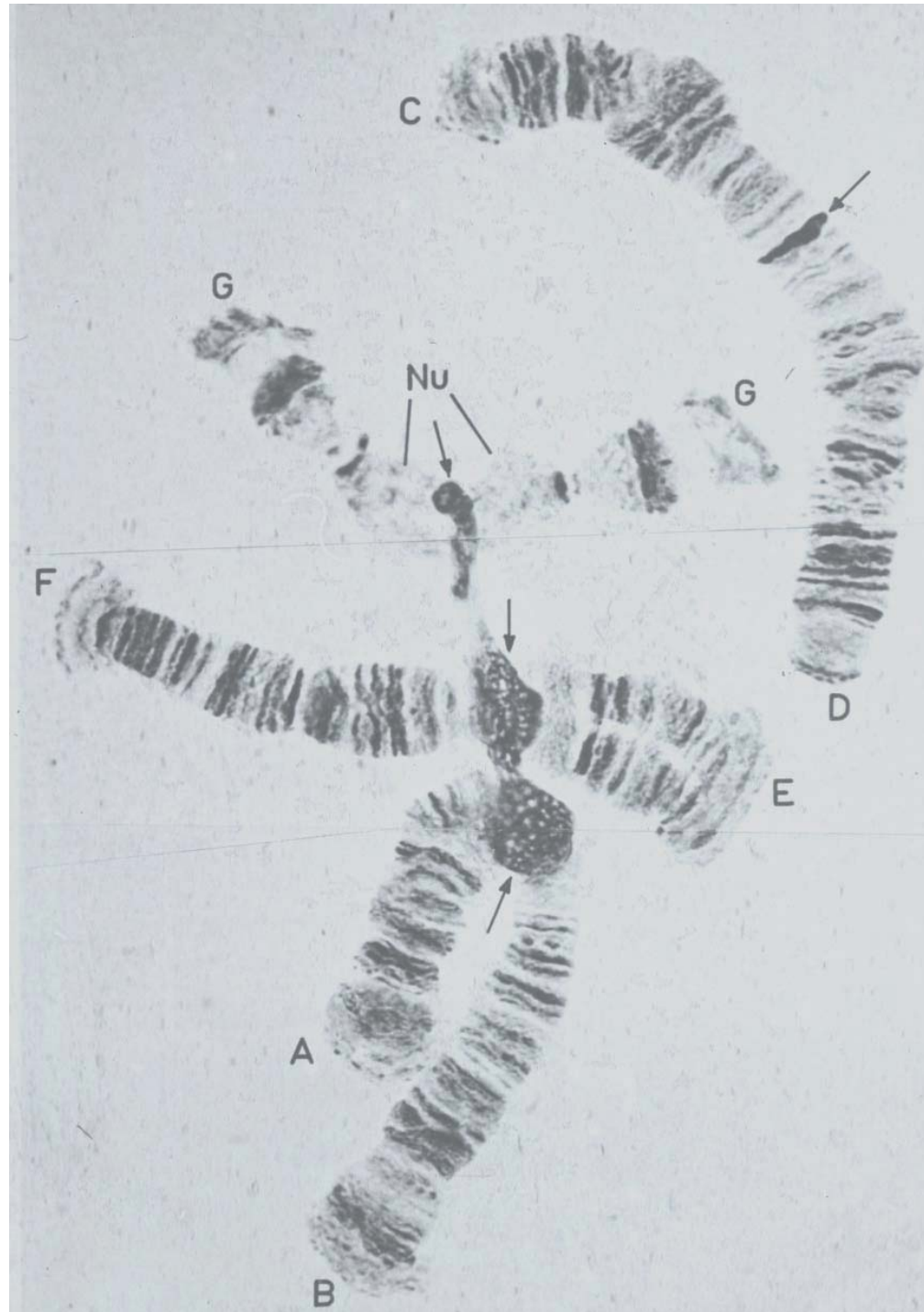
Heterochromatin ist inaktives Chromatin,
es wird häufig unterrepliziert,
Es wird unterschieden in alpha und beta H.



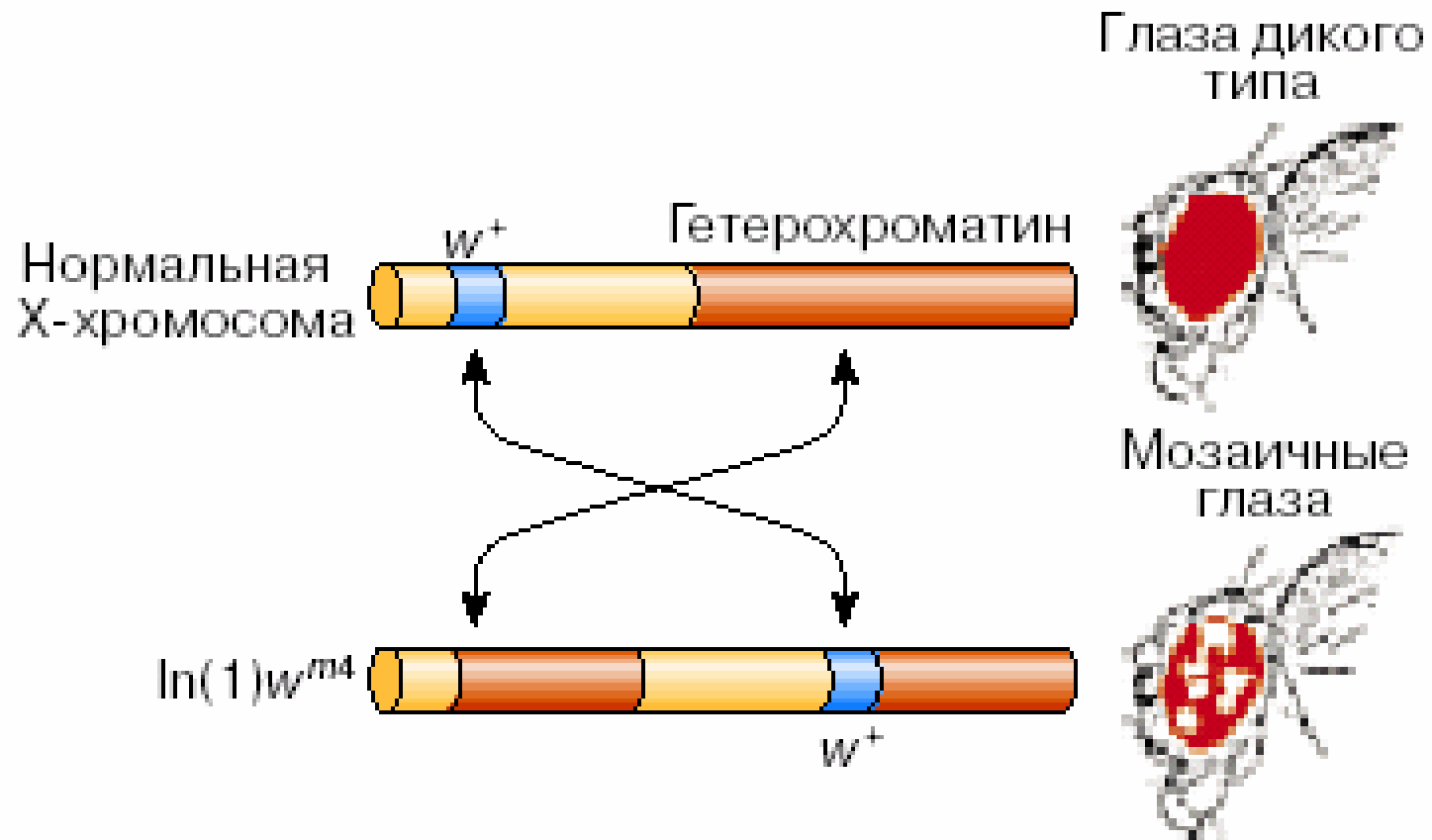
Die Unterreplikation von Heterochromatin zeigt sich im Fehlen von Satelliten-DNA in polytänen Geweben:



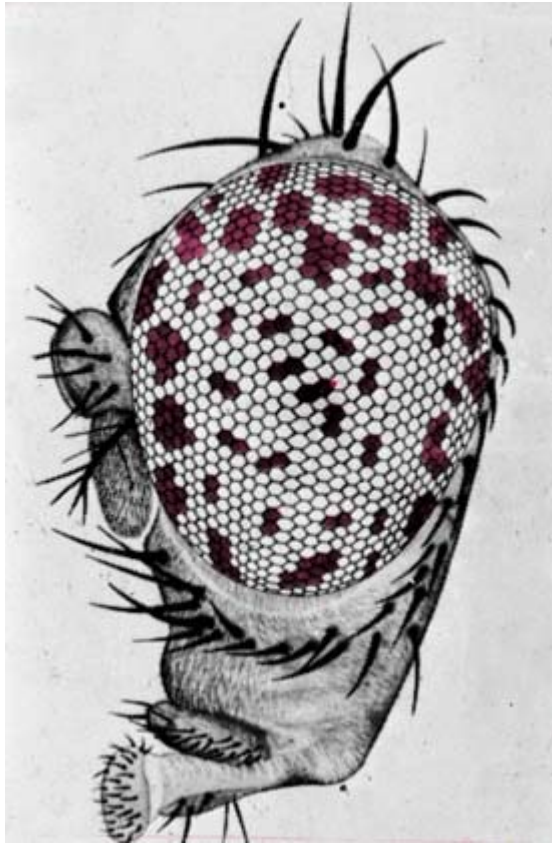
Heterochromatin
ist inaktives
Chromatin,
es wird häufig
unterrepliziert,
Manchmal aber
auch nicht:
Beispiel
Chironomus



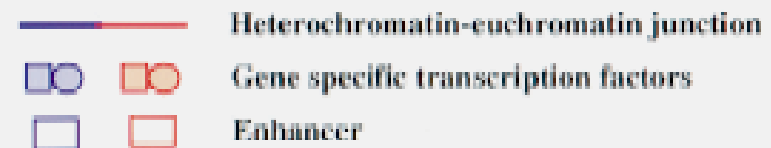
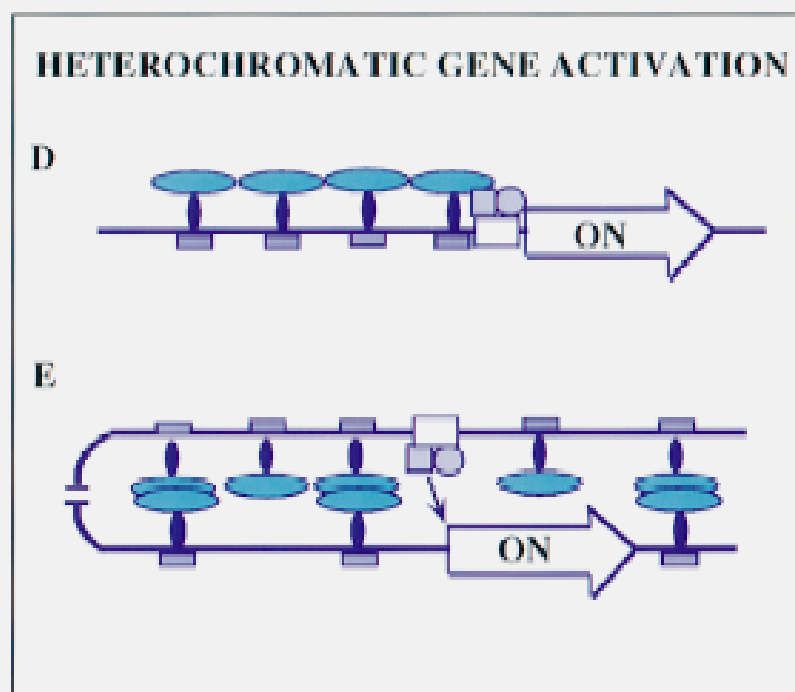
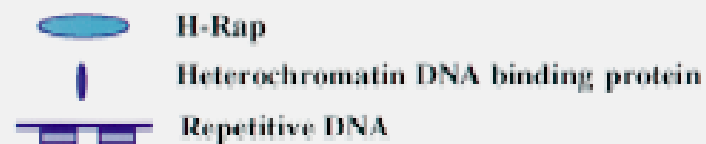
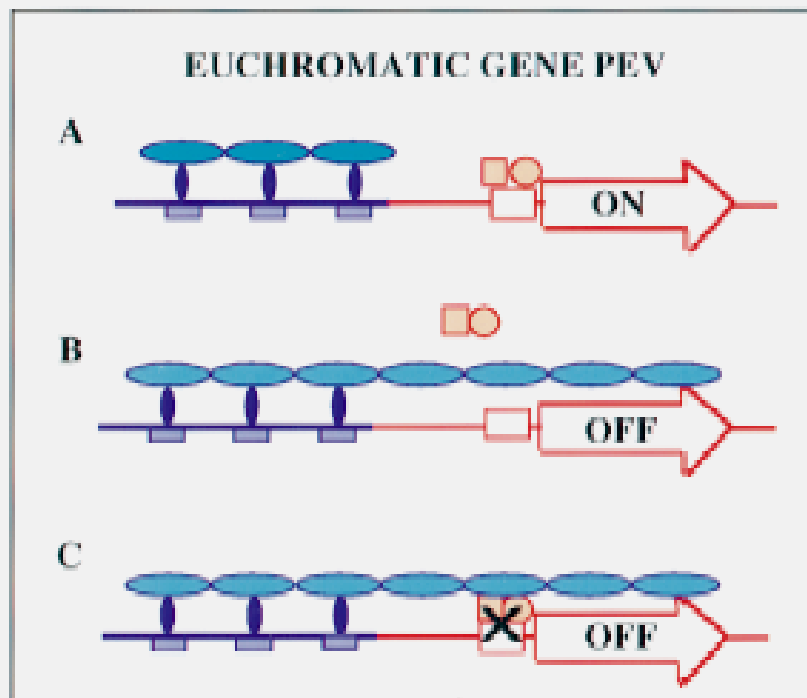
Heterochromatin verursacht Positions Effekt Variegation (PEV)



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

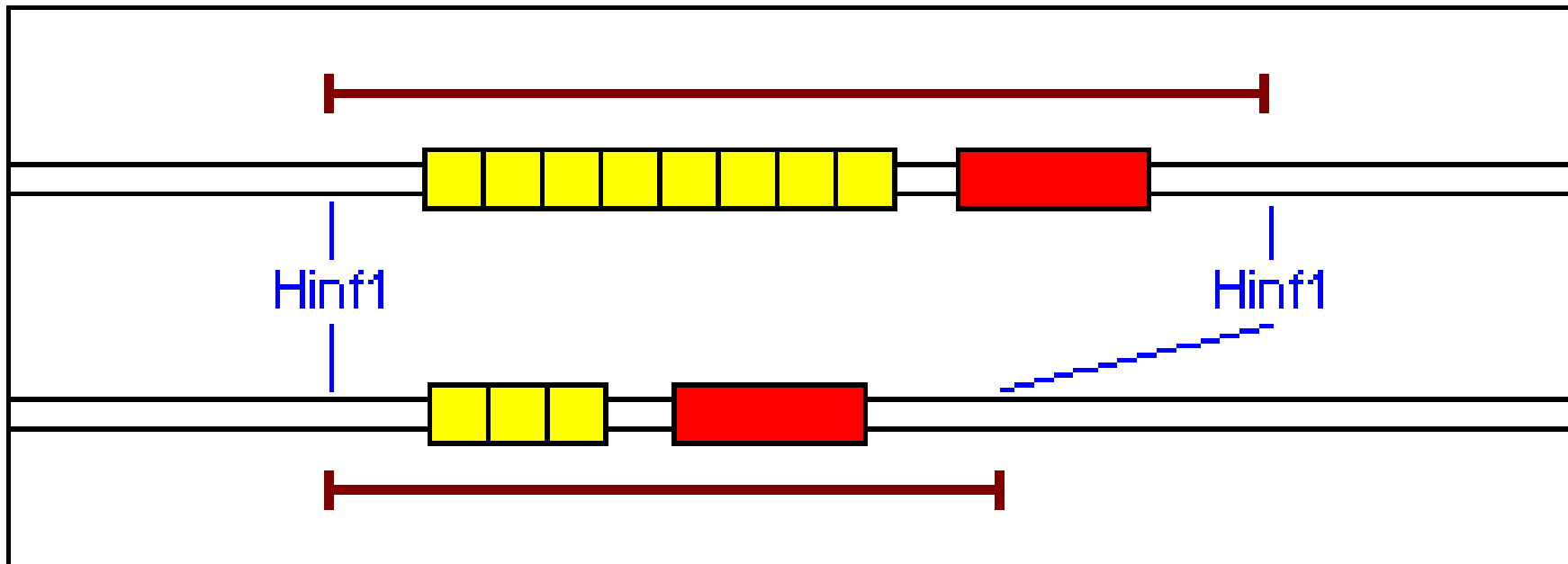
Die Cluster sind im Euchromatin interspergiert:



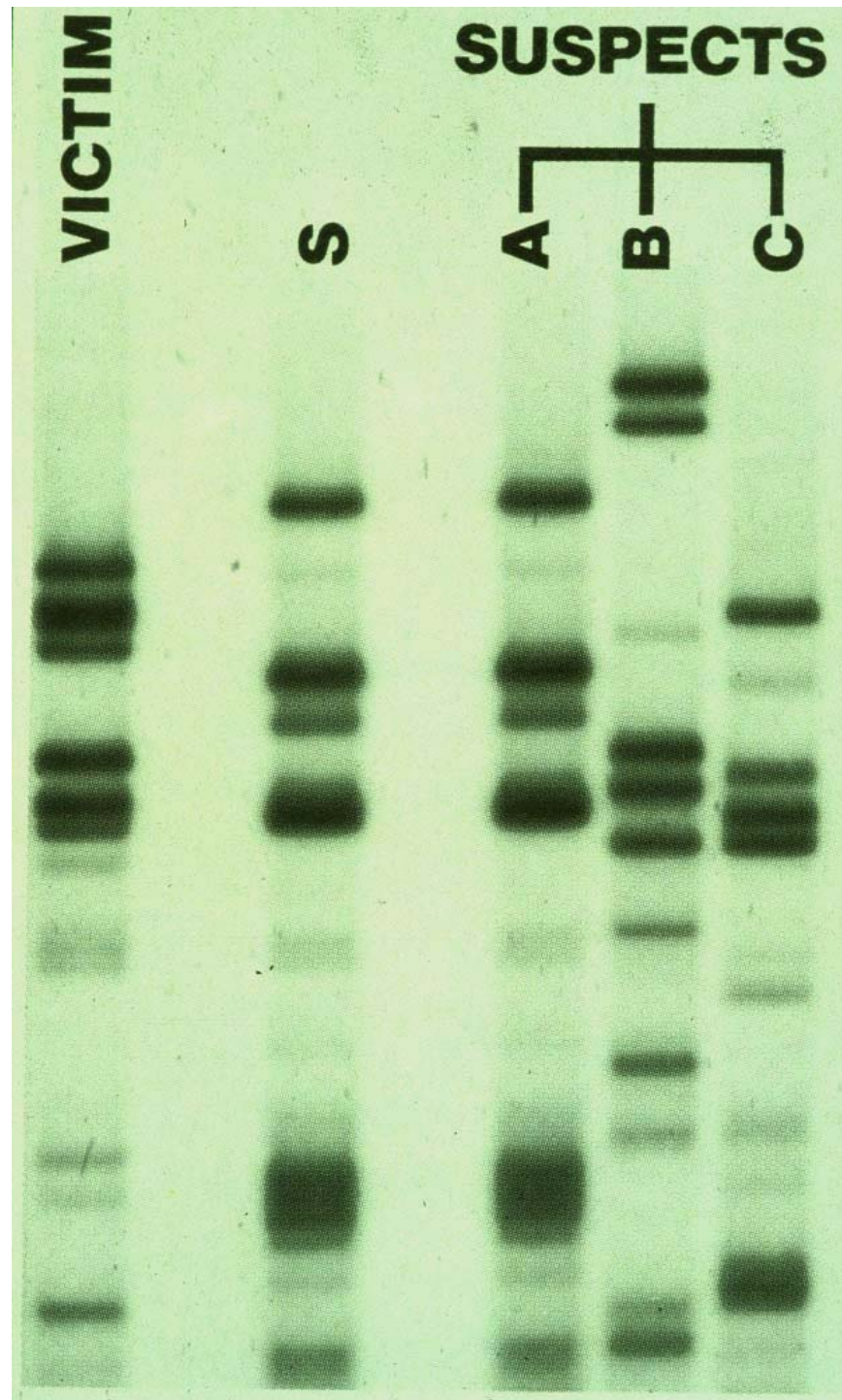
Mini –und Mikrosatelliten

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

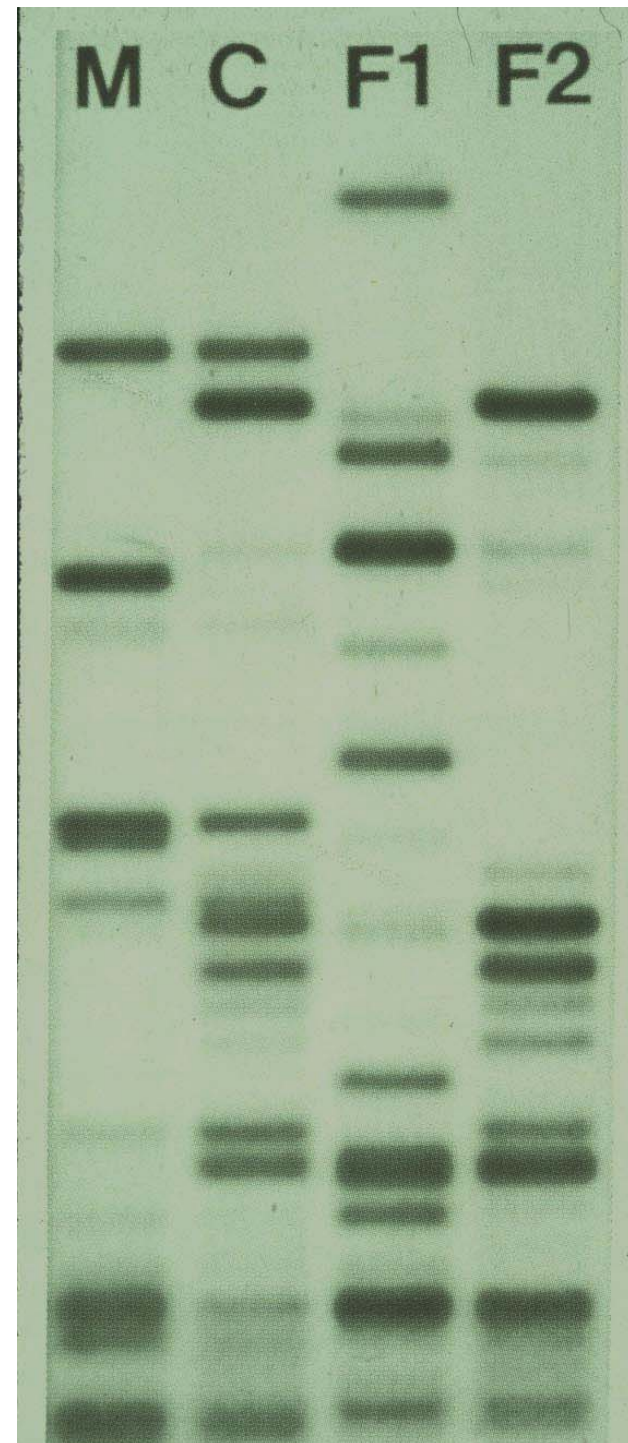
VNTR= variable number of tandem repeats



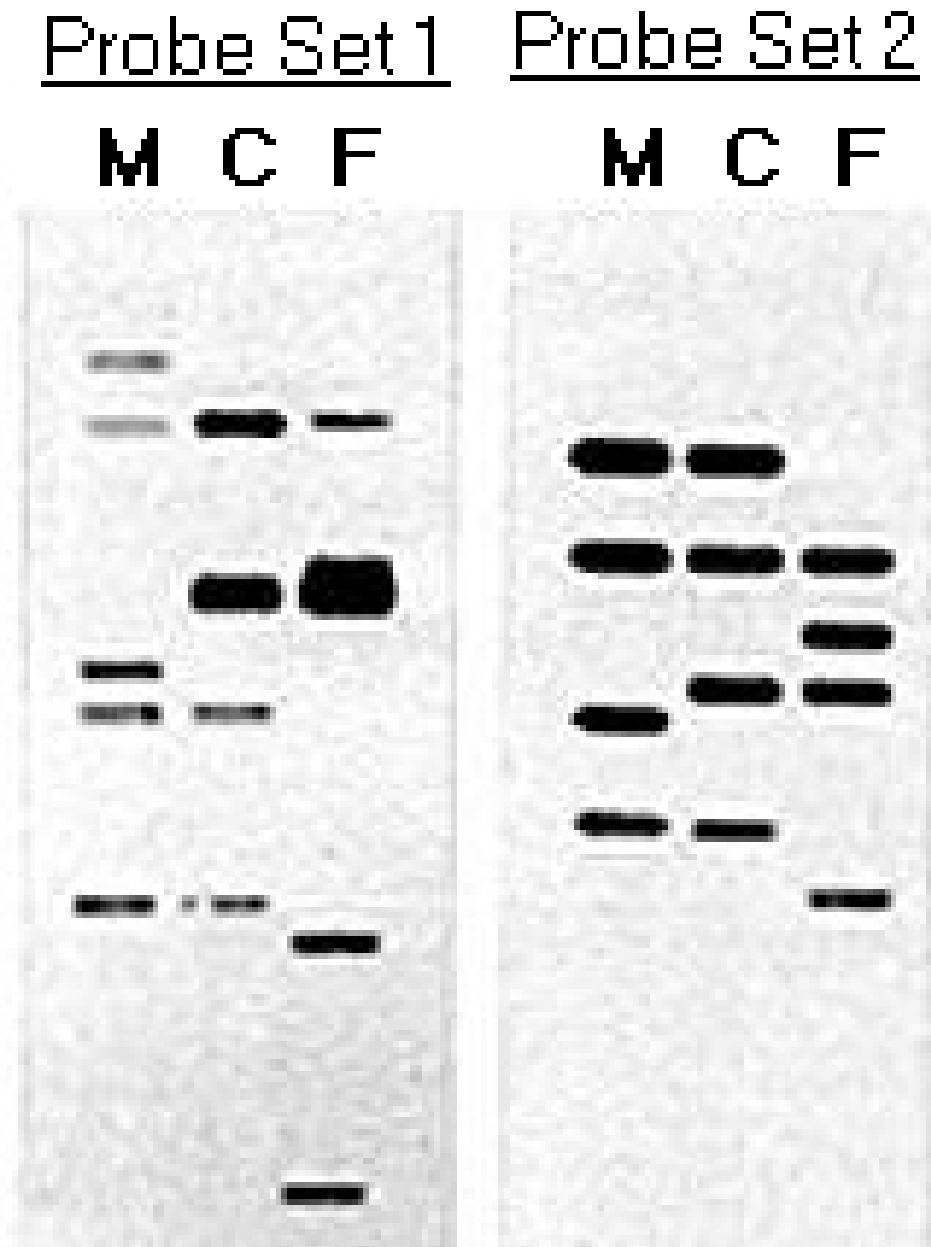
Mini- und
Mikrosatelliten
können wegen
ihrer
hoch-
polymorphen
Struktur zum
DNA-
Fingerprinting
eingesetzt
werden:



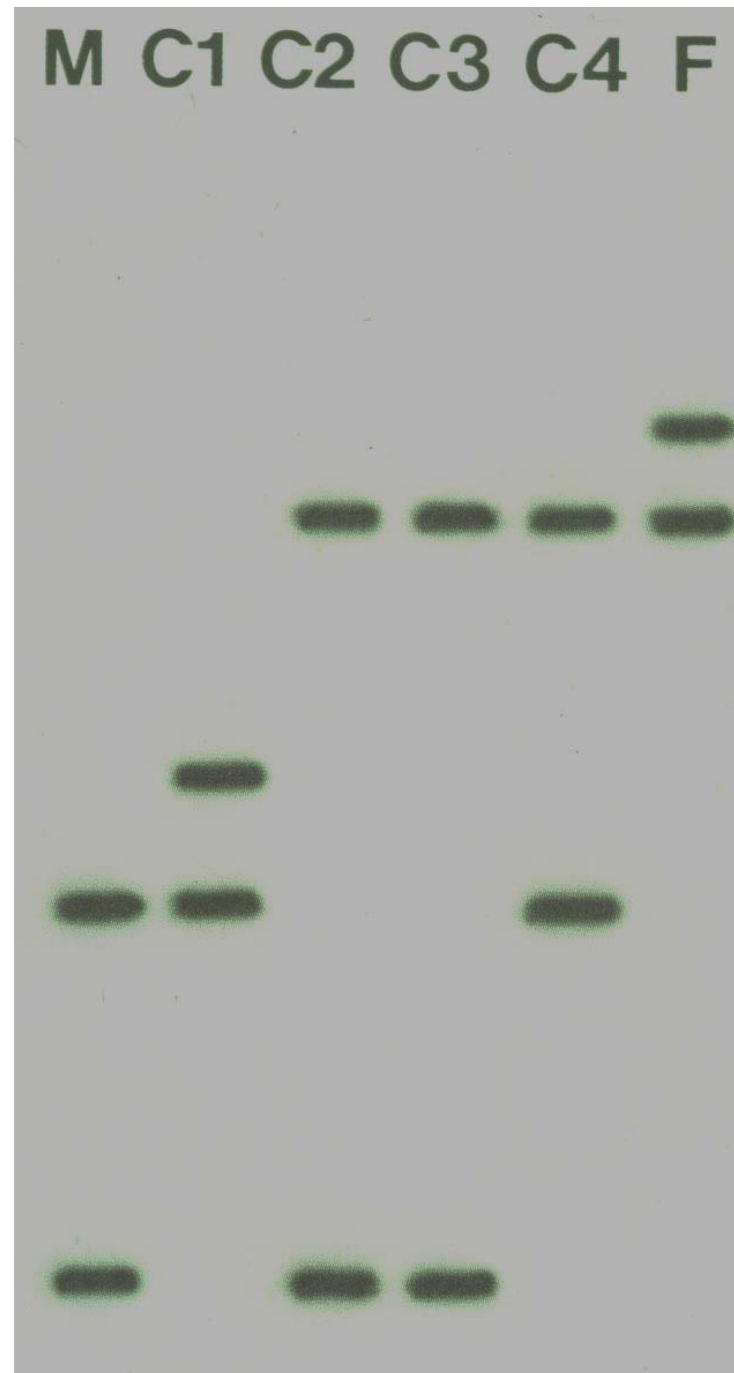
Mini- und
Mikrosatelliten
können wegen
ihrer
hoch-
polymorphen
Struktur zum
DNA-
Fingerprinting
eingesetzt
werden:



Vaterschafts-
bestimmung



Eindeutig?



Gentests in der Kritik

Frankfurter Allgemeine Zeitung 03.12.03

Gene in falschen Händen

Europäische Studie: Mit Gentests wird liederlich umgegangen

Mehr als 730 000 Gentests, nicht eingerechnet die Abertausenden Vaterschaftstests und die in immer größerer Zahl geforderten Erbgutanalysen von Rechtsmedizinern in Strafprozessen, sind im vergangenen Jahr in Europa vorgenommen worden. Ein gewaltig expandierendes Medizingewerbe. Und ein zunehmend undurchsichtiges, mit Qualitätsmängeln und vielen Fragezeichen versehenes Gewerbe, wie ein vor wenigen Tagen vom Joint Research Centre der Europäischen Kommission vorgestellter Bericht klarstellt. Dabei geht es keineswegs um die moralischen, datenschutzrechtlichen oder sonstige juristischen Fragen, die die massenhafte Anwendung medizinischer Gentests mit sich bringt. Bemängelt wird vielmehr in einer selten so nachdrücklich wie klar formulierten Weise der zuweilen laxen Umgang mit der Gendiagnostik in zahlreichen europäischen Labors und Kliniken. Die Entwicklung könnte nach Ansicht der Autoren, wenn nicht bald etwas Durchgreifendes bei der Qualitätssicherung geschieht, angesichts der enormen Wachstumsraten rasch aus dem Ruder laufen.

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

Segmenten ein kleiner Posten. Nur etwa 15 Prozent der mehr als 750 Laboratorien, die Gentests anbieten, werden auf kommerzieller Basis betrieben. Mehr als die Hälfte gehört zu öffentlichen Krankenhäusern. In Deutschland, das mit etwa 90 Labors europaweit einen der vorderen Plätze einnimmt, 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 genetischer Sequenzen oder ganzer Testverfahren die Preise unangemessen in die Höhe zu treiben droht. Noch aber sind die Preise nach Ansicht der Experten mit durchschnittlich rund 573 Euro pro Test recht moderat. Die Preisunterschiede allerdings haben den grenzüberschreitenden „Test-Tourismus“ 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 einer zitierten OECD-Studie annähernd die Hälfte, gaben in Befragungen an, Proben aus dem Ausland zu bearbeiten. Dieser Test-Tourismus wird noch dadurch gefördert, daß Gentests für viele der Hunderte von Krankheiten, für die mittlerweile eine molekulargenetische Diagnose erhältlich ist, nur in bestimmten Ländern angeboten werden. Im Jahr 2001 in Italien vorgenommen. 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 Untersuchungen der europäischen Forschergruppe kaum ermessen. Denn die wenigsten Labore kümmern sich ihren Ermittlungen zufolge um ein adäquates Qualitätsmanagement. 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 Krankheiten initiiert wurde, sei bestenfalls „fragmentarisch und unvollständig“. Annähernd die Hälfte der untersuchten Labore unterliegt keinerlei offiziellen Prüfungen, und mehr als ein Drittel bietet Tests an, deren Güte durch keinerlei externe Qualitätsprüfung – der „Goldstandard“ der Qualitätssicherung – belegt ist. Hinzu kommt, daß in verschiedenen Ländern völlig unterschiedliche Maßstäbe an die Anforderungen solcher Laboratorien und an die Ausbildung des Personals gestellt werden. Von der Testflut werden auch die Datenbanken, die verschie-

Natur und Wissenschaft

Weitere Berichte täglich auf der zweiten Seite des Feuilletons

schon hatte die Deutsche Forschungsgemeinschaft in einer Stellungnahme zur prädiktiven genetischen Diagnostik eine verbesserte, gesetzlich geregelte Qualitätssicherung eingefordert. Adressat war seinerzeit vor allem das Bundesgesundheitsministerium, das seit fast drei Jahren an einem „Gentest-Gesetz“ bastelt. Doch wie in dem ursprünglichen Eckpunktepapier beschränkt man sich in dem noch immer weitgehend geheimgehaltenen Referentenentwurf darauf, bei der Qualitätssicherung auf den sogenannten „Arztvorbehalt“ zu bauen. Dabei geht es darum, sicherzustellen, daß genetische Untersuchungen „nur durch hierfür qualifizierte Ärztinnen und Ärzte veranlaßt werden“ und die „Durchführung nur auf deren Veranlassung nach fachlicher Weisung unter ihrer Aufsicht oder durch eine von ihr beauftragte und dafür qualifizierte Person oder Organisation“ zu erfolgen habe. Das Ergebnis der Untersuchung dürfe zudem „dem genetisch Untersuchten nur durch den veranlassenden Arzt mitgeteilt werden“.

Daß sich allein mit solchen Anforderungen

Frankfurter Allgemeine Zeitung 03.12.03

Gene in falschen Händen

Europäische Studie: Mit Gentests wird liederlich umgegangen

Mehr als 730 000 Gentests, nicht eingerechnet die Abertausenden Vaterschaftstests und die in immer größerer Zahl geforderten Erbgutanalysen von Rechtsmedizinern in Strafprozessen, sind im vergangenen Jahr in Europa vorgenommen worden. Ein gewaltig expandierendes Medizingewerbe. Und ein zunehmend undurchsichtiges,

Segmenten ein kleiner Posten. Nur etwa 15 Prozent der mehr als 750 Laboratorien, die Gentests anbieten, werden auf kommerzieller Basis betrieben. Mehr als die Hälfte gehört zu öffentlichen Krankenhäusern. In Deutschland, das mit etwa 90 Labors europaweit einen der vorderen Plätze einnimmt, sind allerdings schon annähernd die

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

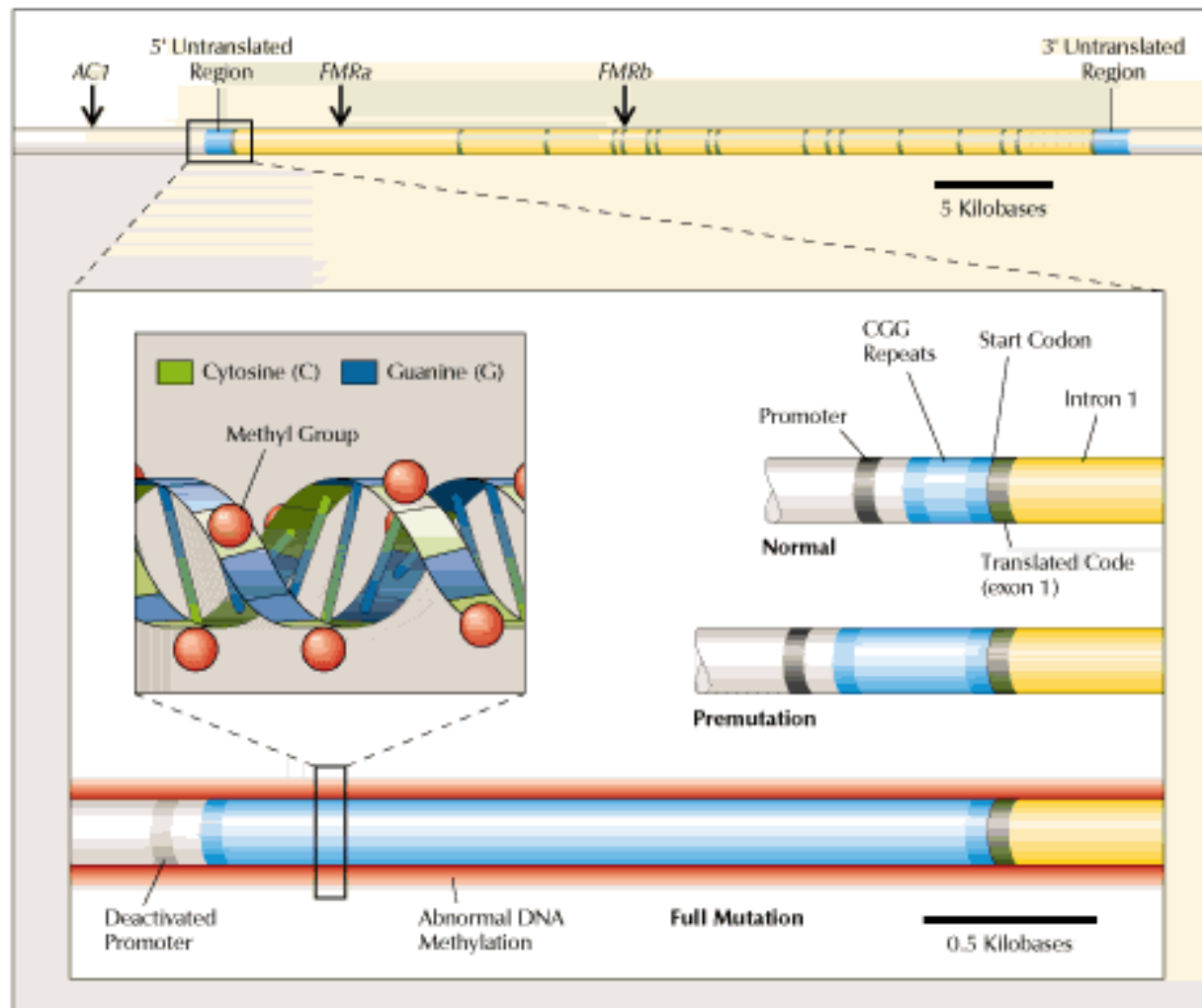
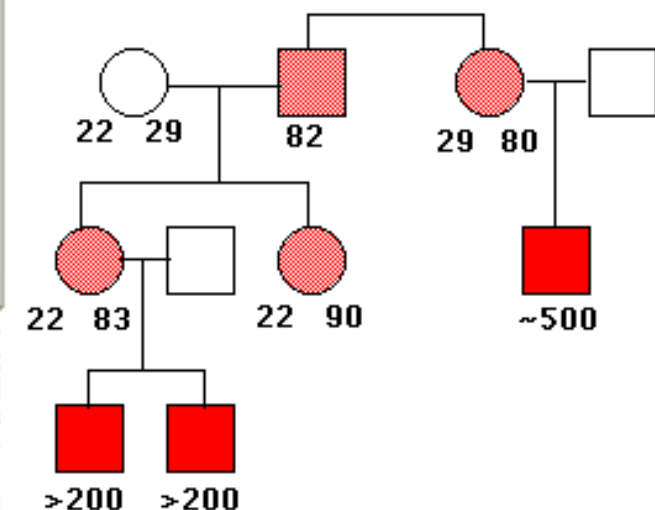
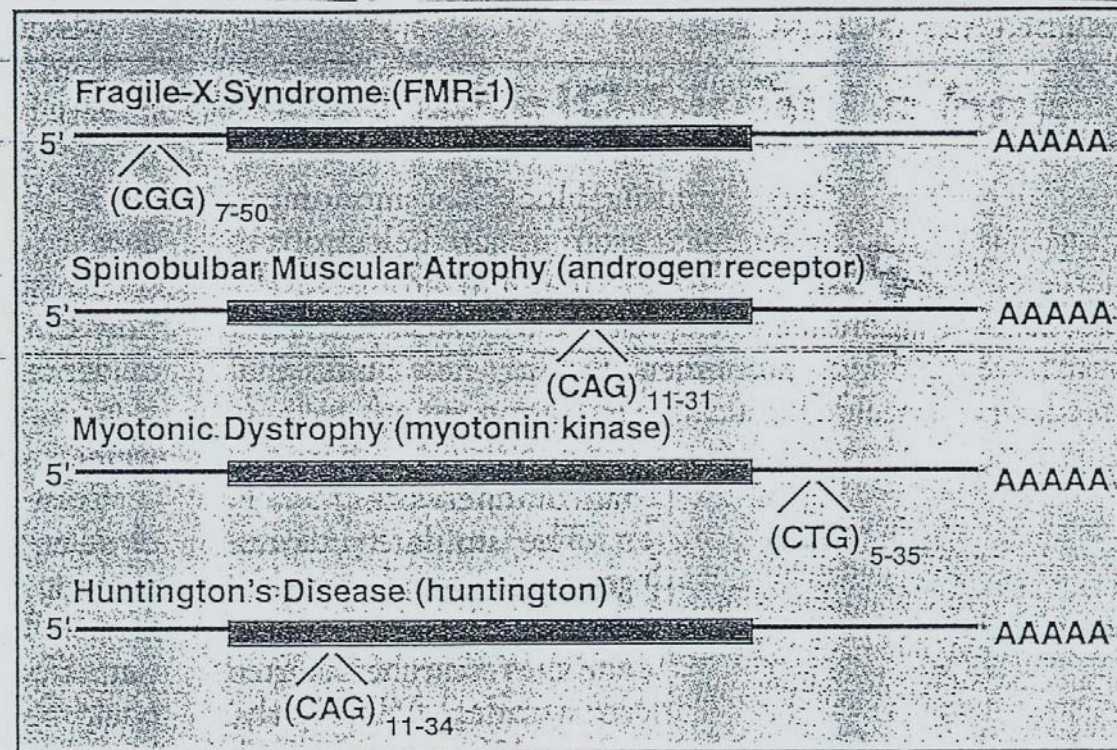


Figure 3. Trinucleotide expansion responsible for fragile X syndrome lies in an unexpressed part of the X-linked gene *FMR1*. The gene itself (top) divides its code into 17 exons spread over 38 kilobases. Its first and last exons include regions transcribed into messenger RNA that are not represented 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



SOURCE: STEPHEN WARREN ILLUSTRATION: H. BISHOP

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.

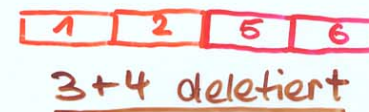
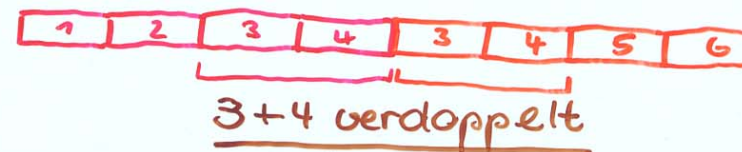
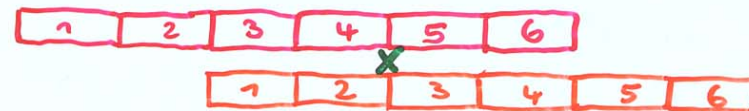
Science, Juni 93

Wie kann
Satelliten-
DNA
entstehen?

Vermehrung von
"tandem repeats"
durch
"ungleiches Crossover"



"falsche" Paarung und Crossover (x)



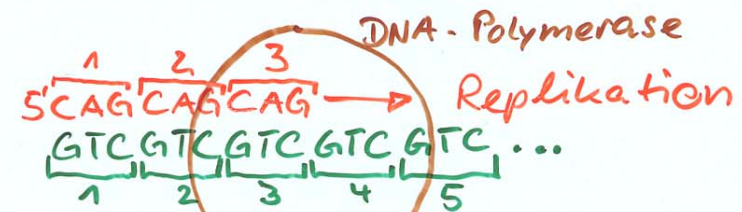
Für Mikro-Satelliten-DNA wird das Slippage-Replikation-Modell angenommen

Entstehung von
"simple repeats"

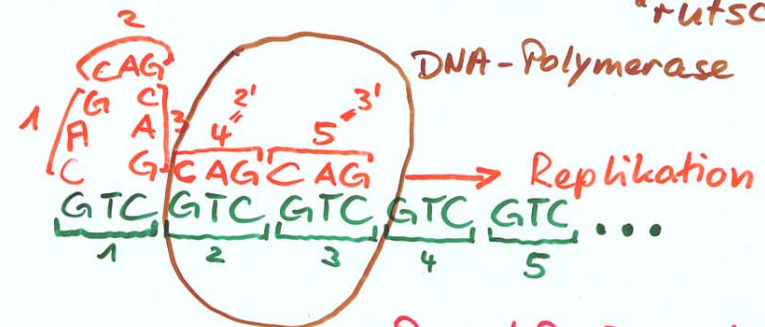
durch

"Slippage replication"

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



"Slippage" (DNA-Polymerase
"rutscht")



Repeat 2 + 3 werden
verdoppelt!