

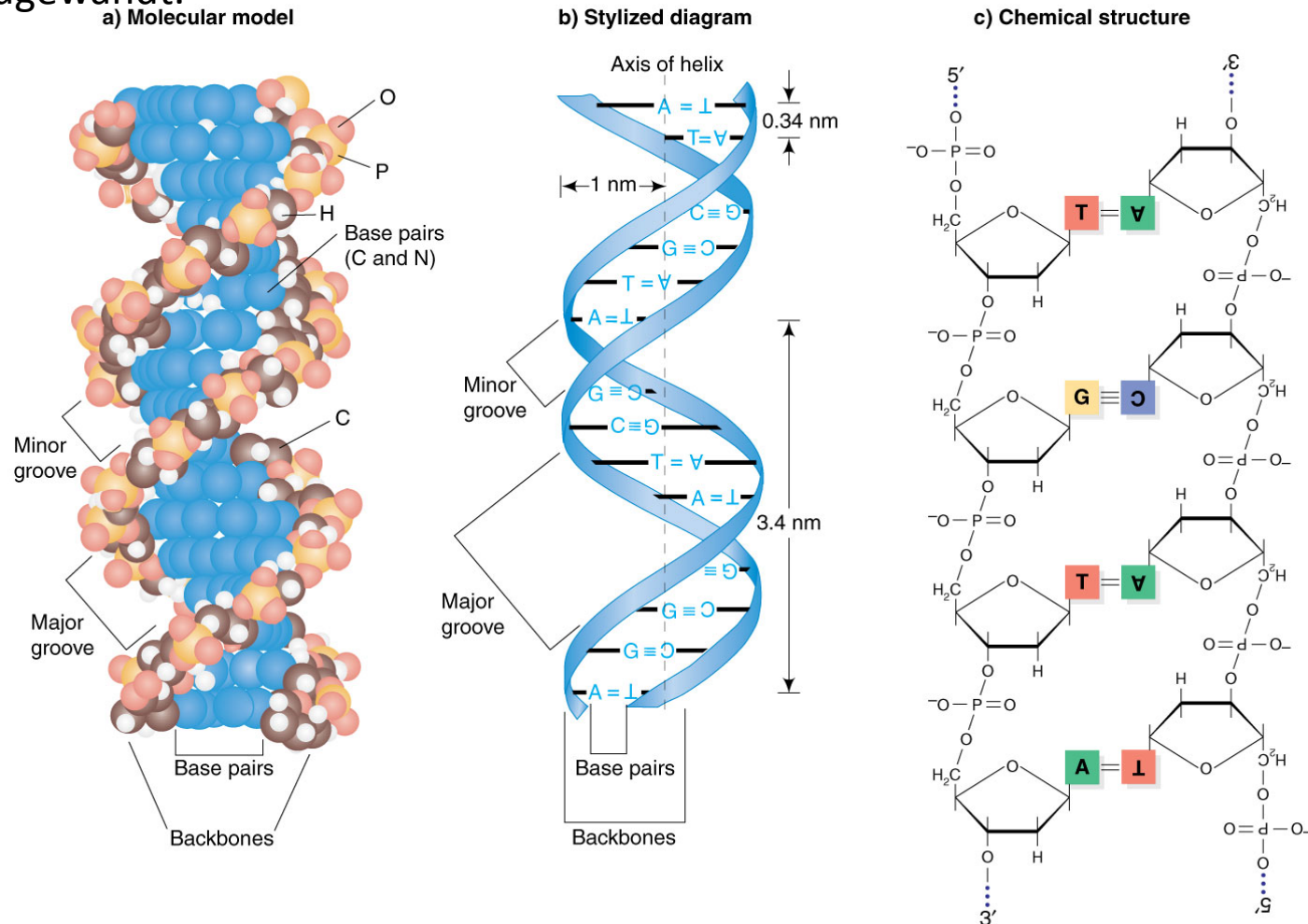
Watson und Crick postulierten:

1. Die DNA besteht aus zwei Polynukleotidketten welche sich rechtsdrehend umeinander winden
2. Die zwei Polynukleotidketten verlaufen antiparallel
3. Das Zucker-Phosphat Rückgrat befindet sich auf der Aussenseite der Helix, während die Basen in deren Inneren übereinander gestapelt liegen.
4. Die Basen der zwei Ketten sind durch schwache Wasserstoffbrücken miteinander Verbunden. A-T Basenpaare und G-C Basenpaare passen in die Dimension der Doppelhelix. Dies führt zur Komplementarität der zwei Helices
5. Einzelne Basenpaare in der Helix sind 0,34 nm voneinander entfernt. Eine Drehung der Helix nimmt 10bp oder 3,4 nm ein. Die Helix ist 2nm im Durchmesser.
6. Das Rückgrat der DNA wird durch eine **deoxy**-Phospho-Ribose Kette aufgebaut, welche die Helix asymmetrisch umwinden. Dies führt zur Bildung der Minor und Major Groove (Grosse und kleine Furche).

Die Struktur der DNA

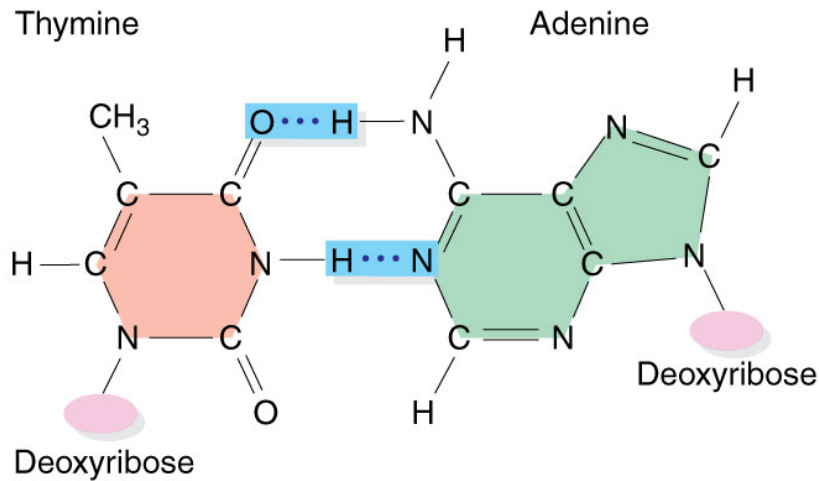
DNA bildet eine rechts-drehende B-Form Helix aus.

Das Phosphodiester Rückgrat umschließt die **minor groove**, die Basen sind der **major groove** zugewandt.

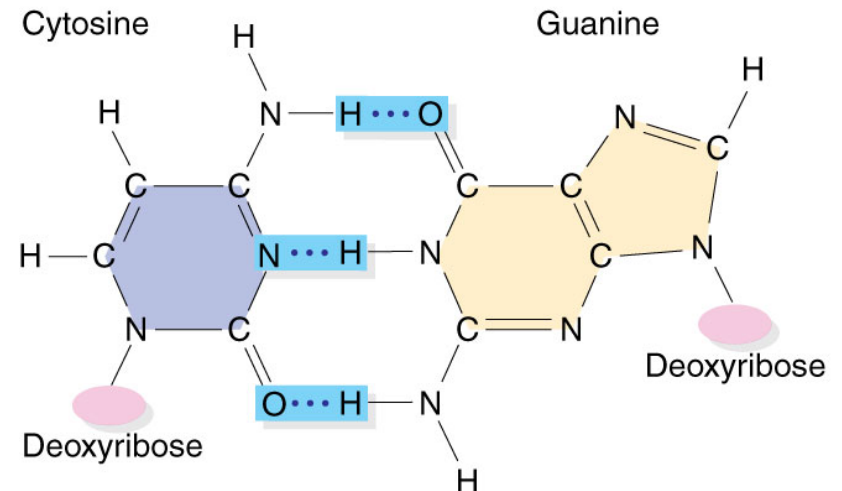


A-T Basenpaare bilden **zwei** Wasserstoffbrücken aus
G-C Basenpaare bilden **drei** Wasserstoffbrücken aus

a) Adenine–thymine base pair
(Two hydrogen bonds)



b) Guanine–cytosine base pair
(Three hydrogen bonds)



© 2010 Pearson Education, Inc.

Wasserstoffbrücken stellen schwache Bindungen dar, welche durch Erhitzen leicht gelöst werden können. **D.h. Erhitzen denaturiert die DNA.**

Basenkomplementarität ermöglicht die Herstellung zweier exakter Kopien bei der Replikation



Verpackung von DNA

DNA ist ein langes, lineares Molekül. In der Zelle ist die DNA daher **enger gepackt**.

Verschiedene Organismen haben unterschiedliche Organisation der Genome:

Viren: DNA oder RNA, linear oder zirkulär

Prokaryoten: zirkuläre chromosomale DNA und extrachromosomale zirkuläre DNA-Plasmide. Manchmal auch lineare Chromosomen.

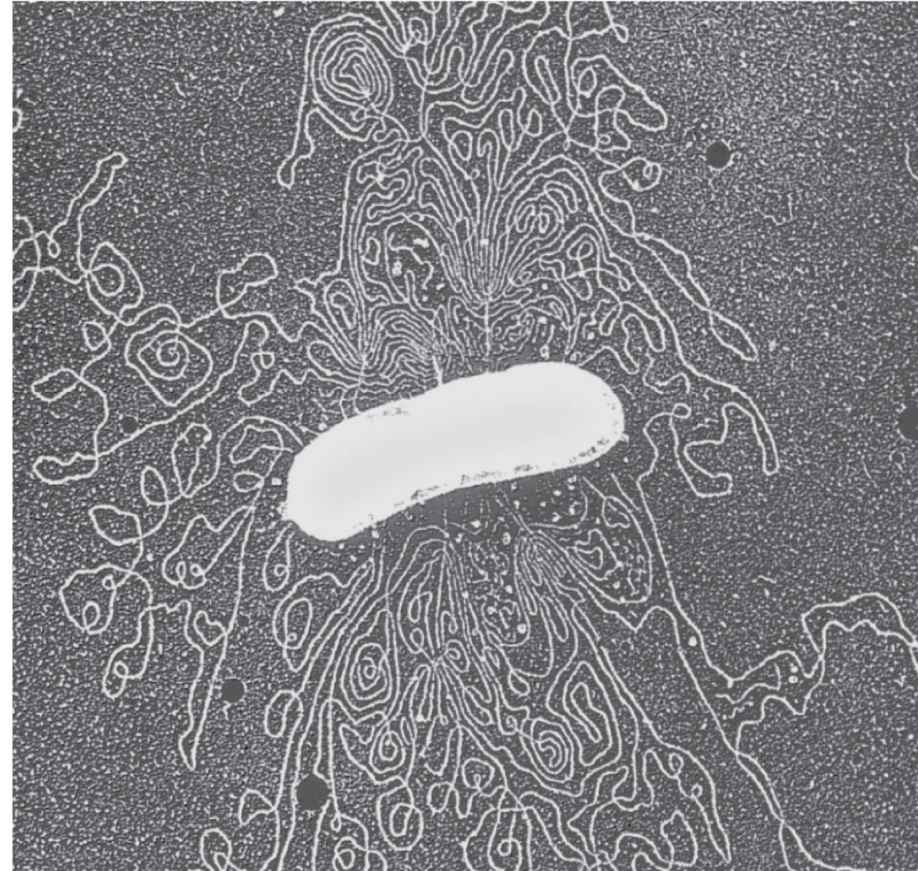
Eukaryoten: lineare DNA Chromosomen

Organellen: zirkuläre DNA Genome

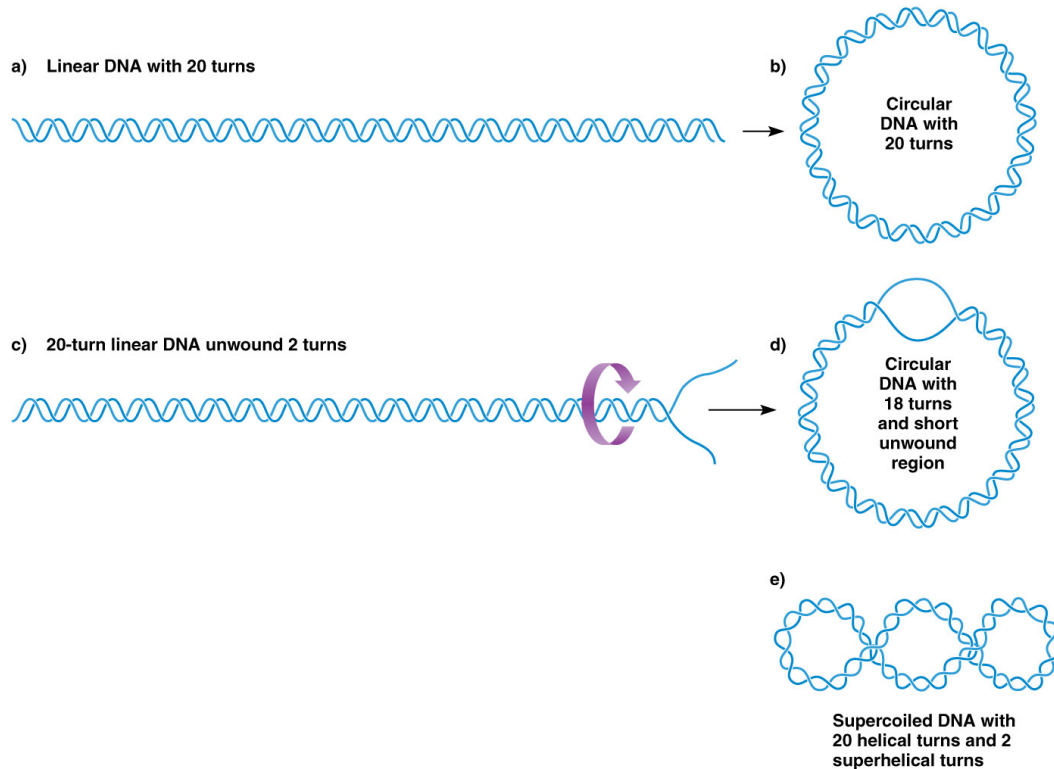
In **Bakterien und Archea** kann die chromosomale DNA eng als

Nucleoid gepackt sein.

Ein E.coli Chromosom ist ca 1.100µm lang (1.1 mm, oder 1.000mal länger als das Bakterium).



Bakterielle DNA ist stärker gepackt durch **supercoiling**. Wird einer der beiden Stränge eines **Supercoils** gebrochen, so entsteht ein open circle.



Circle

Circle mit kurzer ungepaarter Region

Faltet spontan in die energisch stabilere Supercoil Konformation

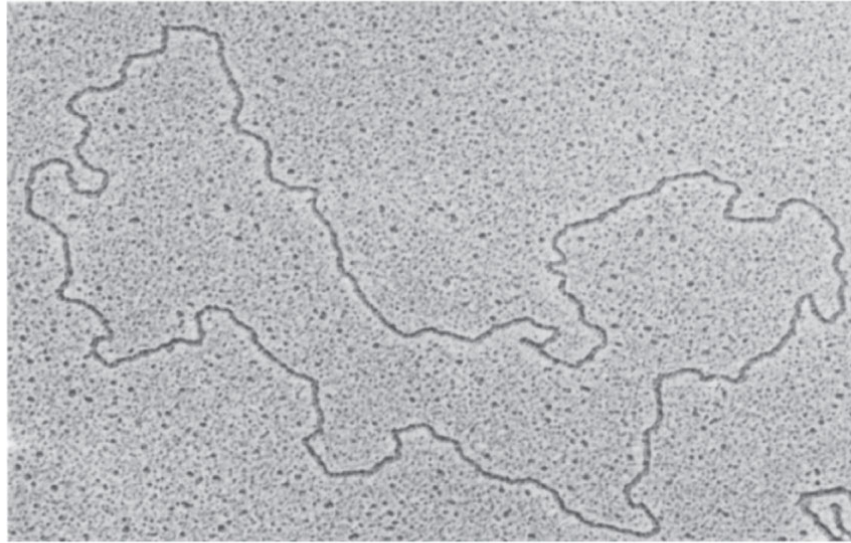
Durch Einzelstrangbruch (nick) entsteht ein open circle

Supercoiling kann *positiv* (mehr Windungen) oder *negativ* (weniger Windungen) sein.

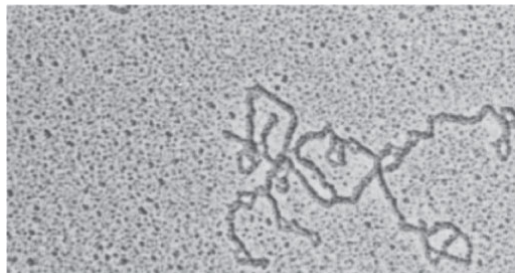
Supercoiling wird durch **Topoisomerasen** herbeigeführt. Topoisomerasen spalten DNA, winden (oder entwinden diese) und verknüpfen diese wieder.

Topoisomerasen sind für alle Arten der DNA Kompaktierung essenziell.

a) Relaxed circular DNA

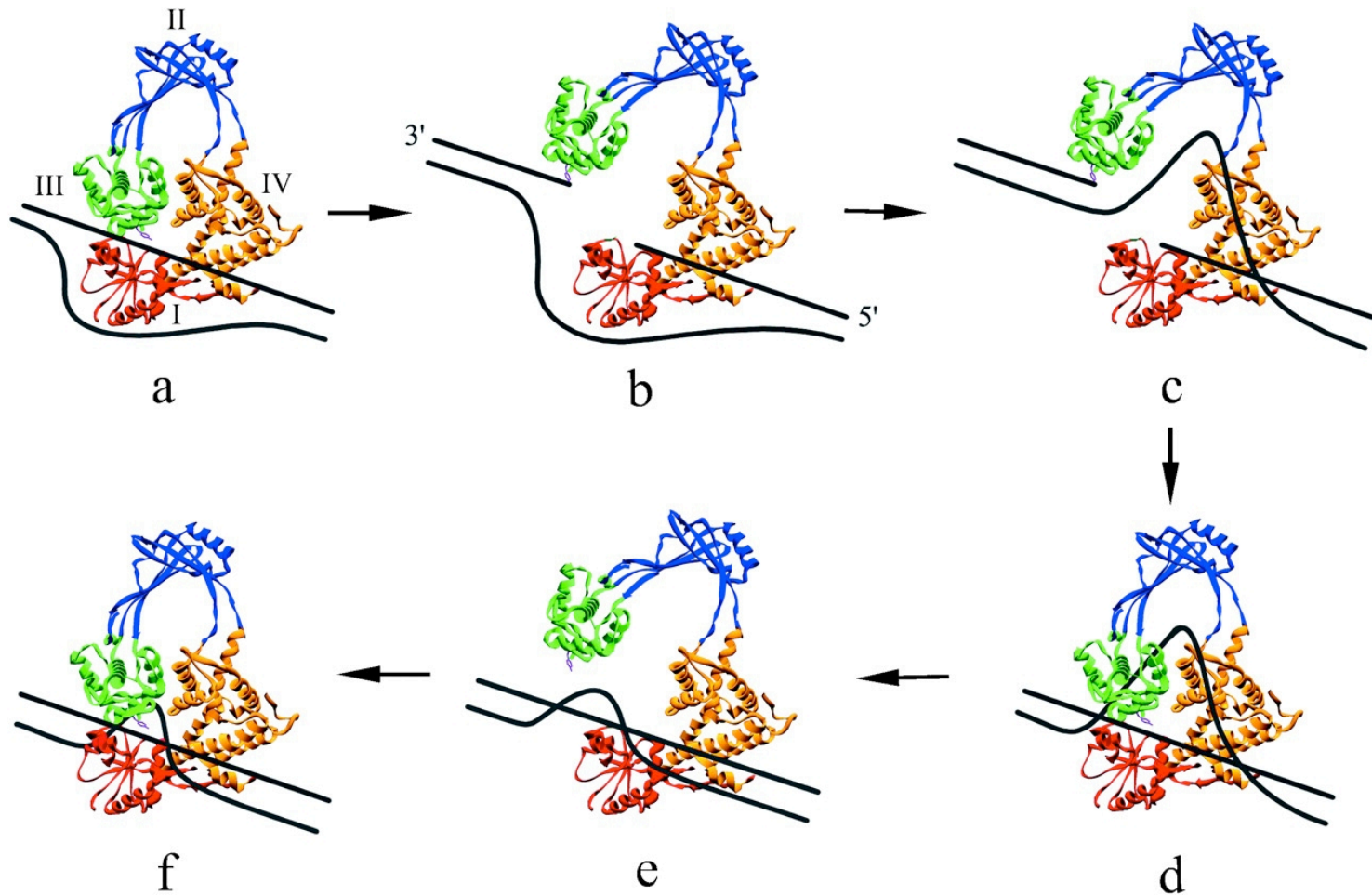


b) Supercoiled circular DNA

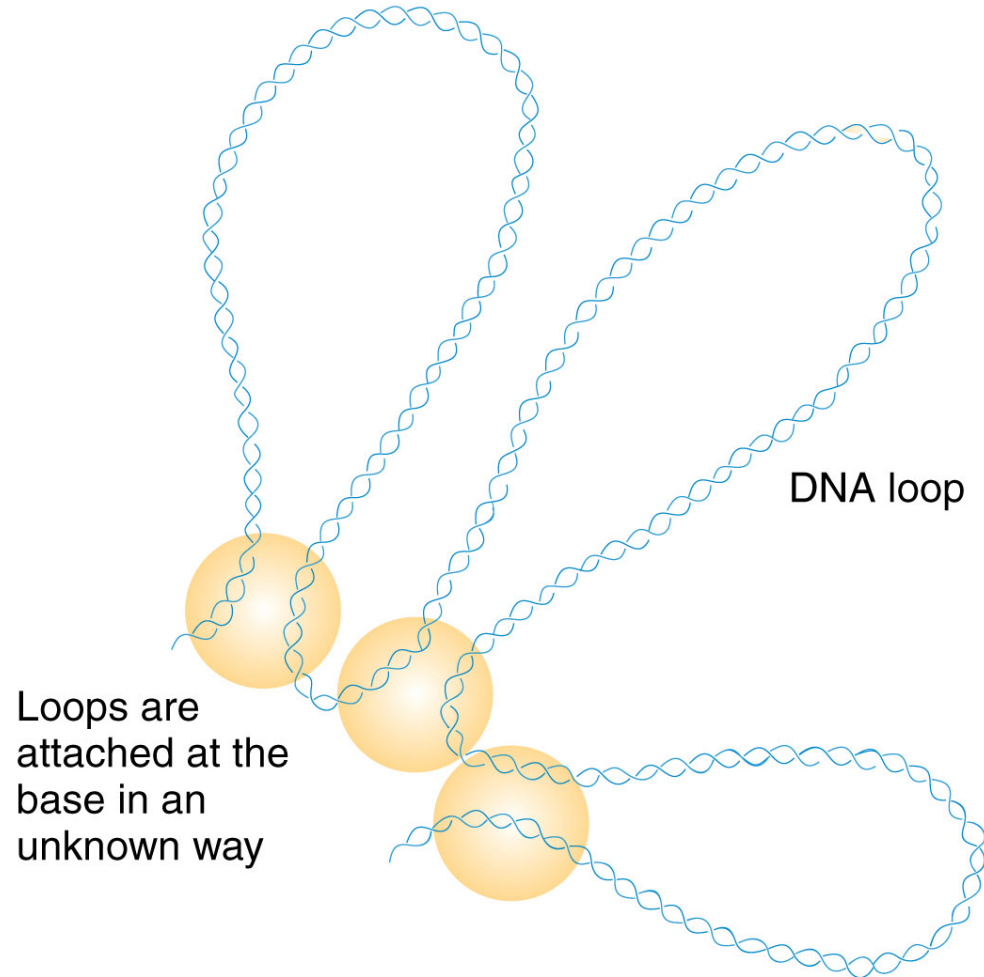


Topoisomerase Typ I:

schneidet einen Strang und führt den zweiten Strang der Helix durch den geschnittenen Strang



Zusätzlich sind bakterielle Chromsomen in **loops** organisiert. Es ist nicht klar, welche Proteine an der Basis der loops sitzen. Die loops sind widerum negativ supercoiled.



Eukaryotische Chromosomen

Die meisten Eukaryoten sind **Diploid** (besitzen jeweils 2 –nahezu-
identische Chromosomen 1x väterlich, 1x mütterlich).

z.B der menschliche diploide Karyotyp besteht aus 46 Chromosomen.

23 Von der Eizelle und 23 durch das Spermium übertragen.

Der C-Wert (C-value)

Der C Wert bezeichnet den haploiden , nicht replizierten DNA Gehalt einer Zelle in pg oder bp.

Der C-Wert verschiedener Organismen kann enorme Unterschiede aufweisen.

Table 2.3 Haploid DNA Content, or C-Value, of Selected Species (continued)

Species	C-Value (bp)
Eukarya	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast; brewer's yeast)	13,105,020 ^a
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast)	12,590,810 ^a
<i>Plasmodium falciparum</i> (Malaria parasite)	22,859,790 ^a
<i>Lilium formosanum</i> (lily)	36,000,000,000
<i>Zea mays</i> (maize, corn)	5,000,000,000
<i>Oryza sativa</i> (rice)	370.792,000 ^a
<i>Amoeba proteus</i> (amoeba)	290,000,000,000
<i>Aedes aegypti</i> (mosquito)	1,310,900,000 ^a
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	132,576,936 ^a
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode)	100,269,800 ^a
<i>Danio rerio</i> (zebrafish)	1,527,000,581 ^a
<i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)	3,100,000,000
<i>Mus musculus</i> (mouse)	3,420,842,930 ^a
<i>Rattus rattus</i> (rat)	2,719,924,000 ^a
<i>Loxodonta africana</i> (African elephant)	3,000,000,000
<i>Canis familiaris</i> (dog)	2,443,707,000 ^a
<i>Equus caballus</i> (horse)	3,311,000,000
<i>Macac mulatta</i> (rhesus macaque)	3,097,179,960 ^a
<i>Pan troglodytes</i> (chimp)	3,350,417,645 ^a
<i>Homo sapiens</i> (humans)	3,253,037,807 ^a

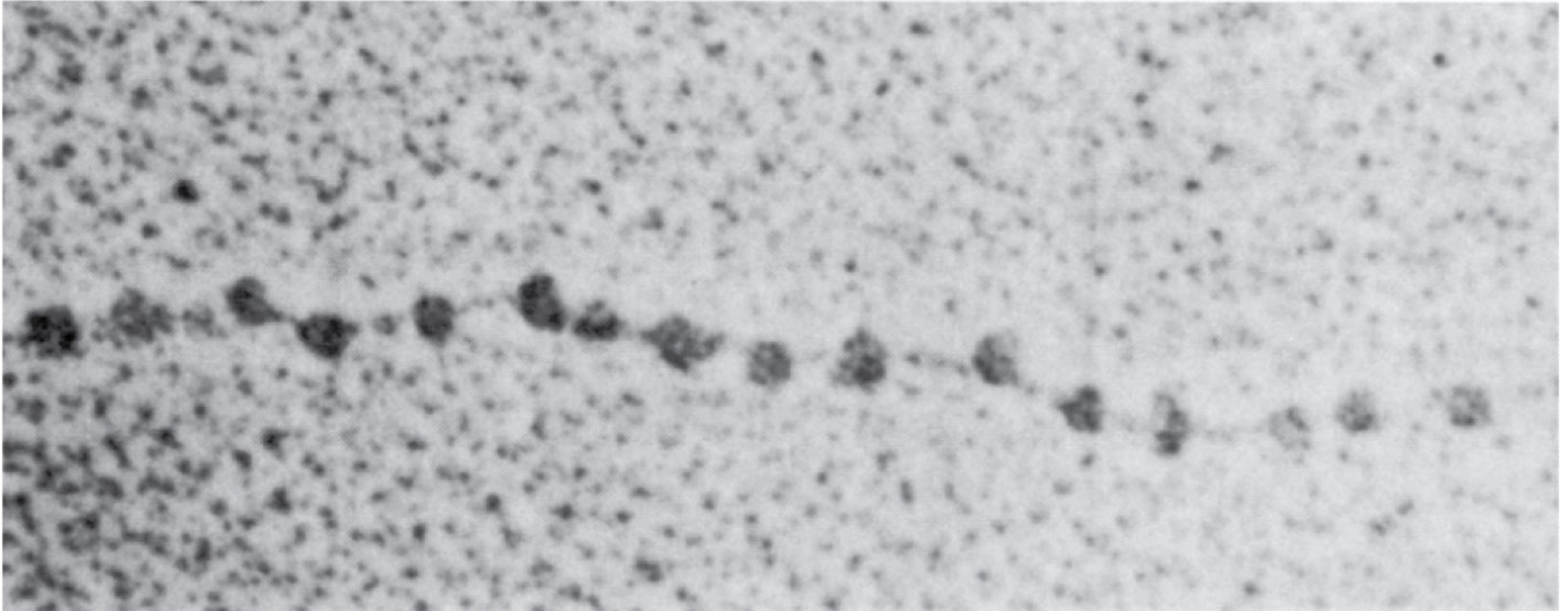
^aThese C-values derive from the complete genome sequence; all others are estimates based on other measurements.

Im Zellkern von Eukaryoten ist DNA als Chromatin organisiert.

Chromos=Farbe, Chromatin-färbbar.

Die DNA des menschlichen Genoms ist ca 2m lang, passt jedoch in einen 10 μm grossen Zellkern. Dies wird durch Verpackung bewerkstelligt.

DNA komplexiert mit Histonen (ist um Histone gewickelt) und ergibt so die 10 nm fiber

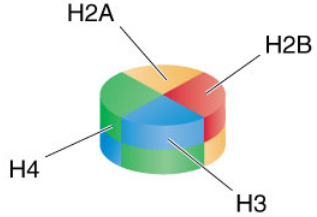


Histone sind Oktamere bestehend aus je **2x H2a, H2b, H3, H4**

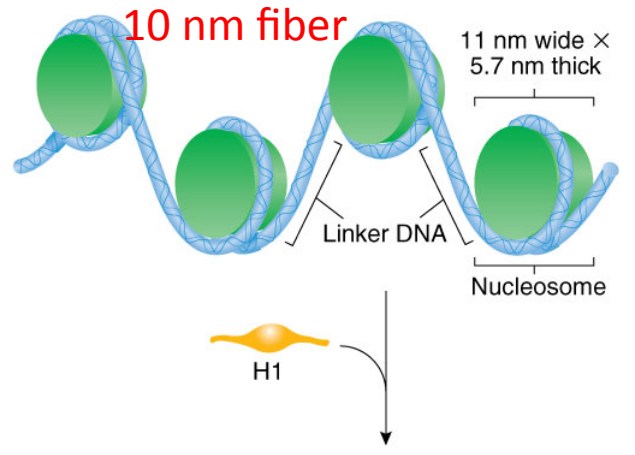
DNA ist 2x um das Histon Oktamer (146bp) gewunden

Das Linker Histon H1, ermöglicht höhere Kompaktierung. Dies führt zur Bildung der 30 nm fiber.

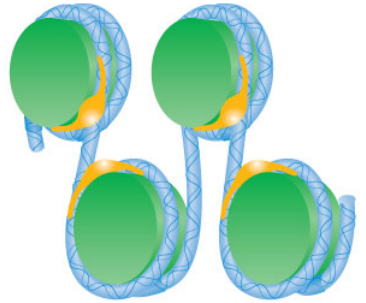
a) Histone core for the nucleosome



b) Basic nucleosome structure in "beads-on-a-string" chromatin

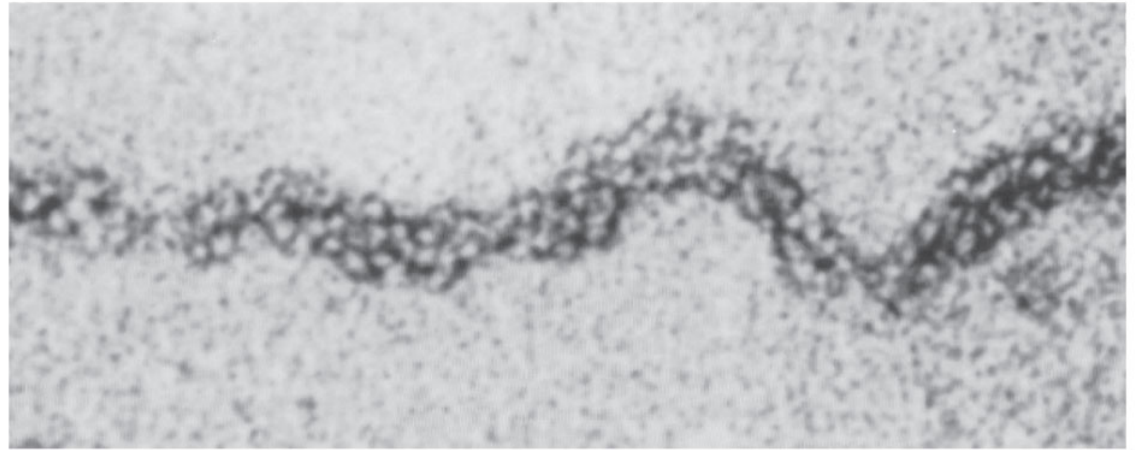


c) Chromatin condensation by H1 binding



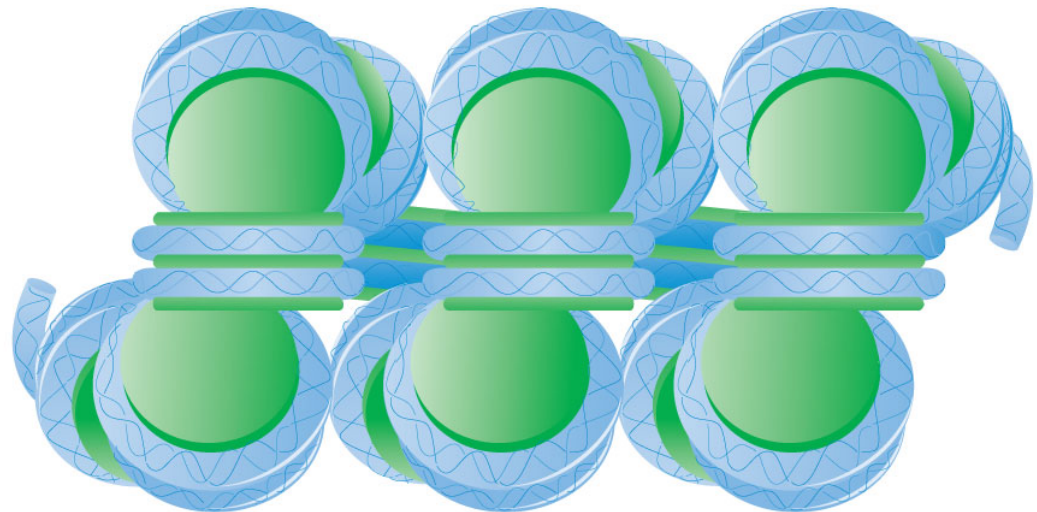
Die 30 nm Struktur
wird durch ein
Solenoid ausgebildet

a) Electron micrograph of 30-nm chromatin fiber

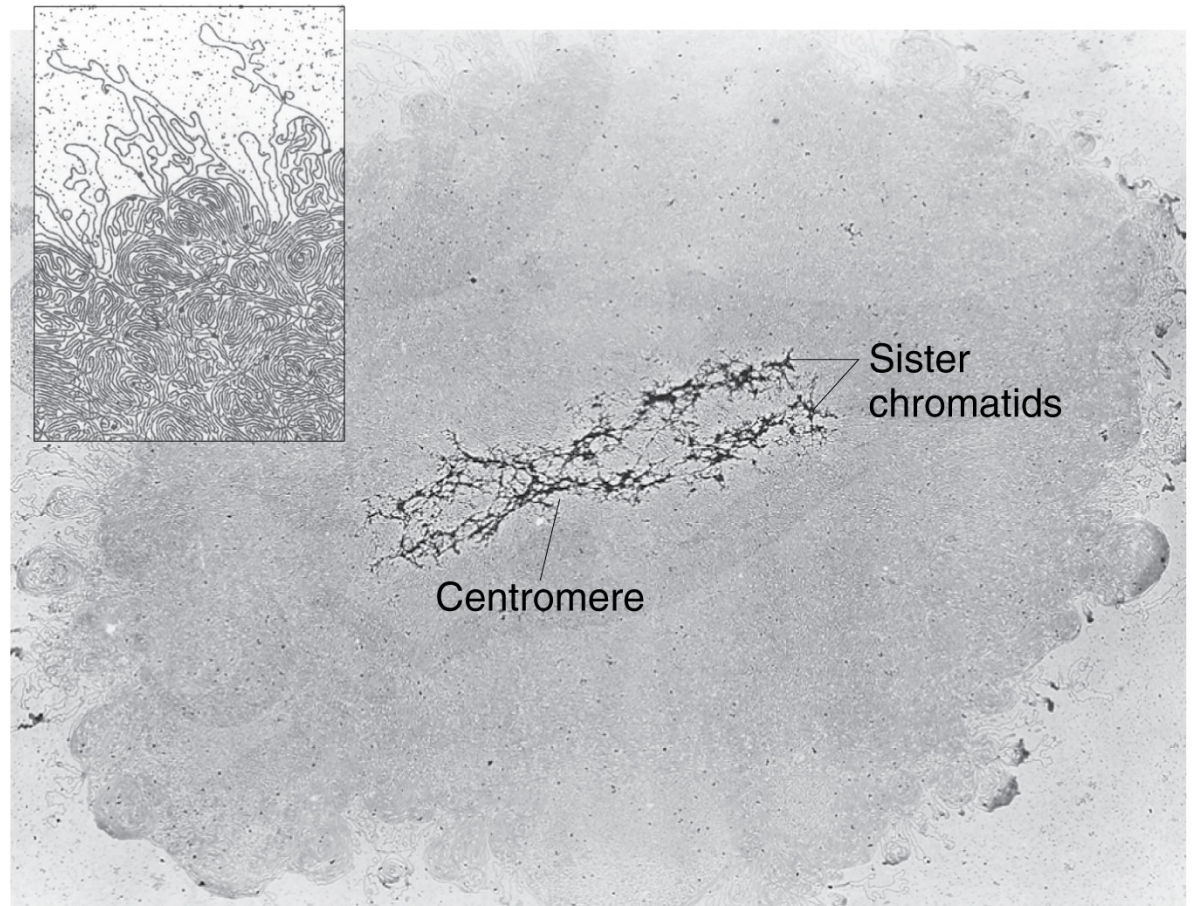


b) Solenoid model for nucleosome packaging
in the 30-nm chromatin fiber (H1 is not shown)

30 nm fiber

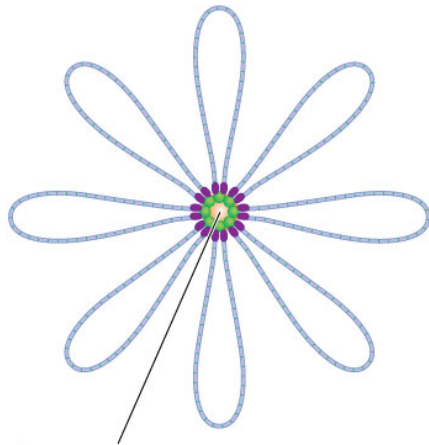


In der Zelle ist DNA vermutlich in Schleifen organisiert. In der Metaphase sind diese Schleifen am Chromosome Scaffold (Achsen von Metaphasechromen) angeheftet.



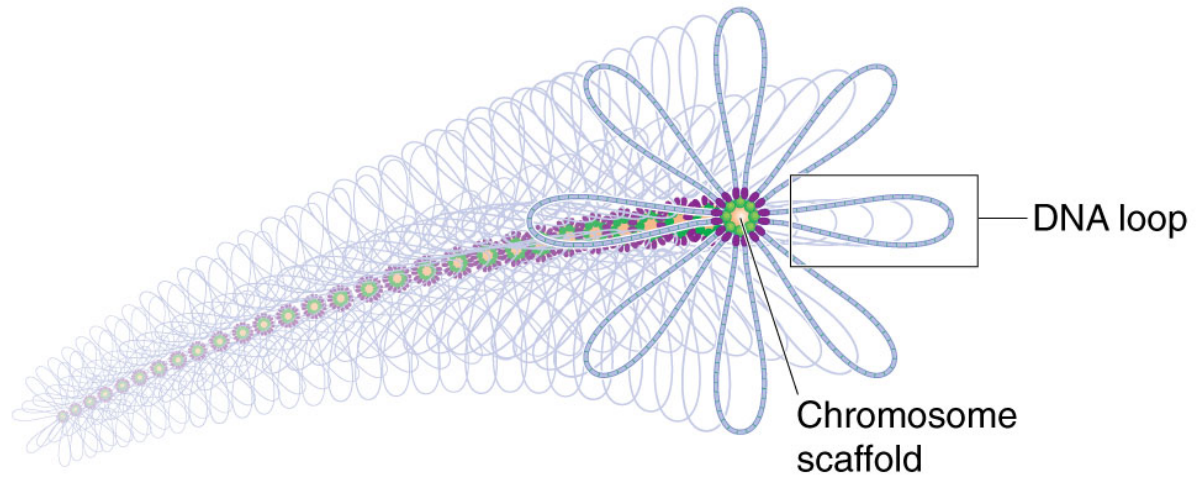
Modell einer Metaphasen-Chromatide

a) Fiber loops of 30-nm chromatin fibers attached to chromosome scaffold



Other nonhistone scaffold components

b) Model of section of metaphase chromosome



DNA-Kondensation im Zellzyklus

Während des Zellzyklus ist DNA unterschiedlich kondensiert. In der Mitose ist die gesamte DNA stark kondensiert.

In der Interphase ist **Euchromatin** (beinhaltet Gene) dekondensiert.

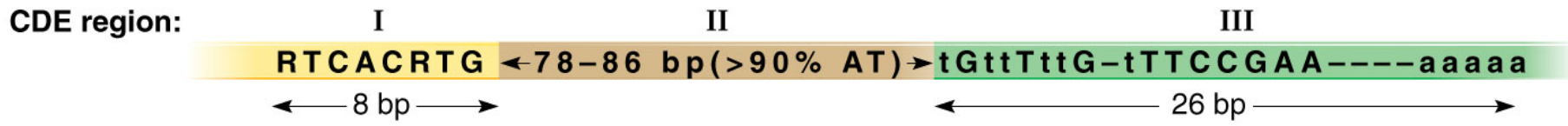
Heterochromatin (beinhaltet nicht kodierende DNA z.B. Transposable Elemente) bleibt auch in der Interphase kondensiert.

Die **Zentromere** stellen die Punkte des Spindelansatzes in der Mitose dar.

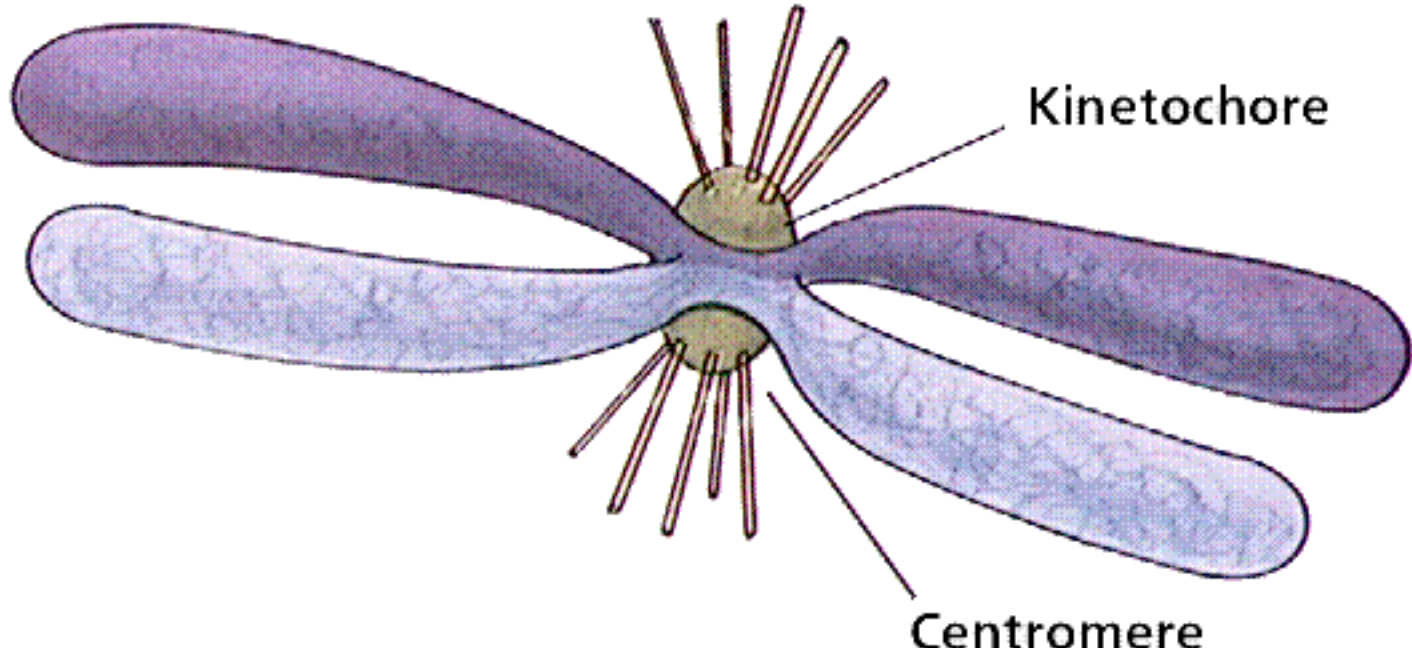
In der **Bäckerhefe** *Saccharomyces cerevisiae* ist diese Sequenz sehr kurz und zwischen den einzelnen Chromosomen hoch konserviert.

Bei höheren Eukaryoten (z.B. Säuger) ist die Zentromersequenz sehr lang und durch viele Repeats aufgebaut.

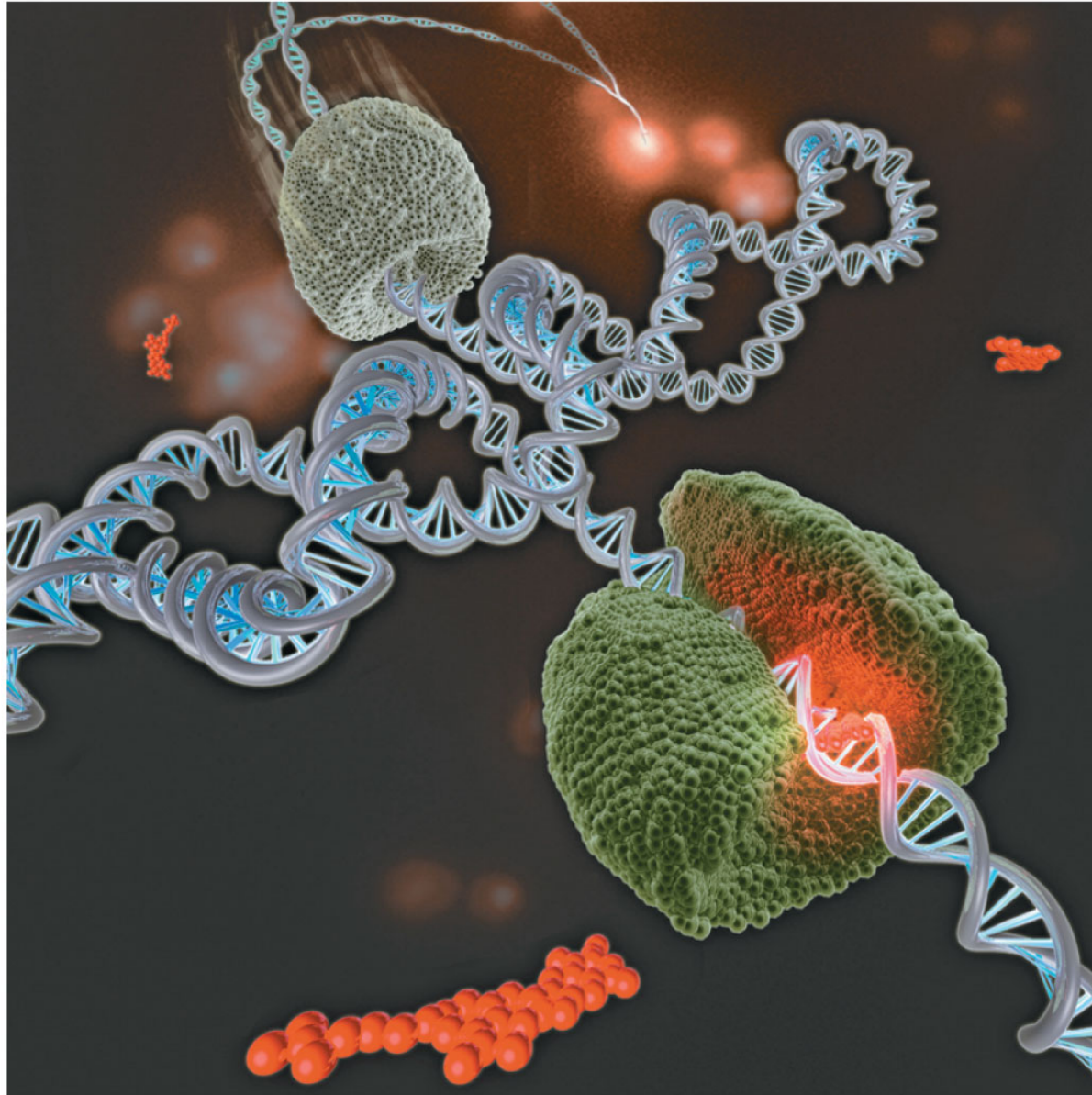
Eine typische Hefe-Zentromersequenz



© 2010 Pearson Education, Inc.



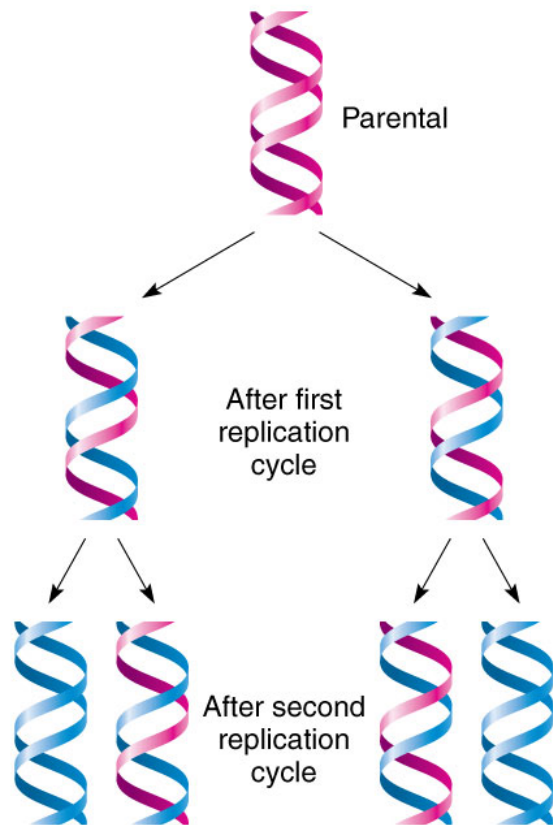
DNA Replikation



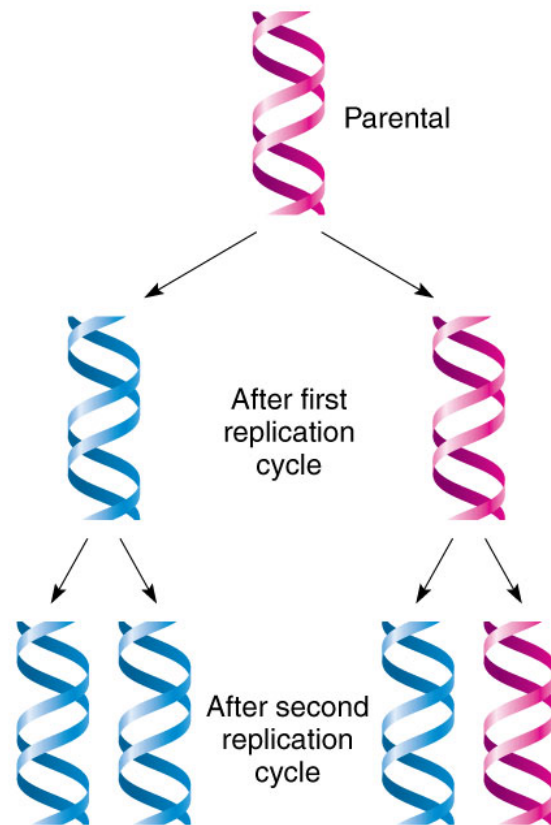
Mögliche Modelle der DNA Replikation und deren theoretische Ergebnisse im Dichtegradienten-Zentrifugations Experiment.

Welches Modell kann experimentell belegt werden?

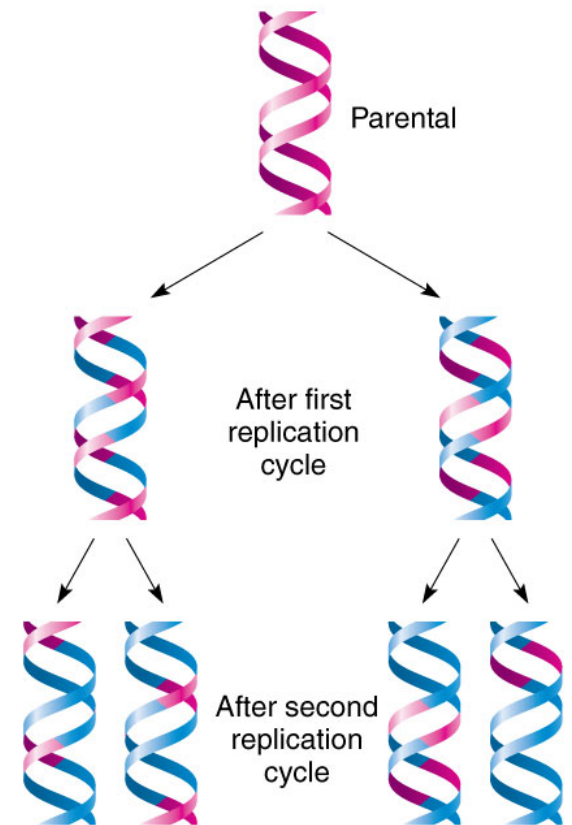
a) Semiconservative model



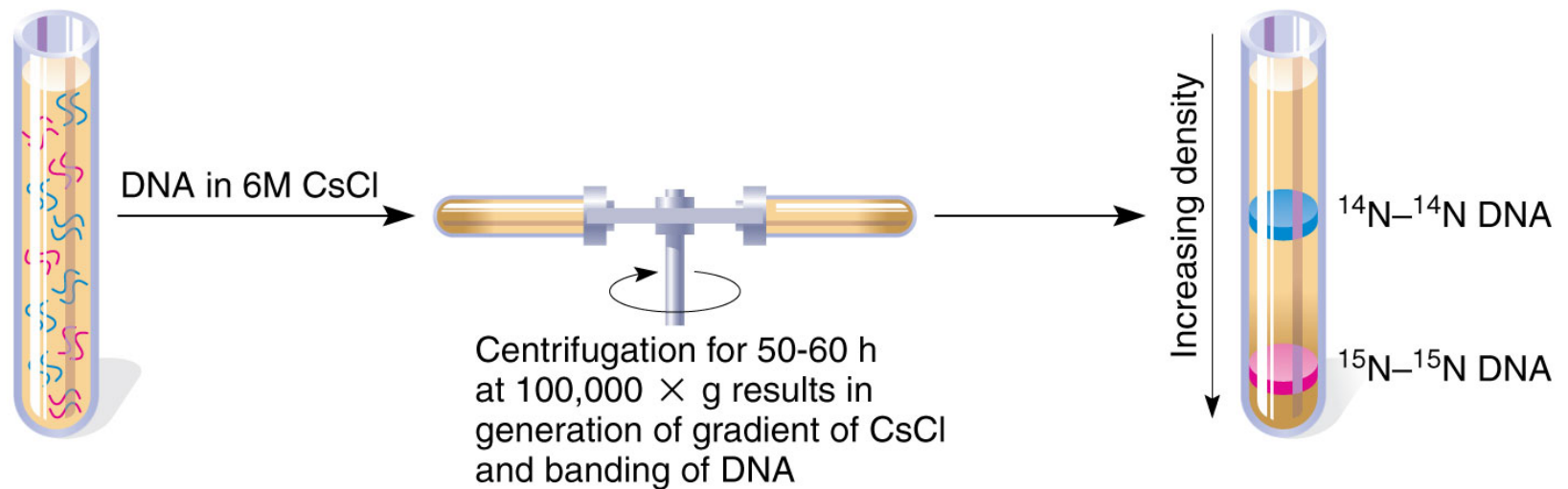
b) Conservative model



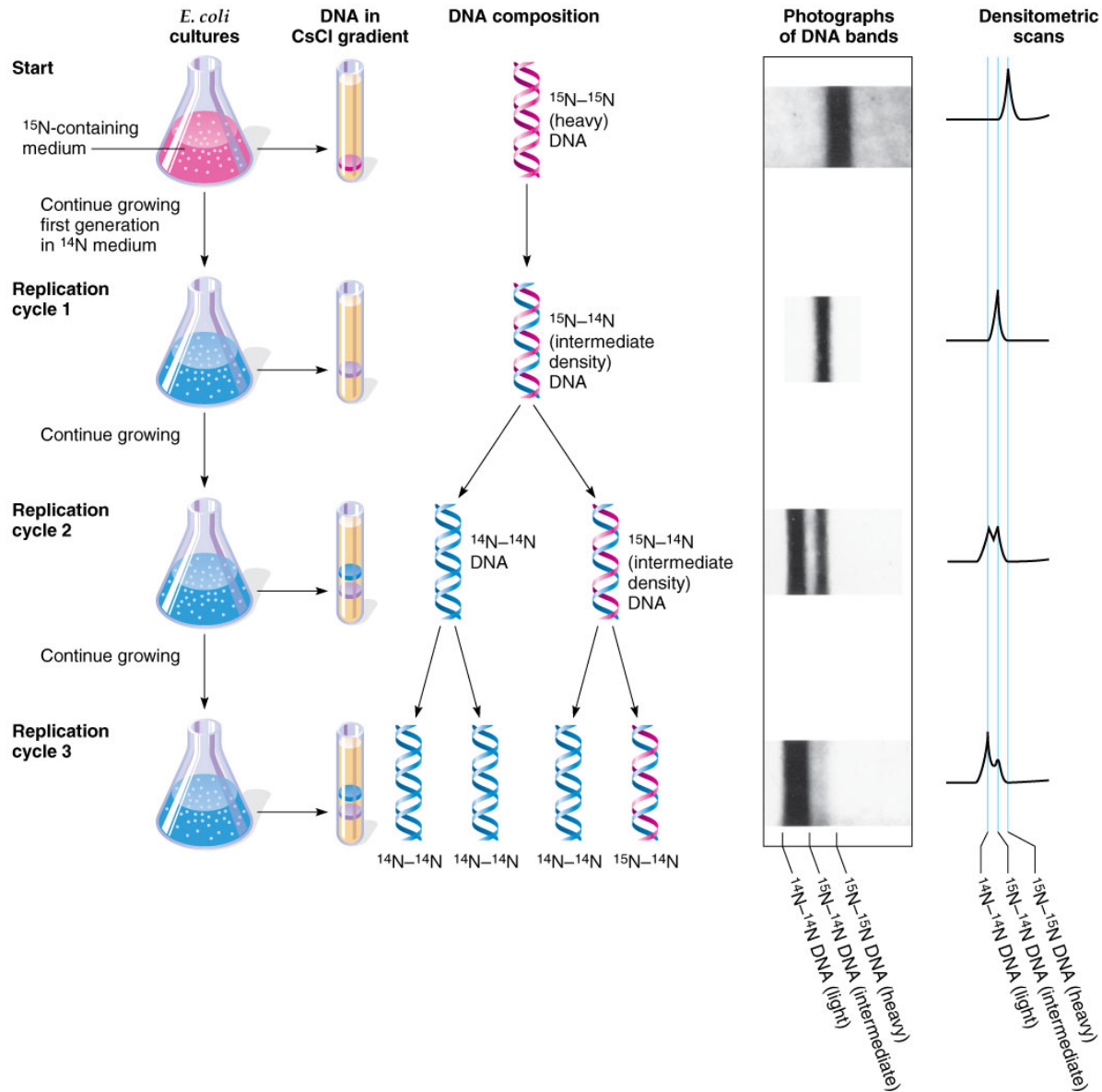
c) Dispersive model



DNA Replikation ist Semi-Konservativ: Das Meselson und Stahl Experiment

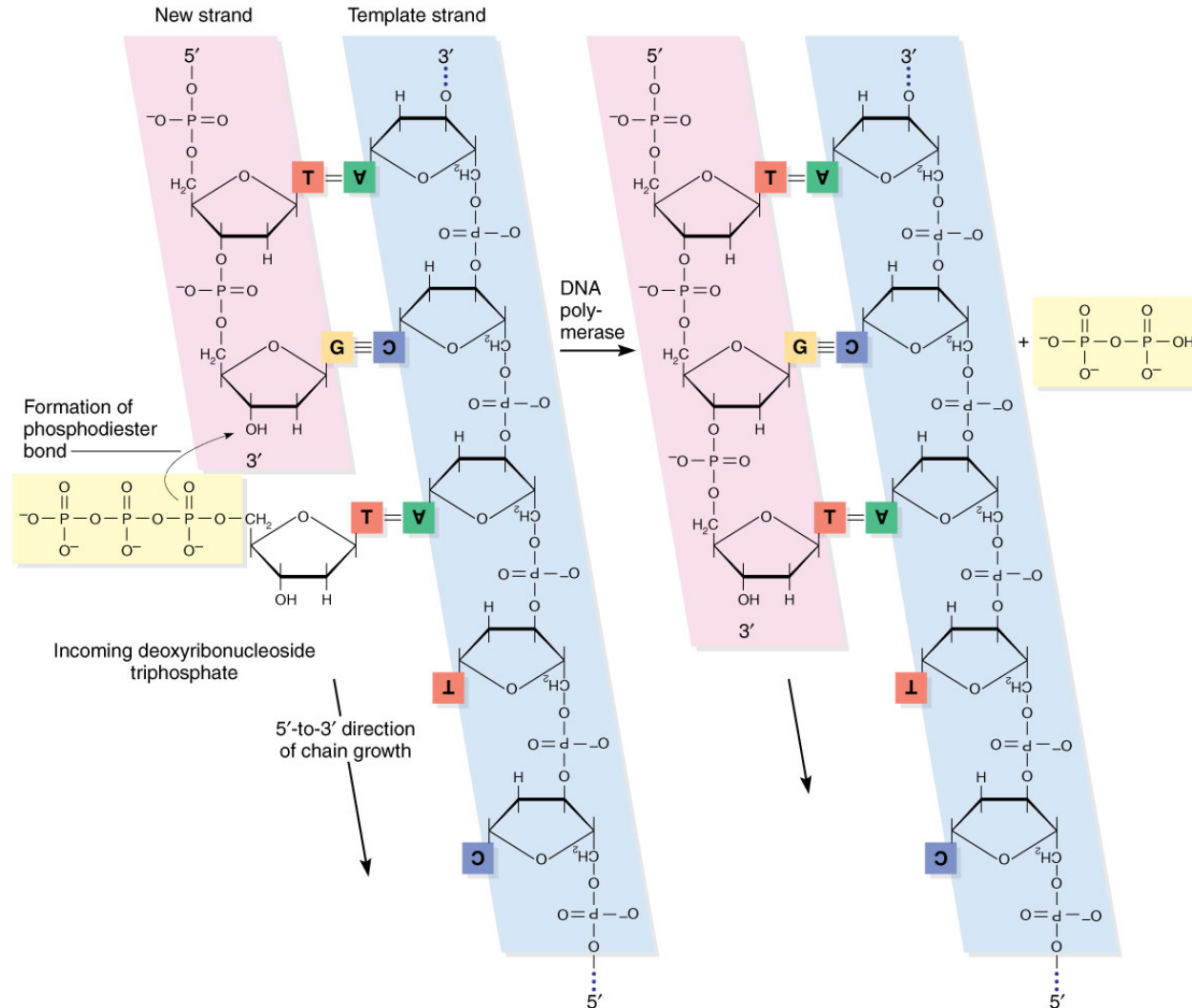


Das Meselson und Stahl Experiment 1958 belegt die Semikonservative Replikation



DNA Polymerisation erfordert Desoxynucleotidtriphosphate (Bausteine), eine DNA-Polymerase (Enzym), **ein freies 3' OH Ende** (Startpunkt) und ein Template (Vorlage)
 DNA-Replikation verläuft **IMMER** von 5' nach 3'

a) Mechanism of DNA elongation

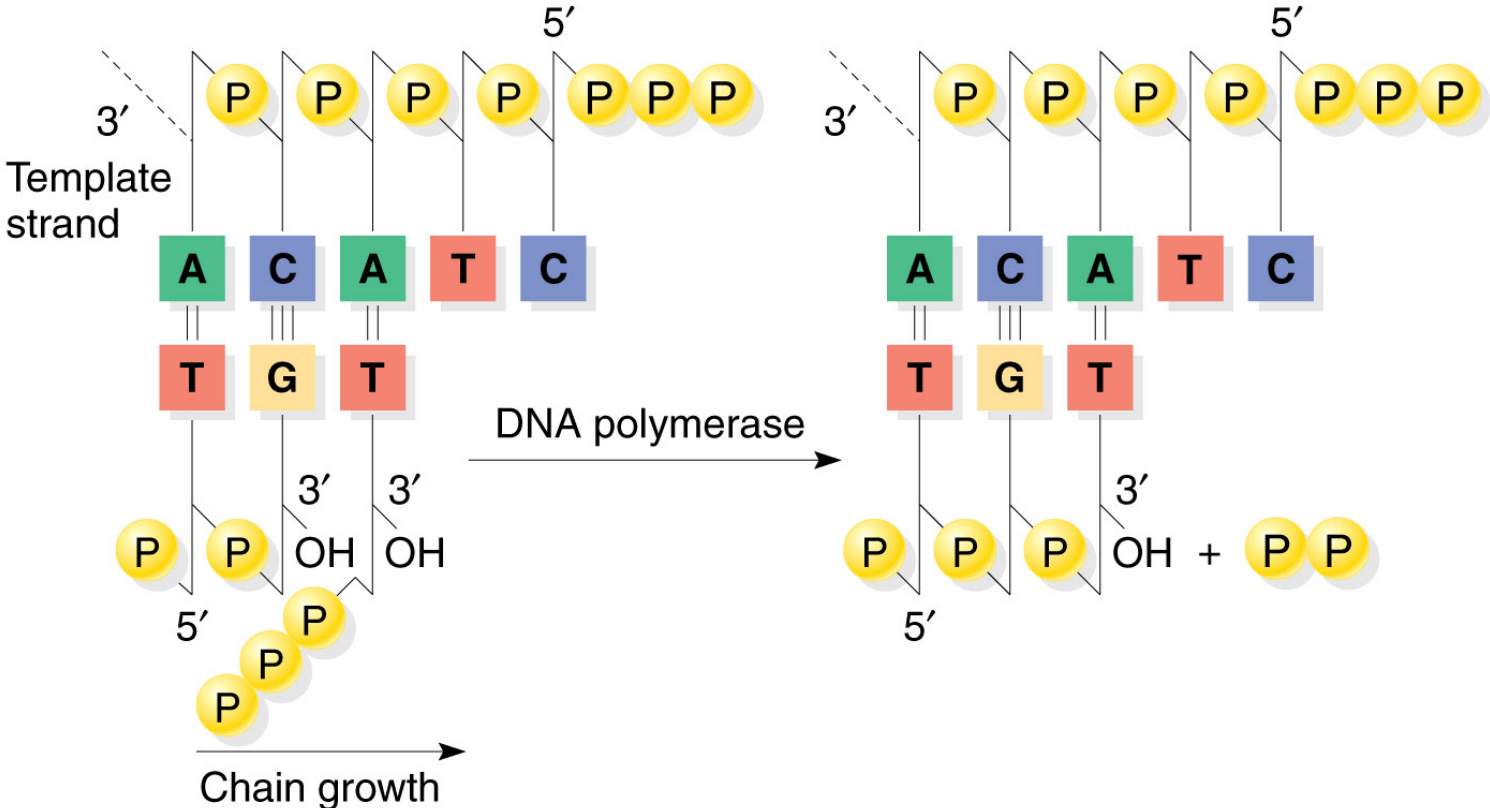


DNA Replikation ist Komplementär zur Matrize (Template), durch die Bindung der Phosphodiesterbrücke entsteht freies Pyrophosphat

Die Energie für die Neusynthese stammt aus der Hydrolyse eines dNTPs (desoxyncleotide-triphosphate) in ein dNMP (...monophosphate).

Jedes andhängte Nukleotid verfügt über ein neues 3' OH Ende, welches die weitere Synthese der DNA erlaubt. Das freie 3' OH Ende macht einen nukleophilen Angriff auf das alpha-Phosphat (mithilfe der Polymerase)

b) DNA elongation shown using a shorthand notation for DNA



DNA Replikation ist sehr schnell:

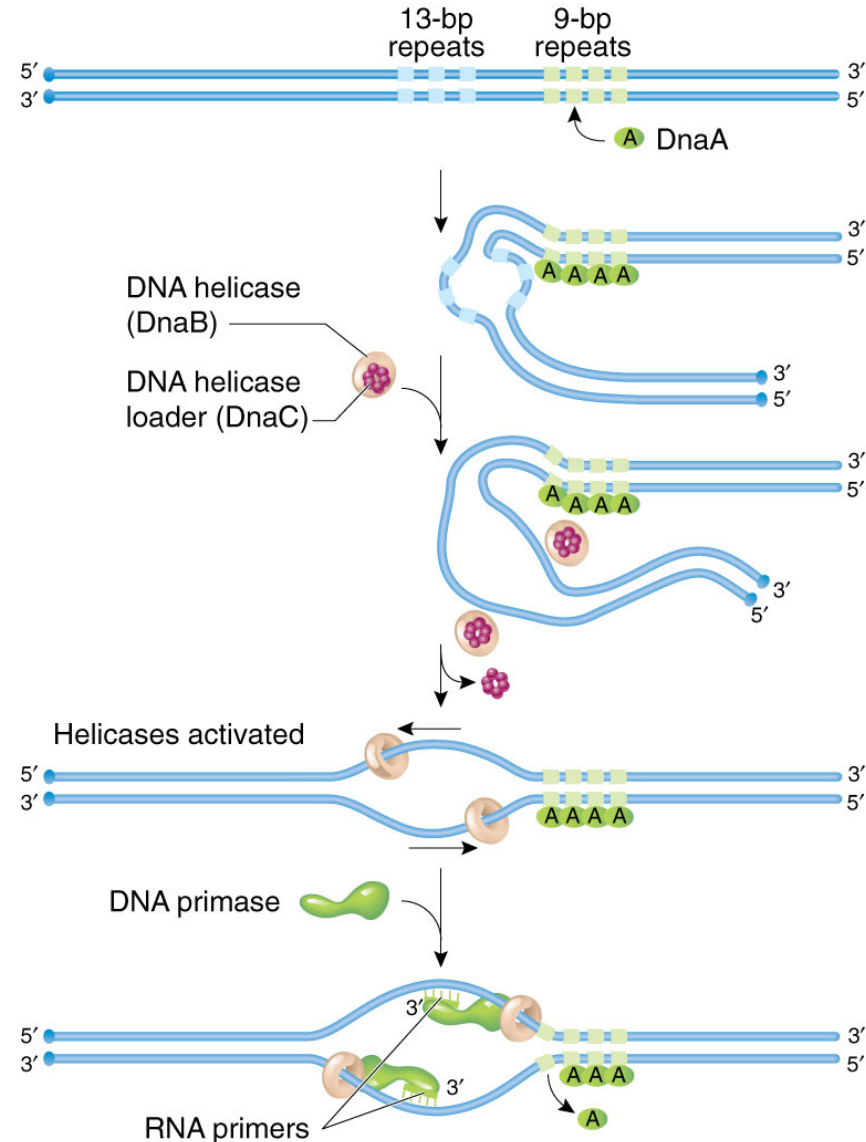
Bakterien- 850 Nukleotide pro Sekunde

Eukaryoten- 60 bis 100 nt pro Sekunde

DNA Replikation beginnt an einem **Origin of Replication**

In **Bakterien** ist dieser durch eine bestimmte Sequenz definiert.

Eine Helikase (DnaB) (entwindet DNA) wird durch ein "Ladeprotein" (DnaC) auf die DNA geladen. Die DNA wird partiell entwunden (an einer AT-reichen Sequenz). An dieser Stelle kann Replikation beginnen



Proteine und Faktoren, welche an der **DNA-Replikation** beteiligt sind:
Arthur Kornberg (Nobelpreis 1959) führte *in vitro* DNA Synthese Versuche durch.

Er konnte zeigen, dass für die DNA Synthese folgende Faktoren benötigt werden:

1. DNA als Template (Vorlage)
2. DNA als Primer (freies 3' OH) (in vivo ist dies meist RNA)
3. dNTP (desoxynukleotid Triphosphate)
4. DNA-Polymerase 1
5. Magnesium

Table 3.1 Functions of Some of the Genes and DNA Sequences Involved in DNA Replication in *E. coli*

Gene Product or Function	Gene
DNA polymerase I	<i>polA</i>
DNA polymerase III	<i>dnaE, dnaQ, dnaX, dnaN, dnaD, holA</i> → E
Initiator protein, binds to <i>oriC</i>	<i>dnaA</i>
IHF protein (DNA binding protein), binds to <i>oriC</i>	<i>himA</i>
FIS protein (DNA binding protein); binds to <i>oriC</i>	<i>fis</i>
Helicase and activator of primase	<i>dnaB</i>
Complexes with <i>dnaB</i> protein and delivers it to DNA	<i>dnaC</i>
Primase; makes RNA primer for extension by DNA polymerase III	<i>dnaG</i>
Single-stranded binding (SSB) proteins; bind to unwound single-stranded arms of replication forks	<i>ssb</i>
DNA ligase; seals single-stranded gaps	<i>lig</i>
Gyrase (type II topoisomerase); replication swivel to avoid tangling of DNA as replication fork advances	<i>gyrA, gyrB</i>
Origin of chromosomal replication	<i>oriC</i>
Terminus of chromosomal replication	<i>ter</i>
TBP (<i>ter</i> binding protein), stalls replication forks	<i>tus</i>

DNA Polymerasen und deren mögliche Aktivitäten:

- **5'-3' Polymerase** Aktivität (zur Neusynthese von DNA)
- **3'-5' Exonuklease** Aktivität (Entfernt gerade eingebaute Nukleotide vom 3' Ende wenn diese nicht korrekt zB falsche Basenpaarung eingebaut wurden)
"Proofreading Aktivität"
- **5'-3' Exonuklease** Aktivität (Entfernt DNA oder RNA Stränge von deren 5' Ende)

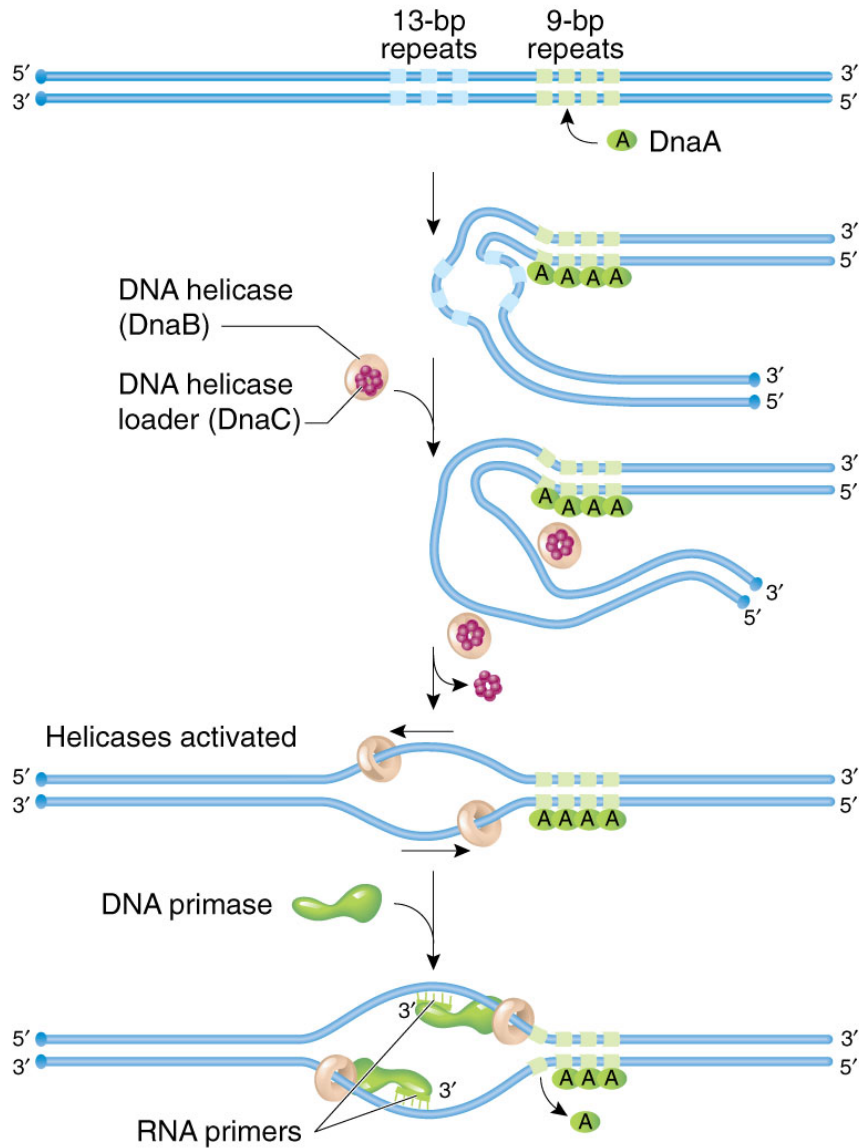
Bakterielle DNA Pol I hat alle 3 Aktivitäten

Bakterielle DNA Pol III hat nur 5'-3' Polymerase und 3'-5' Exonuklease Aktivität, jedoch keine 5'-3' Exonuklease Aktivität

Da DNA Polymerase keine *de novo* DNA Synthese beginnen können bedarf es immer einer **Primase**, welche ein kleines **RNA Fragment** zur Verfügung stellt (und somit ein 3' OH Ende)

Das 3' OH Ende des RNA Primers wird durch DNA Pol III verlängert.

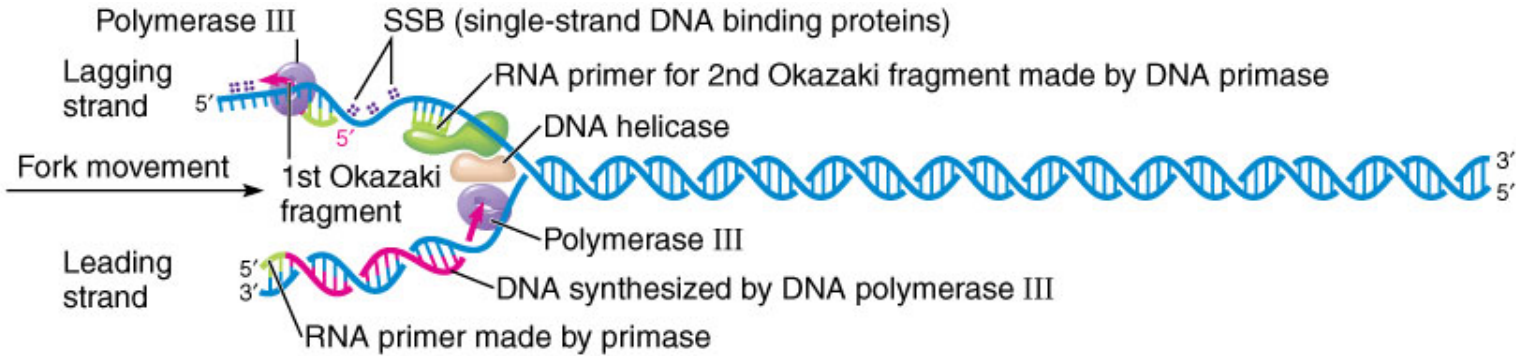
Einer der beiden Stränge kann **kontinuierlich** verlängert werden (**leading strand**). Der andere Strang wird **diskontinuierlich** verlängert (**lagging strand**): Hier müssen ständig neue RNA Primer und kurze DNA Fragmente (Okazaki Fragmente) erzeugt werden, welche anschliessend miteinander verknüpft werden (Ligiert).



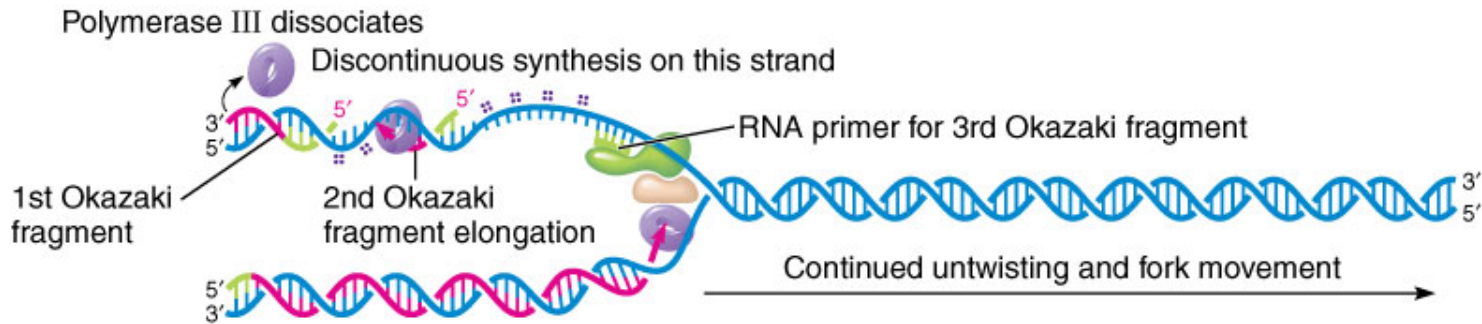
RNA-Primer wird an den Start gesetzt um ein 3' OH zur Verfügung zu stellen

Leading (kontinuierlich) and lagging (diskontinuierlich) strand DNA synthesis

1 Initiation; RNA primer made by DNA primase starts replication of lagging strand (synthesis of 1st Okazaki fragment)



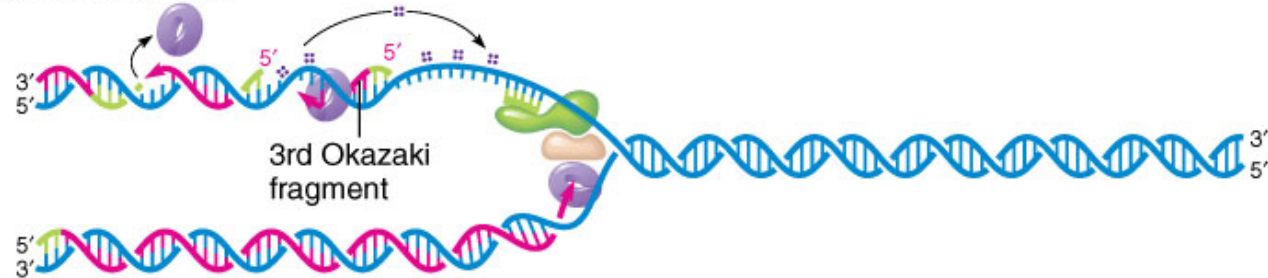
2 Further untwisting and elongation of new DNA strands; 2nd Okazaki fragment elongated



Okazaki Fragmente werden durch Ligation verknüpft.

- 3** Process continues; 2nd Okazaki fragment finished, 3rd being synthesized; DNA primase beginning 4th fragment

Polymerase III dissociates

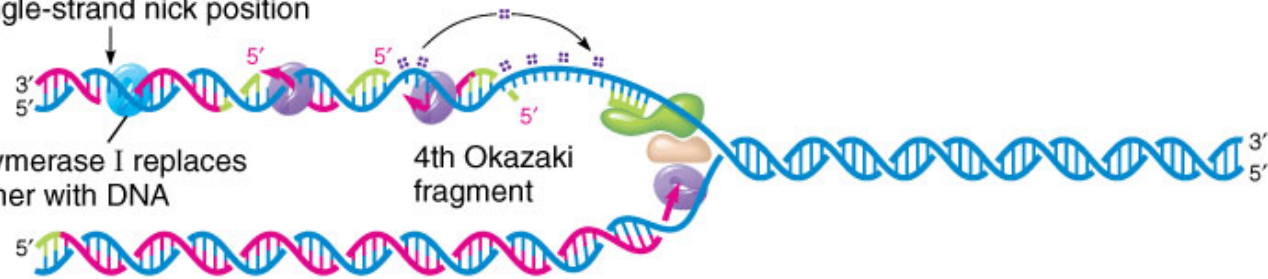


- 4** Primer removed by DNA polymerase I; when completed, single-strand nick remains (red strand)

Single-strand nick position

DNA polymerase I replaces RNA primer with DNA

4th Okazaki fragment



- 5** Joining of adjacent DNA fragments by DNA ligase

RNA primer being replaced with DNA by polymerase I

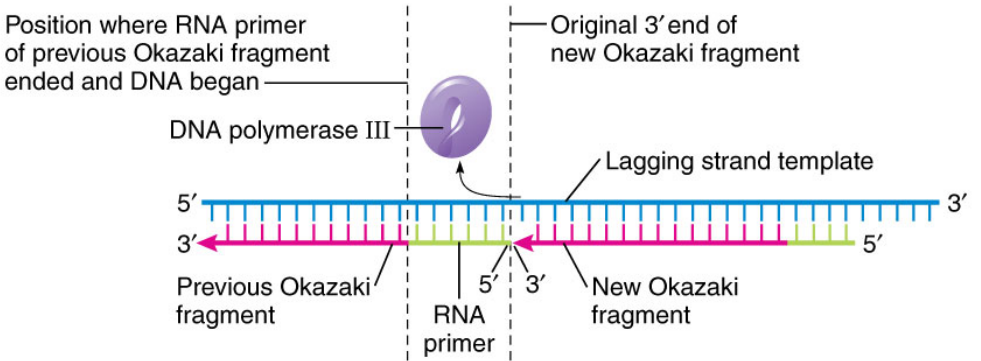
Gap sealed by DNA ligase

5th Okazaki fragment

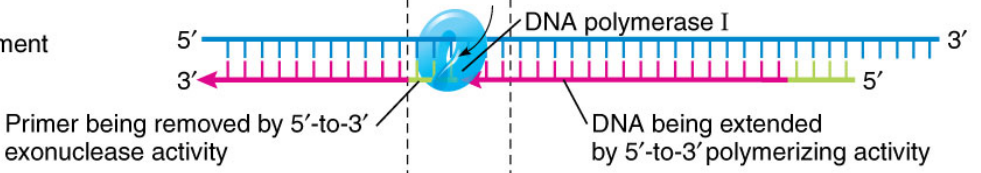


Um den RNA-Primer der (diskontinuierlichen) DNA Synthese wieder zu entfernen, wird DNA Pol III durch DNA Pol I ersetzt (welche 5'-3' Exonuclease Aktivität besitzt)

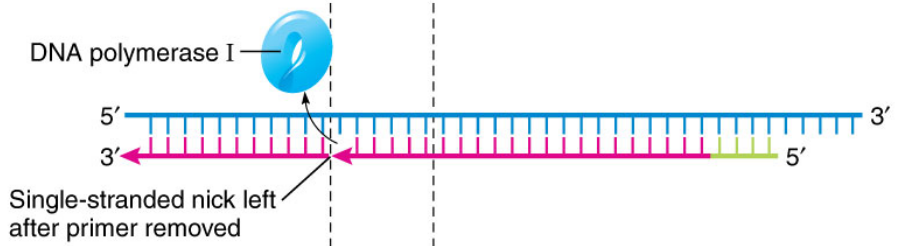
1 DNA polymerase III leaves. 3' end of new Okazaki fragment is next to 5' end of previous Okazaki fragment.



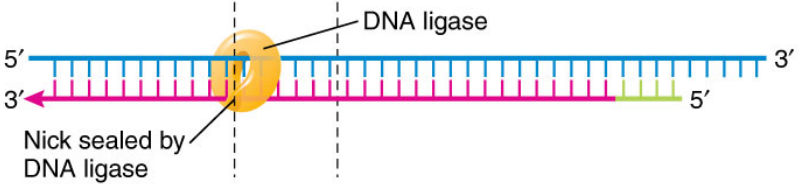
2 DNA polymerase I binds and simultaneously removes RNA primer on previous Okazaki fragment and synthesizes DNA to replace it.



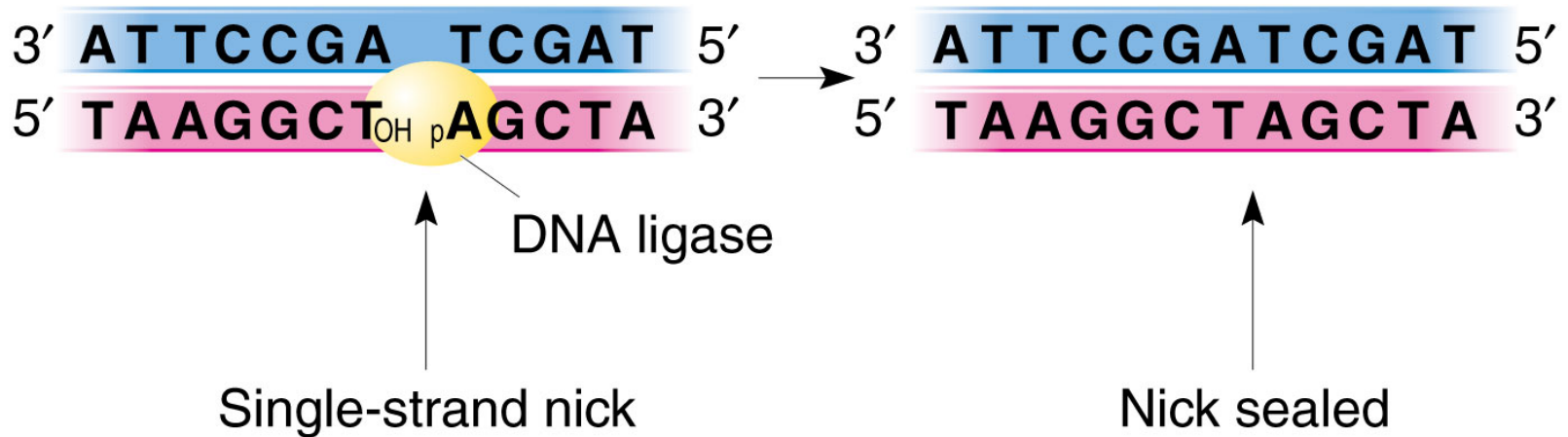
3 When RNA primer is removed completely, DNA polymerase I leaves. A single-stranded nick remains between the two fragments.



4 DNA ligase seals the nick and then leaves.

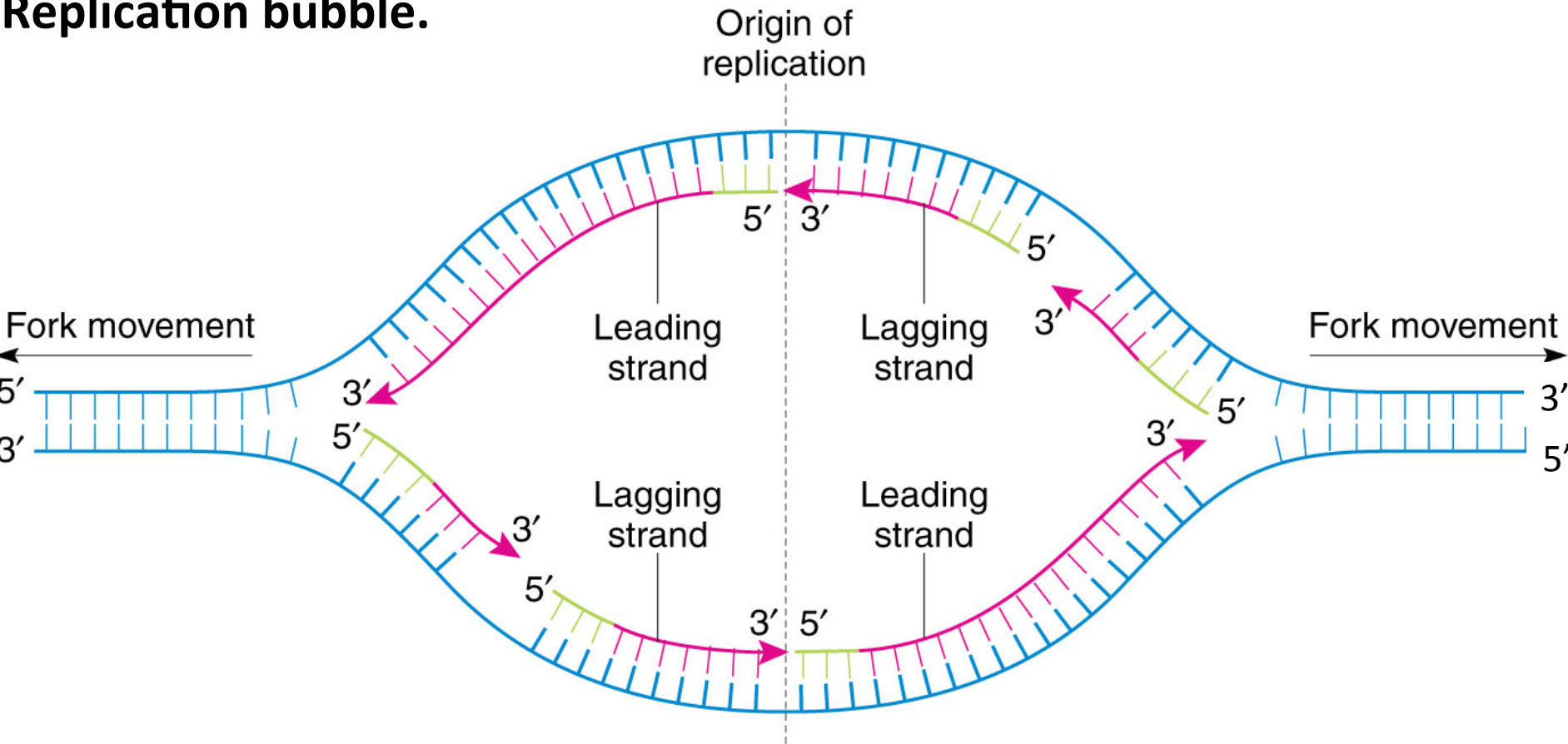


Ligase schliesst den verbleibenden "nick"

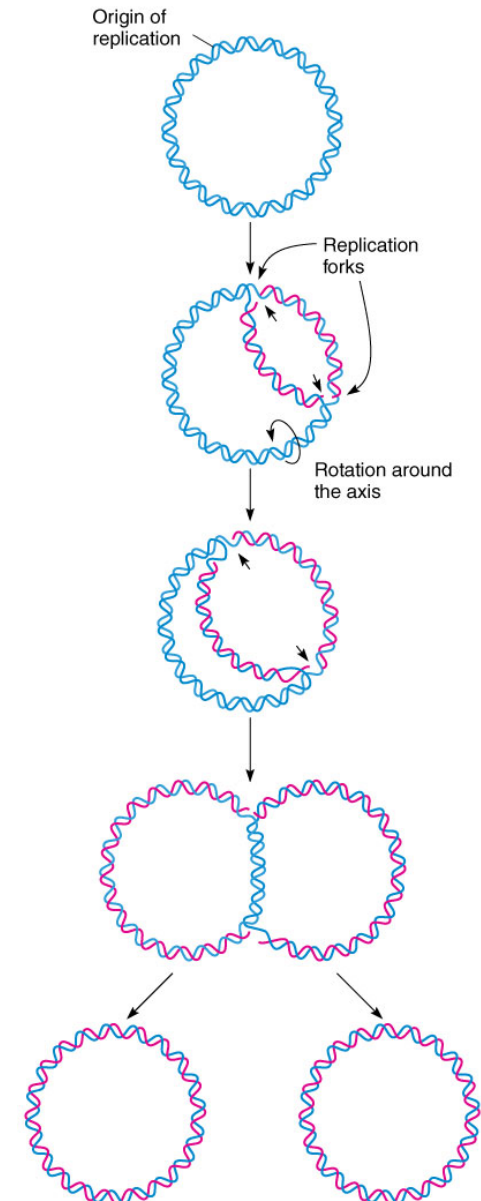


Meist (aber nicht immer) ist DNA Synthese bidirektional und bildet ein "Auge". An jeder Replikationsgabel findet sich daher ein "leading" und ein "lagging" strand: "Semidiskontinuierliche DNA Synthese".

Replication bubble.



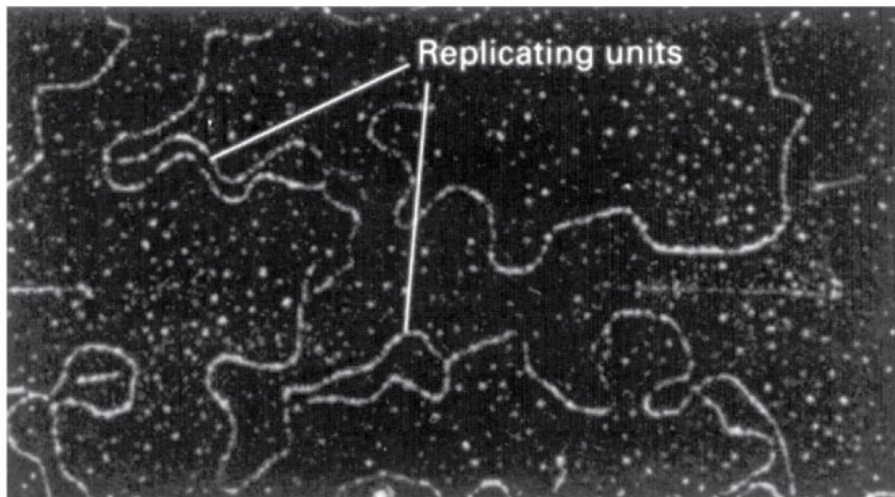
Replikation bakterieller Plasmide ist bidirektional (auch bakterieller chromosomaler DNA)



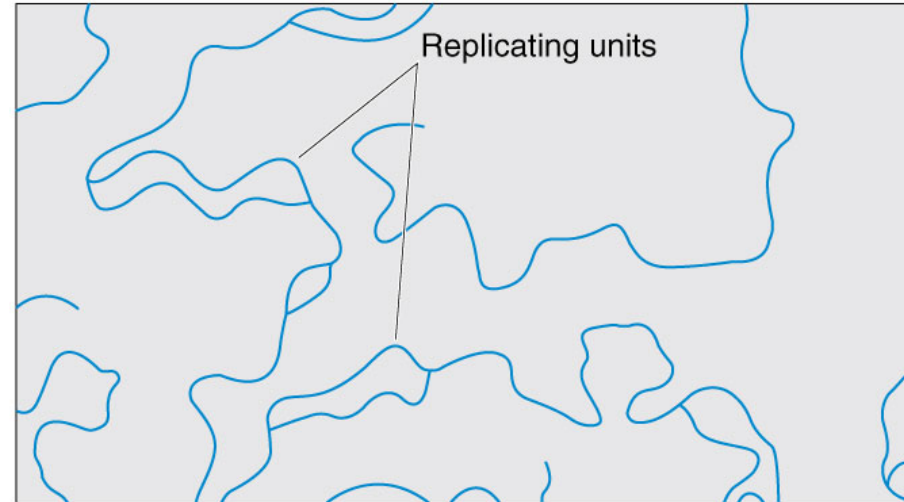
Eukaryoten besitzen Replikons (replizierende Einheiten) welche durch **ARS (autonomous replicating Sequences)** definiert sind.

ARSs werden durch **ORCs (origin recognition complexes - Proteinkomplexe)** erkannt.

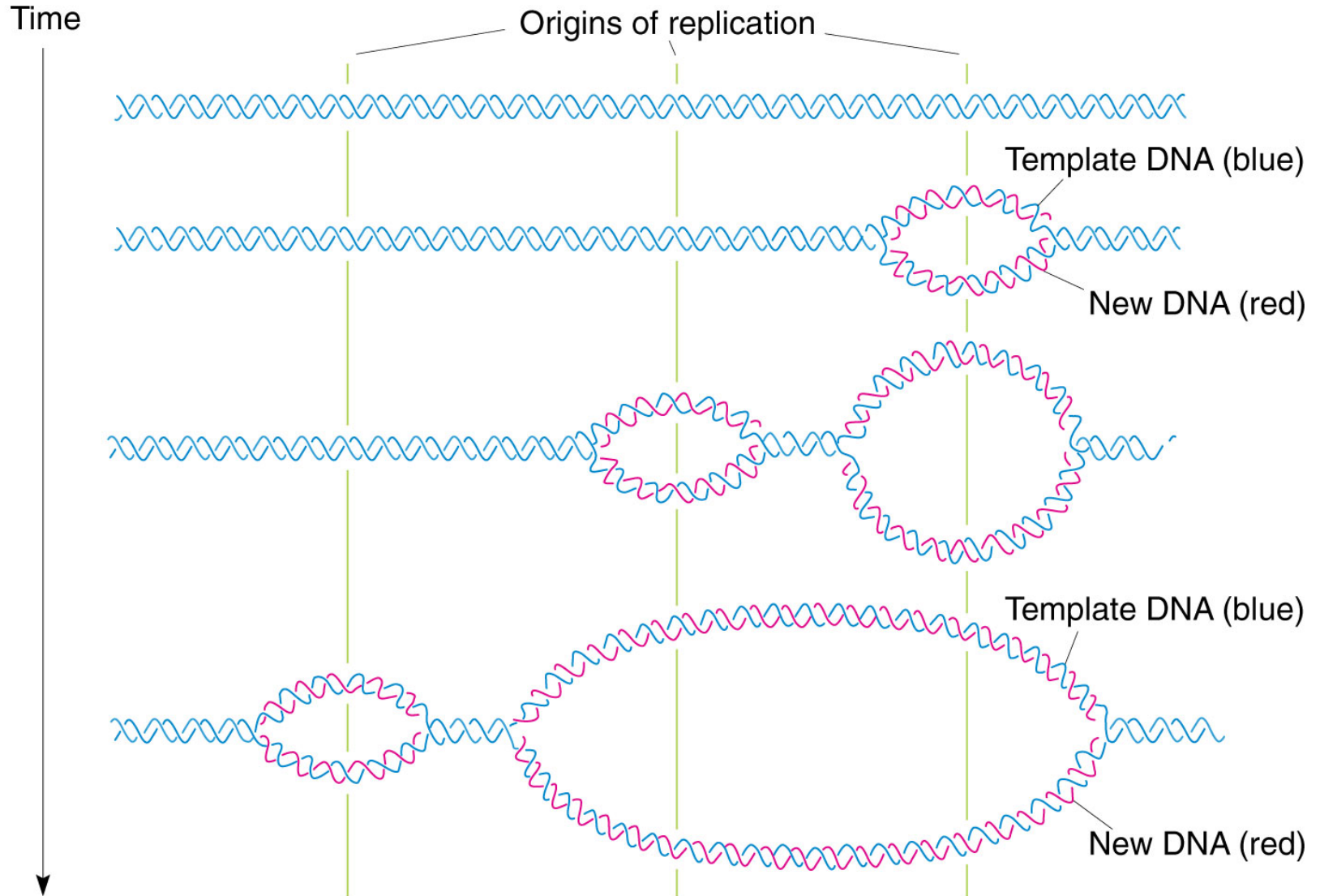
a) Electron micrograph of replicons



b) Schematic drawing of replicons



Jedes eukaryotische Chromosom besitzt mehrere ARSs.
Deren Replikation muss genau reguliert sein.



GENEXPRESSION

Was ist die Funktion von Genen: Gene kodieren (in der Regel) für Proteine

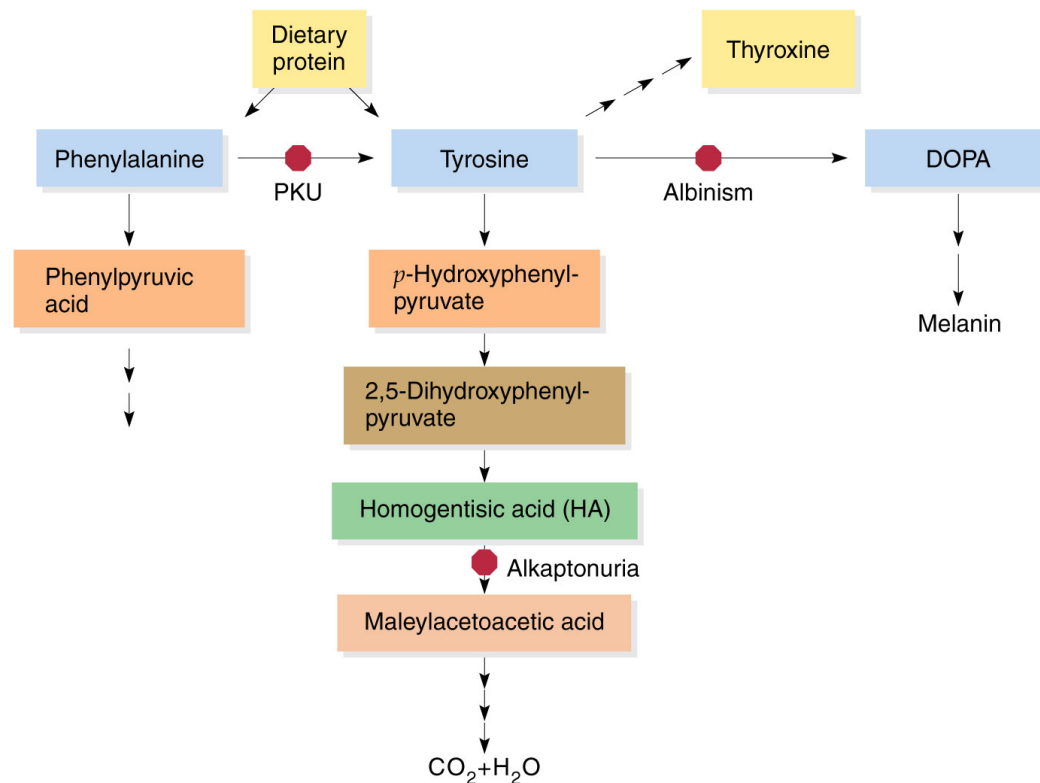
Der Arzt Archibald Garrod studierte 1902 Alkaptononurie Patienten

Er zeigte, dass Alkaptonurie eine rezessive Erbkrankheit darstellt.

Garrod zeigte, dass Alkaptonurie Patienten Homogentisinsäure ausscheiden.

Er postulierte daher, dass Alkaptonurie Patienten Homogentisinsäure nicht metabolisch abbauen können.

Er schloss, dass eine Blockade in einem metabolischen Prozess zur Akkumulation eines Stoffwechselintermediats führt.



OMIM= Online Mendelian Inheritance in Man

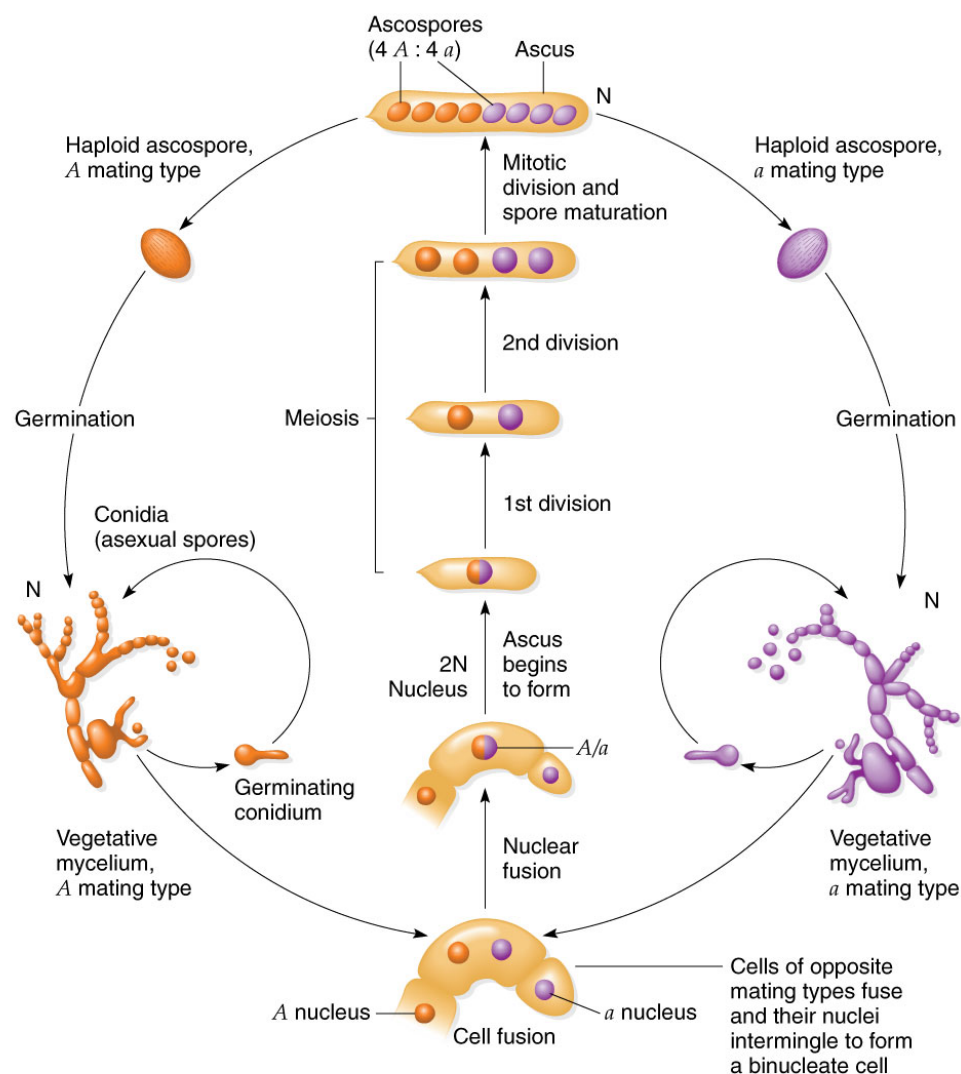
Table 4.2 Selected Human Genetic Disorders with Demonstrated Enzyme Deficiencies

Genetic Defect	Locus	Enzyme Deficiency	OMIM Entry
Alkaptonuria	3q21–q23	Homogentisic acid oxidase	203500
Cystic fibrosis	7q31.2	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	602421
Cataract	17q24	Galactokinase	230200
Citrullinemia ^a	9q34	Argininosuccinate synthetase	215700
Disaccharide intolerance I	3q25–q26	Invertase	222900
Fructose intolerance	9q22.3	Fructose-1-phosphate aldolase	229600
Galactosemia ^a	9p13	Galactose-1-phosphate uridylyl transferase	230400
Gaucher disease ^a	1q21	Glucocerebrosidase	230800
G6PD deficiency (favism) ^a	Xq28	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	305900
Glycogen storage disease I	17q21	Glucose-6-phosphatase	232200
Glycogen storage disease II ^a	17q25.2–q25.3	α -1,4-Glucosidase	232300
Glycogen storage disease III ^a	1p21	Amylo-1, β -glucosidase	232400
Glycogen storage disease IV ^a	3p12	Glycogen branching enzyme	232500
Hemolytic anemia ^a	3p21.1, 8p21.1, 20q11.2, 1q21	Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione synthetase, hexokinase, or pyruvate kinase	138320, 138300, 231900, 266200
Intestinal lactase deficiency (adult)		Lactase	223000
Ketoacidosis ^a	5p13	Succinyl CoA:3-Ketoacid CoA-transferase	245050
Lesch–Nyhan syndrome ^a	Xq26–q27.2	Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase	308000
Maple sugar urine disease, type IA ^a	19q13.1–q13.2	Keto acid decarboxylase	248600
Muscular dystrophy, Duchenne and Becker types	Xp21.2	Dystrophin absent or defective; serum acetylcholinesterase, acetylcholine transferase, or creatine phosphokinase elevated	310200
Phenylketonuria ^a	12q24.1	Phenylalanine hydroxylase	261600
Porphyria, congenital erythropoietic ^a	10q25.2–q26.3	Uroporphyrinogen III synthase	263700
Pulmonary emphysema	14q32.1	α -1-Antitrypsin	107400
Ricketts, vitamin D-dependent		25-Hydroxycholecalciferol 1-hydroxylase	277420
Tay–Sachs disease ^a	15q23–q24	Hexosaminidase A	272800
Tyrosinemia, type III	12q24–qter	<i>p</i> -Hydroxyphenylpyruvate oxidase	276710

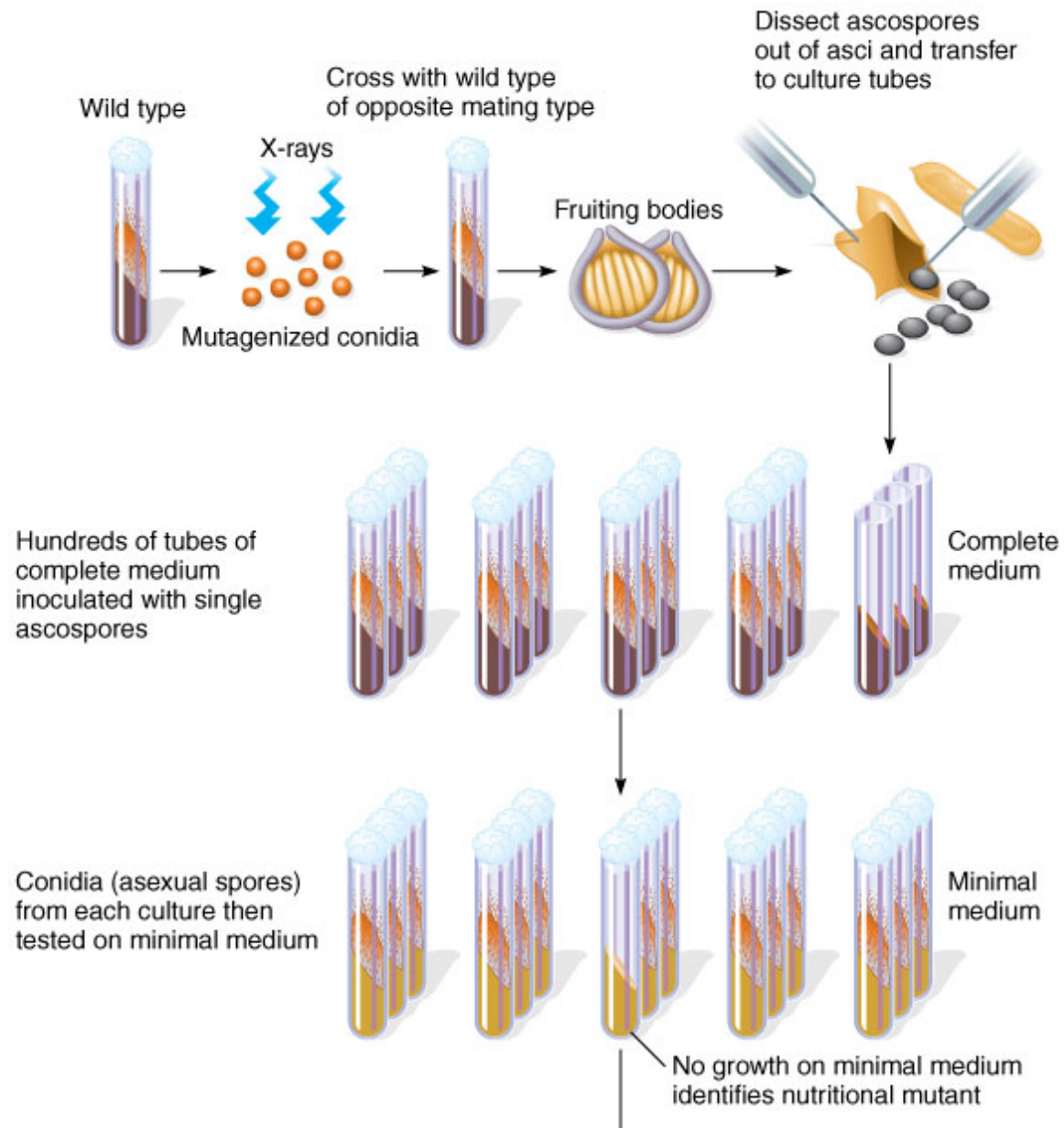
^aPrenatal diagnosis possible.

Verwendung von Neurospora zur Isolation von Mutanten, welche in bestimmten Stoffwechselwegen defekt sind.

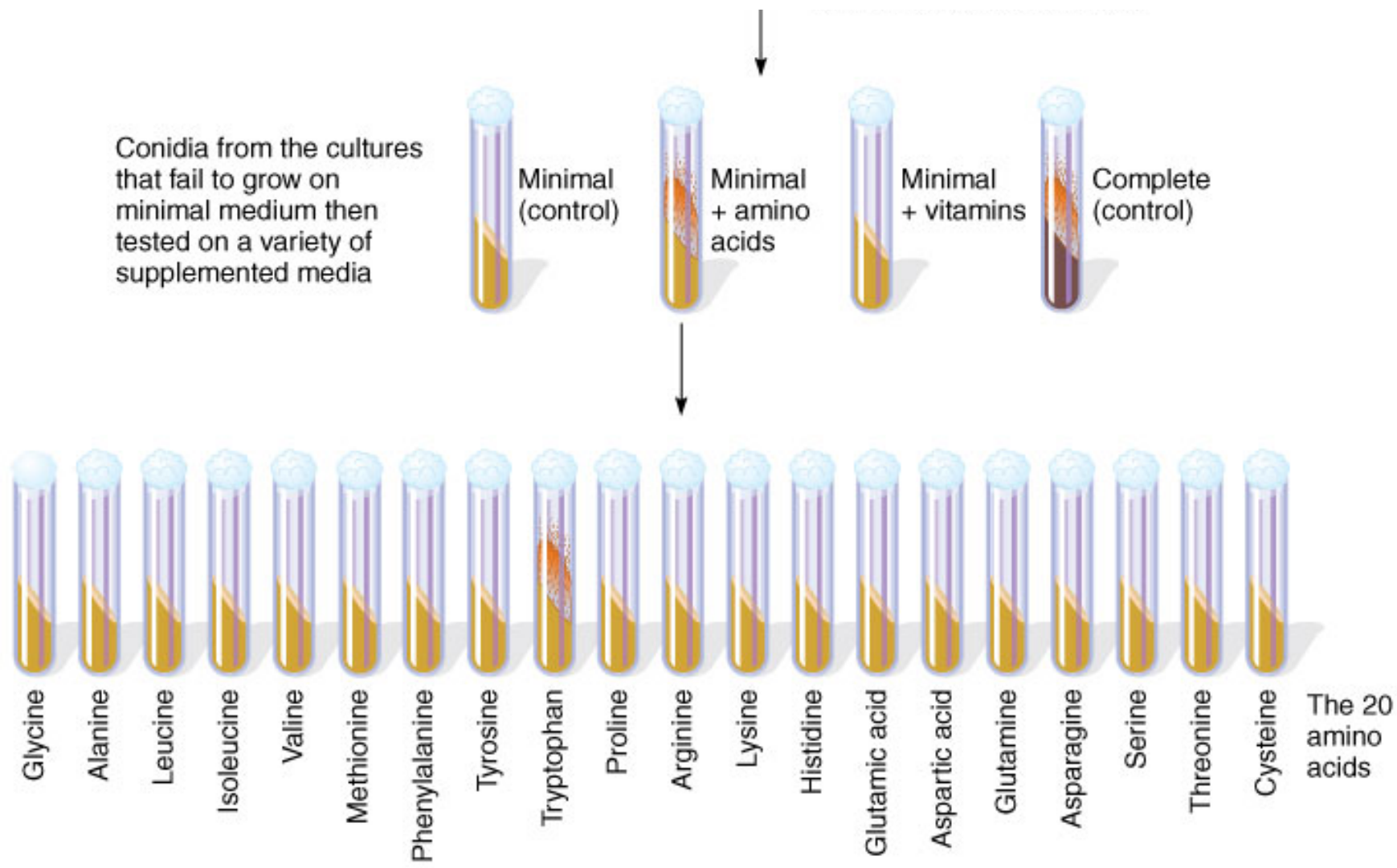
Aminosäure Biosynthese Auxotroph (auf zugegebene Aminosäuren angewiesen).



Beadle and Tatum (1942) isolierten Auxotrophie Mutanten aus *N. crassa*



Beadle and Tatum (1942) isolierten Auxotrophie Mutanten aus *N. crassa*



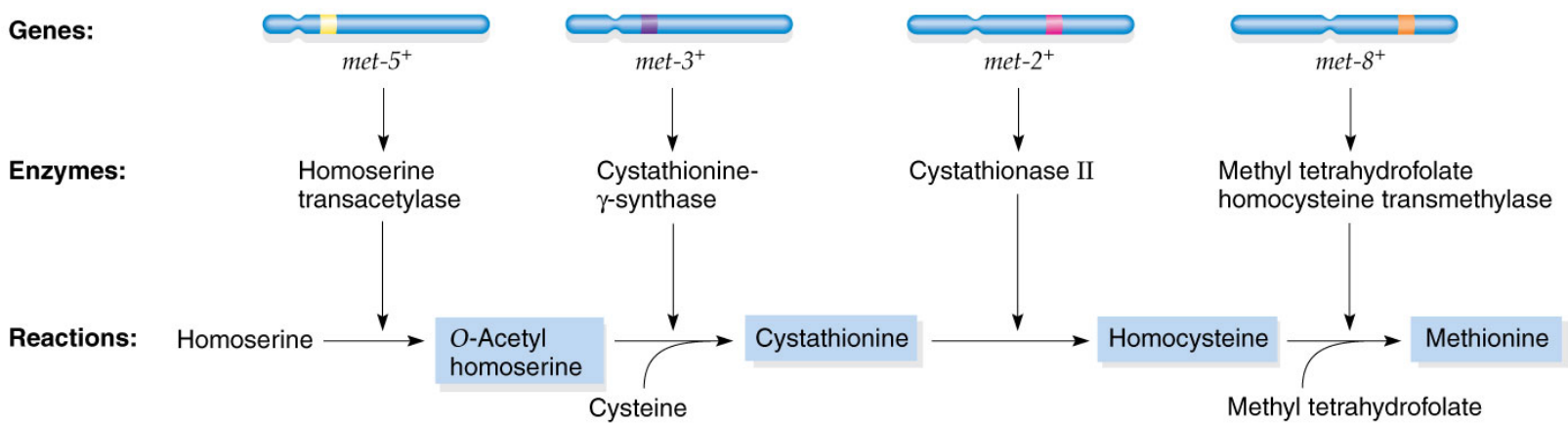
Durch Analyse mehrerer met- Auxotrophie Mutanten gelang es, biochemische Pathways zu erstellen und die daran beteiligten Enzyme zu bestimmen.

Dies führte zur **1 Gen- 1 Enzym Hypothese**. Da bald klar wurde, dass manche Enzyme aus mehreren Proteinen bestehen, wurde die Hypothese als **1 Gen- 1 Polypeptid Hypothese** neu formuliert.

Table 4.1 Growth Responses of Methionine Auxotrophs

Mutant Strains	Growth Response on Minimal Medium +				
	Nothing	O-Acetyl Homoserine	Cystathionine	Homocysteine	Methionine
Wild type	+	+	+	+	+
<i>met-5</i>	-	+	+	+	+
<i>met-3</i>	-	-	+	+	+
<i>met-2</i>	-	-	-	+	+
<i>met-8</i>	-	-	-	-	+

© 2010 Pearson Education, Inc.



© 2010 Pearson Education, Inc.

One Gene – one RNA model

Gene (Abschnitte der DNA) werden in RNA transkribiert (abgeschrieben)

Oftmals hat die RNA selbst bereits eine Funktion, und wird nicht in ein Protein umgeschrieben

Fehlen dieser RNAs kann auch zur Ausprägung von Phänotypen führen

Viele dieser nicht-codierenden RNAs sind essentiell

Beispiele nicht kodierender RNAs:

Ribosomale RNA (rRNA): bildet den Grossteil des Ribosoms (Translation)

Small nuclear RNA (snRNA): bildet den katalytischen Teil des spliceosoms (RNA splicing)

Small interfering RNA (siRNA): essentieller Teil der RNA gesteuerten Interferenz (RNAi)

Small nucleolar RNAs (snoRNAs): steuern Modifikationen in der rRNA

Micro RNAs (miRNAs): regulieren die Translation und Stabilität von RNAs

Short heterochromatic RNAs (shRNA): Kontrollieren die Stilllegung von chromosomalen Regionen