D-CHAB & D-BIOL

Schriftliche Prüfung / Written Exam

Nucleic Acids and Carbohydrates

Januar / January 2013

Name: .....

Vorname/First Name: .....

Department: .....

Lösen Sie nur drei der vier Aufgaben /
Solve only three of the four problems!

Zeit / Time: 40 min

Unleserliche Texte und unklare Formulierungen werden nicht bewertet /
Unreadable and unclear statements will not be graded!

Aufgabe 1 (30 Punkte)

Um eine Erbkrankheit zu diagnostizieren, kann man das Genom eines Patienten mit dem einer gesunden Kontrolle mit Hilfe von "Gene Chips" vergleichen.

(a) Welche Typen von Nukleinsäuren sind für solche Mikroarray-Studien geeignet? Diskutieren Sie 2 Vor- und 2 Nachteile für jeden genannten Typus. (10 Punkte)

(b) Beschreiben Sie ein "Gene Chip" Experiment im Detail. (5 Punkte)

Anstelle der "Gene Chip" Analyse könnte auch eine Genomsequenzierung herangezogen werden, um die Ursache einer Krankheit zu finden.

(c) Warum könnten Sequenzierungsfehler hier ein Problem darstellen? (2 Punkte)

(d) Woher könnten diese Fehler stammen (nennen Sie 3 unabhängige Möglichkeiten)? (6 Punkte)

(e) Schlagen Sie 3 verschiedene Strategien vor, um dieses Problem anzugehen. Wie kann Ihr Wissen über die DNA Struktur hierbei helfen? (7 Punkte)

Problem 1 (30 Points)

To diagnose a hereditary disease, the genomes from a patient and a healthy control can be compared using "gene chips".

(a) Which types of nucleic acids can be used for such microarray experiments? Discuss 2 advantages and 2 disadvantages for each type. (10 Points)

(b) Describe one gene chip experiment in detail. (5 Points)

Instead of a gene chip analysis, one could resort to genome sequencing to find the cause of a disease.

(c) Why might sequencing errors be a problem here? (2 Points)

(d) How might they originate (give 3 independent possibilities)? (6 Points)

(e) Suggest 3 different strategies to address this problem. Can your knowledge of DNA structure help? (7 Points)

Aufgabe 2 (30 Punkte)

(a) Enediyne, wie die Verbindung **A** im Schema unten, bewirken eine radikalische DNA Spaltung. Die Konjugation von **A** mit **B** ermöglicht eine Sequenz-spezifische Spaltung bei TTAA, während die Konjugation mit **C** die Spaltung an verschiedenen Purin-reichen Stellen zur Folge hat. Begründen Sie den Spezifitätsunterschied und geben Sie an, ob Sie diesen Trend für Doppel- oder für Einzelstrang DNA erwarten. *(Bitte antworten Sie in nicht mehr als 4 Sätzen.)* (10 Punkte)

(b) Das biologisch relevante reaktive Intermediat **D** bildet ein DNA Addukt durch die Alkylierung an Position 7 von Guanin. Zeichnen Sie die komplette chemische Struktur des resultierenden DNA Addukts innerhalb der DNA Sequenz 5'-AGC-3'. (5 Punkte)

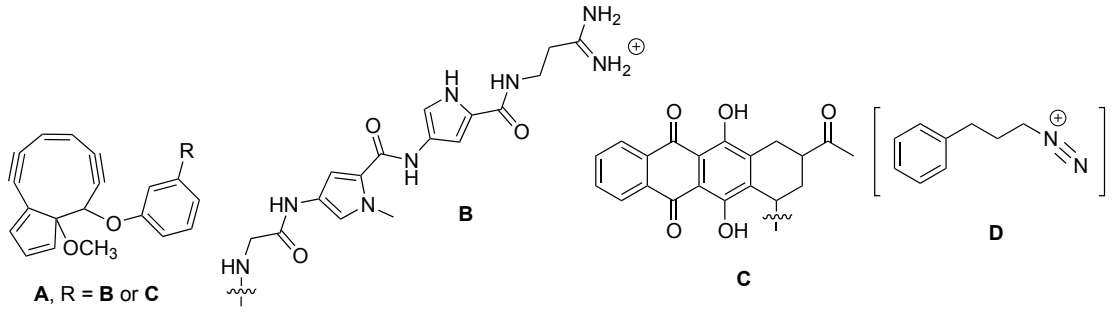
(c) Das DNA Addukt in (b) führt zu G-nach-T Transitionen. Zeigen Sie mit einer Reihe von Skizzen, wie diese Mutationen entstehen, und bezeichnen Sie möglicherweise beteiligte Enzyme *(verwenden Sie für diese Teilaufgabe die passenden Abkürzungen für die DNA Basen anstelle der chemischen Strukturen)*. (15 Punkte)

Problem 2 (30 Points)

(a) Enediynes, such as **A**, initiate the radical-mediated cleavage of DNA. Conjugating **A** with **B** will promote sequence-selective cleavage at TTAA sites, while conjugation with **C** will promote cleavage at a variety of purine-rich sites. Rationalize the difference in selectivity and indicate whether you anticipate the trend to hold for double- or single-stranded DNA. *(Please answer in 4 or fewer sentences.)* (10 Points)

(b) The biologically relevant reactive intermediate **D** forms a DNA adduct by alkylating DNA at the 7-position of guanine. Draw the complete chemical structure of the resulting DNA adduct within the DNA sequence 5'-AGC-3'. (5 Points)

(c) The DNA adduct in (b) gives rise to G to T transition mutations. With a series of drawings, illustrate how these mutations arise, indicating any enzyme(s) involved *(for part c, use appropriate abbreviations for the DNA bases rather than full chemical structures)*. (15 Points)



Aufgabe 3 (30 Punkte)

Die Übersetzung von genetischer Information in Proteine wurde als eine wesentliche Funktion der RNA früh erkannt. Heutzutage wissen wir, dass RNA-Moleküle auch weitere unterschiedliche Funktionen in lebenden Zellen ausüben können.

(a) Beschreiben Sie kurz drei Beispiele von weiteren RNA-Funktionen. (15 Punkte)

(b) Inwiefern hat die Entdeckung dieser neuen Funktionen unser Grundverständnis der chemischen Evolution des Lebens beeinflusst? (10 Punkte)

(c) Beschreiben Sie, wie Sie ein künstliches RNA-Molekül entwerfen würden, um ein spezifisches Zielgen auszuschalten. (15 Punkte)

Problem 3 (30 Points)

The translation of genetic information into proteins was recognized early on as an essential function of RNA. Today we know that RNA molecules play diverse other roles in living cells.

(a) Briefly describe three examples of additional RNA functions. (15 Points)

(b) How has the discovery of these new functions influenced our understanding of the chemical evolution of life? (10 Points)

(c) Describe how you might design an artificial RNA molecule to silence a specific target gene. (15 Points)

Aufgabe 4 (30 Punkte)

Kohlenhydrate auf der Oberfläche von roten Blutkörperchen sind für die unterschiedlichen Blutgruppen verantwortlich. Unten abgebildet ist das für die Blutgruppe B typische Oligosaccharid.

(a) Bezeichnen Sie die Monomere, aus denen das Oligosaccharid aufgebaut ist und geben Sie an, wie sie miteinander verknüpft sind (α/β). (5 Punkte)

(b) Schlagen Sie monomere Bausteine mit geeigneten Schutzgruppen für die Synthese des Oligosaccharids vor und geben Sie geeignete Glykosylierungsbedingungen für deren Verknüpfung an *(berücksichtigen Sie dabei die Konfiguration an den anomeren Zentren)*. (12 Punkte)

(c) Zeichnen Sie das andere Anomer des abgebildeten Oligosaccharids *(es genügt, wenn Sie nur das Monosaccharid am reduzierenden Ende darstellen)* und begründen Sie, wieso diese beiden Isomere auftreten. Schätzen Sie die Gleichgewichtskonstante in Wasser ab und begründen Sie Ihre Antwort. (8 Punkte)

(d) Was passiert, wenn Blut der Blutgruppe B in die Blutbahn eines Menschen mit Blutgruppe A gespritzt wird? Geben Sie eine kurze Erklärung. (5 Punkte)

Problem 4 (30 Points)

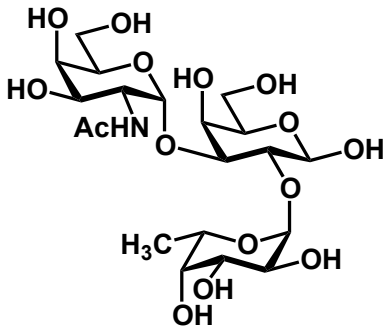
Carbohydrates on the surface of red blood cells serve as blood group determinants. Shown below is the oligosaccharide that is typical for blood group B.

(a) Identify the constituent monomers of the oligosaccharide. Indicate whether the anomeric linkages are α or β. (5 Points)

(b) Propose suitably protected monomeric building blocks for the synthesis of this blood group determinant and suggest glycosylation conditions for the assembly of the oligosaccharide *(pay attention to the configuration of each of the anomeric centers)*. (12 Points)

(c) Draw the other anomer of the oligosaccharide shown *(it is sufficient to draw the monosaccharide of the reducing end)* and explain why both isomers occur. Predict the equilibrium constant in water and provide an explanation. (8 Points)

(d) What happens when type B blood is injected into the blood stream of an individual with blood type A? Provide a brief explanation. (5 Points)



D-CHAB & D-BIOL

Schriftliche Prüfung / Written Exam

Nucleic Acids and Carbohydrates

August 2013

Name: .....

Vorname/First Name: .....

Department: .....

Lösen Sie nur drei der vier Aufgaben /
Solve only three of the four problems!

Zeit / Time: 40 min

Unleserliche Texte und unklare Formulierungen werden nicht bewertet /
Unreadable and unclear statements will not be graded!

Aufgabe 1 (30 Punkte)

Die Klonierung von Genen ist heute eine Routine-Technologie zur Untersuchung ihrer Funktionsweise.

(a) Stellen Sie Ihr eigenes Laborprotokoll zusammen, um die cDNA eines mutierten Gens eines Patienten zu klonieren. Sie kennen die kodierte Proteinsequenz des Wildtyp Gens und wissen, dass das Gen in menschlichen Haarzellen exprimiert wird. Das Protokoll muss aus einer sinnvollen Reihenfolge von maximal 9 Sätzen bestehen, welche die unten (alphabetisch) aufgeführten Begriffe enthalten und dadurch erklären: (18 Punkte)

Antibiotikum	PCR	reverse Transkriptase
DNA Methylase	Positiv-Selections-Vektor	T4-DNA-Ligase
Oligonukleotid	Restriktionsendonuklease	Transformation

(b) Wie würde der Begriff "Operon" in Ihr Protokoll passen? (2 Punkte)

(c) Wählen Sie eine passende DNA Sequenzierungsstrategie zur Bestätigung, dass Sie das gewünschte Gen kloniert haben. Nennen Sie 2 Gründe für Ihre Wahl. (5 Punkte)

(d) Schlagen Sie eine Alternative zur DNA Sequenzierung vor um Klone mit dem gewünschten Gen zu identifizieren. Skizzieren Sie Ihr Vorgehen mit maximal 3 Sätzen. (5 Punkte)

Problem 1 (30 Points)

Today, the cloning of genes is a routine technology for analyzing their function.

(a) Set up your own laboratory protocol to clone the cDNA of a mutant gene from a patient. You know the sequence of the encoded protein and that the gene is expressed in human hair cells. The protocol should consist of a logical succession of no more than 9 sentences that contain (and thereby explain) the following (alphabetically ordered) terms: (18 Points)

antibiotic	PCR	reverse transcriptase
DNA methylase	positive-selection vector	T4 DNA ligase
oligonucleotide	restriction endonuclease	transformation

(b) How would the term "operon" fit into your protocol? (2 Points)

(c) Select an appropriate DNA sequencing strategy to confirm that you have cloned the desired gene. Justify your choice with 2 arguments. (5 Points)

(d) Propose an alternative to DNA sequencing for identifying clones that carry the desired gene. Describe this procedure with no more than 3 sentences. (5 Points)

Aufgabe 2 (30 Punkte)

(a) Diethylsulfat (siehe Struktur ganz unten) ist ein Toxin, welches DNA an der Position 7 von Desoxyguanosine oder *O*6 von Desoxyguanosine alkyliert. Diethylsulfat führt auch zu abasischen Stellen. Illustrieren Sie mittels chemischer Strukturen für die DNA Sequenz 5'-AAGCC-3' den Mechanism für die Bildung von Addukten und abasischen Stellen (*passende Abkürzungen für die Nukleobasen sind erlaubt, falls sie nicht direkt an den gezeichneten Reaktionen beteiligt sind. Hinweis: zeigen Sie nur die Bildung desjenigen Addukts, welches am häufigsten abasische Stellen generiert*). (10 Punkte)

(b) Erklären Sie, weshalb das von Ihnen gewählte Addukt (d.h. entsprechend der *O*6- oder 7-Alkylierung) eher zur Bildung von abasischen Stellen beiträgt. (5 Punkte)

(c) DNA Glycosylasen erkennen Guanin-Addukte in der DNA und leiten eine Reparatur ein. Dies geschieht durch Bindungsinteraktionen in der Hauptfurche zwischen Protein (via Rückgrat-Carbonyl und Seitenketten Gruppen) und dem Basenpaar in der DNA (Wasserstoffbrücken Donor-Akzeptor-Donor Motive). Erwarten Sie, dass basierend auf diesem Erkennungsmodus die DNA Glycosylasen den Diethylsulfat-induzierten Schaden direkt erkennen? (*Begründen Sie Ihre Antwort mit Worten und/oder chemischen Strukturen*). (10 Punkte)

(d) Um Ihre Erklärungen in (a), (b) und (c) experimentell zu bestätigen, könnten Sie das modifizierte 5er Oligonukleotid synthetisieren. Zeichnen Sie das spezielle Reagenz, welches für die klassische chemische DNA Synthese dazu benötigt würde. (5 Punkte)

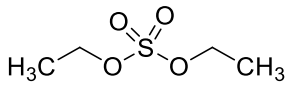
Problem 2 (30 Points)

(a) Diethylsulfate (structure shown below) is a toxin that can alkylate DNA at the 7-position of deoxyguanosine or the *O*6-position of deoxyguanosine. Diethylsulfate also promotes the generation of abasic sites. Using chemical structures, illustrate for the DNA sequence 5'-AAGCC-3' the mechanism of adduct and abasic site formation. (*You may use appropriate abbreviations for nucleobases when they are not directly involved in the illustrated transformations. Hint: you need only show formation of the adduct that most predominantly generates abasic sites.*). (10 Points)

(b) Explain why the adduct you chose to show above (i.e. corresponding to *O*6-alkylation or 7-alkylation) contributes predominantly to abasic site formation. (5 points)

(c) DNA glycosylase enzymes involved in repair initiation recognize guanine adducts in DNA by major groove binding of the protein (a main chain carbonyl group and side chain residues) with the base pair in DNA (hydrogen bond donor-acceptor-donor motifs). On the basis of this recognition behavior, do you expect that DNA glycosylases recognize diethylsulfate-induced DNA damage? Explain why or why not. (*You may use words and/or chemical structures to explain*). (10 Points)

(d) To gain experimental evidence for your assertions in parts (a), (b), and (c), you may wish to synthesize the modified 5-mer oligonucleotide. Draw the special chemical synthesis reagent you would need. (5 Points)



Aufgabe 3 (30 Punkte)

(a) Zeichnen Sie die vier gewöhnlichen Nucleoside, welche man in mRNA vorfindet. (8 Punkte)

(b) Wie würden Sie aufgrund Ihrer Kenntnisse von der DNA-Synthese diese Bausteine miteinander verknüpfen, um ein RNA-Dodecamer herzustellen? Welche speziellen Erwägungen müssen beachtet werden? (12 Punkte)

(c) Anwendungen von RNA als Antisense-Moleküle sind oft durch die geringe Stabilität dieser Verbindungen limitiert. Schlagen Sie die Struktur eines RNA-Analogons vor, das eine höhere Stabilität als RNA aufweisen würde. Erläutern Sie mögliche praktische Vor- und Nachteile Ihres Vorschlags für Antisense-Therapien. (10 Punkte)

Problem 3 (30 points)

(a) Draw the four common nucleosides found in mRNA. (8 points)

(b) Based on your knowledge of DNA synthesis how would you link these building blocks to generate an RNA dodecamer? What special considerations need to be taken into account? (12 points)

(c) Applications of RNA as antisense molecules are often limited by the poor stability of these compounds. Suggest the structure of an RNA analog that might be more stable than RNA. Explain the possible practical advantages and disadvantages of your suggestion for antisense therapies. (10 points)

Aufgabe 4 (30 Punkte)

Polysaccharide sind in der Natur weit verbreitet und erfüllen viele verschiedene Aufgaben. Unten sind die Strukturen (**A** und **B**) zweier wichtiger Polysaccharide abgebildet.

(a) Geben Sie die systematischen Namen und die Trivialnamen der beiden Polysaccharide an. *(Falls Sie die Trivialnamen nicht sofort wissen, beantworten Sie zuerst die Aufgaben (b) und (c)).* (4 Punkte)

(b) Bezeichnen Sie die Monomere, aus denen das Oligosaccharid aufgebaut ist und geben Sie an, wie sie miteinander verknüpft sind (α/β). (2 Punkte)

(c) Schlagen Sie Sekundär- und Tertiärstrukturen von **A** und **B** vor und zeichnen Sie diese. Geben Sie eine kurze Erklärung. (8 Punkte)

(d) Welche Aufgaben erfüllen die beiden Polysaccharide in der Natur? Geben Sie eine kurze Erklärung unter Berücksichtigung der Strukturen. (4 Punkte)

(e) Schlagen Sie monomere Bausteine mit geeigneten Schutzgruppen für die Synthese von **tri**saccharidischen Unterstrukturen der Polysaccharide vor und geben Sie geeignete Glykosylierungsbedingungen für deren Verknüpfung an *(berücksichtigen Sie dabei die Konfiguration an den anomeren Zentren).* (12 Punkte)

Problem 4 (30 Points)

Polysaccharides are widespread in nature and fulfill many different functions. Below are the structures (**A** and **B**) of two important polysaccharides.

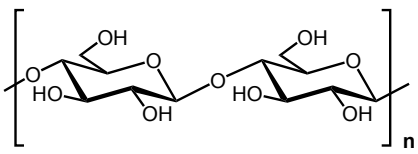
(a) What are the systematic and trivial names of the two polysaccharides? *(If you do not recognize them immediately, proceed and revisit this question after answering (b) and (c)).* (4 Points)

(b) Identify and name the constituent monomers of these polysaccharides. Indicate whether the anomeric linkages are α or β. (2 Points)

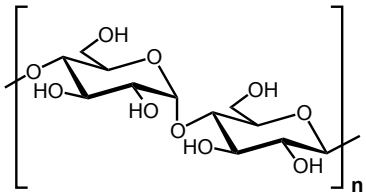
(c) Propose and draw secondary and tertiary structures of **A** and **B** and explain your reasoning. (8 Points)

(d) What are the functions of these polysaccharides in nature? Provide an explanation based on their structures. (4 Points)

(e) Propose suitably protected monomeric building blocks for the synthesis of a **tri**saccharide substructure of the two polysaccharides and suggest glycosylation conditions to assemble them *(pay attention to the configuration of each of the anomeric centers).* (12 Points)



A



B

Exercise 1: "The Genetic Material"

1) The fidelity of replication in the Watson & Crick DNA model is enabled by the specific pairing of the 4 standard nucleobases.

   (a) Identify the relevant hydrogen-bond donor and acceptor positions of the four bases in DNA in their most stable tautomeric forms.

   (b) Draw the structure of the double-stranded complex of oligonucleotide d(GATC) including the standard Watson-Crick base pairs and the backbone.

   (c) Hydroxylamine ($HO-NH_2$) is used in directed evolution experiments to introduce mutations into genes. Explain which types of mutations can be expected and why they occur.

   (d) How could you exploit PCR to introduce into a gene *(i)* a specific mutation, *(ii)* a randomized codon, or *(iii)* random mutations distributed over the entire region of the gene of interest.

2) The stability of nucleic acids is an important issue for their proper function.

   (a) Discuss the covalent stability of the phosphate-backbone for DNA and RNA. How does this compare with the hydrolysis of aliphatic phosphotriesters and phosphodiesters?

   (b) What is the biological significance of the differential stability of nucleic acids?

   (c) What factors contribute to the (non-covalent) stability of the double helical DNA structure? Can your answer also explain why both single-stranded and double-stranded DNA adopt a helical conformation?

3) Today, the cloning of genes is a routine technology for analyzing their function.

   (a) Set up your own laboratory protocol to clone the cDNA of a mutant gene from a patient. You know the sequence of the encoded protein and that the gene is expressed in human hair cells. The protocol should consist of a logical succession of no more than 9 sentences that contain (and thereby explain) the following (alphabetically ordered) terms:

antibiotic	PCR	reverse transcriptase
DNA methylase	positive-selection vector	T4 DNA ligase
oligonucleotide	restriction endonuclease	transformation

   (b) How would the term "operon" fit into your protocol?

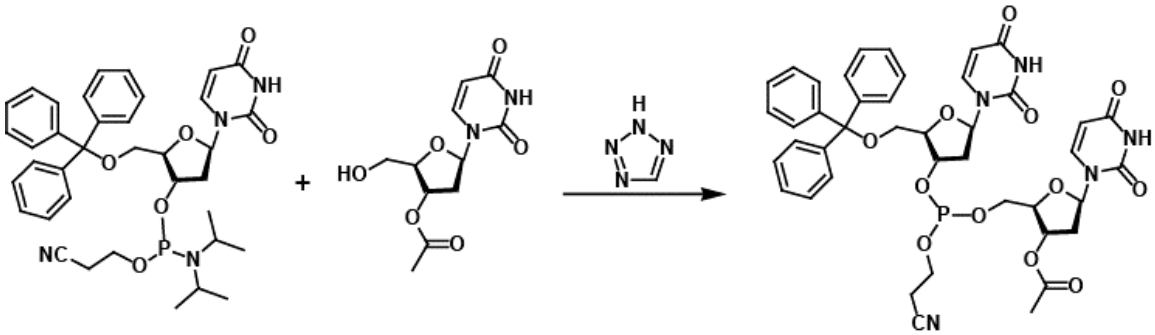
   (c) Propose ≥ 4 independent methods to verify that the obtained clones carry the desired gene.

Exercise II (DNA)

1. Calculate the exact mass (g) of the human diploid genome using the following information:

haploid genome = 3×10^9 bp, G/C content = 40%
2'-deoxyadenosine monophosphate (dAMP) = 330 g / mol
2'-deoxythymidine monophosphate (dTMP) = 321 g / mol
2'-deoxyguanosine monophosphate (dGMP) = 346 g / mol
2'-deoxycytidine monophosphate (dCMP) = 306 g / mol

2. Propose arrow-pushing mechanisms for the following reaction:



acetic acid has the same pK_a value as tetrazole (4.8) but it does not activate this reaction. Explain why.

3. Targeting duplex DNA can be accomplished by triplex-forming oligonucleotides and Distamycin-like polyamides. Propose a molecule from each family to specifically bind the following DNA sequence: 5'-AGAGAGAGAGAAAAA-3'

4. G→T transversion mutations may result from chemicals that promote the formation of reactive oxygen species.

(a) The formation of what modified nucleoside (draw structure) best explains this observation?
(b) Provide a detailed mechanism that explains the chemical and biochemical basis of how the mutation is acquired.
(c) Propose a mechanism for repair of the DNA damage in a cell that is deficient in hOGG1.

Exercise 3 – Reference list Q1-4

Q1. Kruger K. et al., 1982, Cell, Vol. 31, 147-157

Q2. Piccirilli et al., Nature, vol 361, 1993, 885

Q3. MacFarlane, L. and R. Murphy, P. (2010). *Current Genomics*, 11(7), pp.537-561.

Q4. Chandra M. et al., 2008, JACS, 130, 2936-2937

Biological Chemistry I: Exercise 3 (RNA World)

1. Thomas Cech showed that the ribosomal RNA (rRNA)-precursor can splice itself in the ciliate *Tetrahymena thermophilia* without the participation of any proteins. He cloned a region of *Tetrahymena* DNA that includes the intron and accompanying sequences into a plasmid. How could this plasmid have been used in order to establish that *Tetrahymena* proteins are not necessary for the excision of the intron?

2. In the transition state that was postulated for the intron-catalyzing splicing reaction (see handout), a Mg^{2+} ion stabilizes the negative charge on the 3'-oxygen of the leaving group. When this oxygen atom is replaced by sulfur, Mg^{2+} becomes inactive for catalysis. In contrast, in presence of Mn^{2+} instead of Mg^{2+}, the scission reaction takes place efficiently. Why?

3. a) What are microRNAs?

   b) Draw a diagram illustrating how microRNAs are generated in eukaryotic cells.

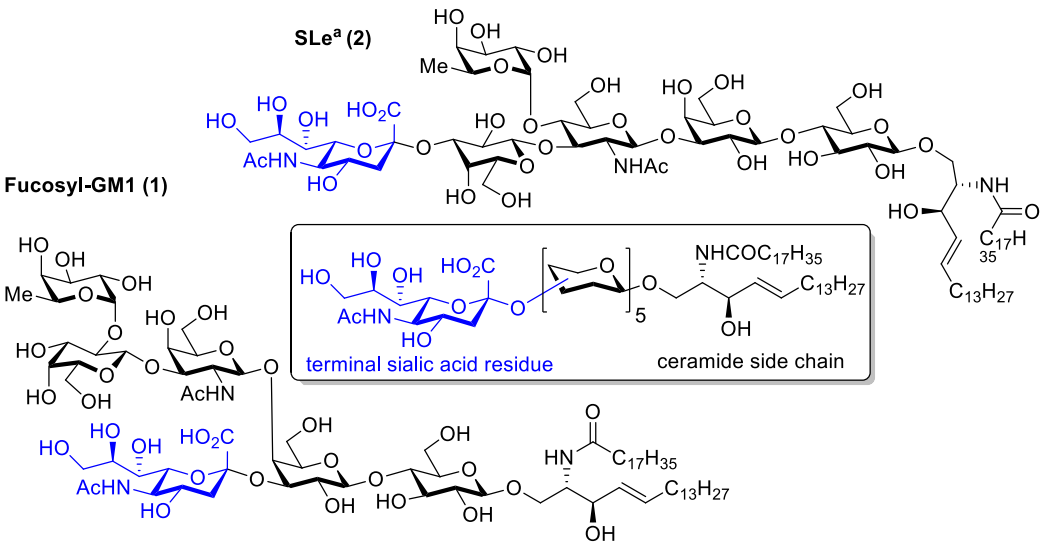
   c) How can microRNAs regulate the expression of other genes?

   d) Why is there such interest in the use of RNA interference in the treatment of genetic diseases in humans?

4. Describe in detail how you would select a DNA sequence that catalyzes a Diels-Alder reaction. How would you expect it to perform relative to an analogous ribozyme?

5. How would you expect the binding of a metabolite to alter the hydrolytic stability of its cognate riboswitch? Why? How could you use the observed changes to map the ligand binding site?

BCI: Carbohydrates Exercise Sheet



1) The glycosphingolipids fucosyl-GM1 (1) and SLe_x (2) have common structural features including a sphingosine unit, an oligosaccharide core and a terminal sialic unit. Clearly indicate these regions on the diagrams above.

2) Identify the constituent monosaccharides

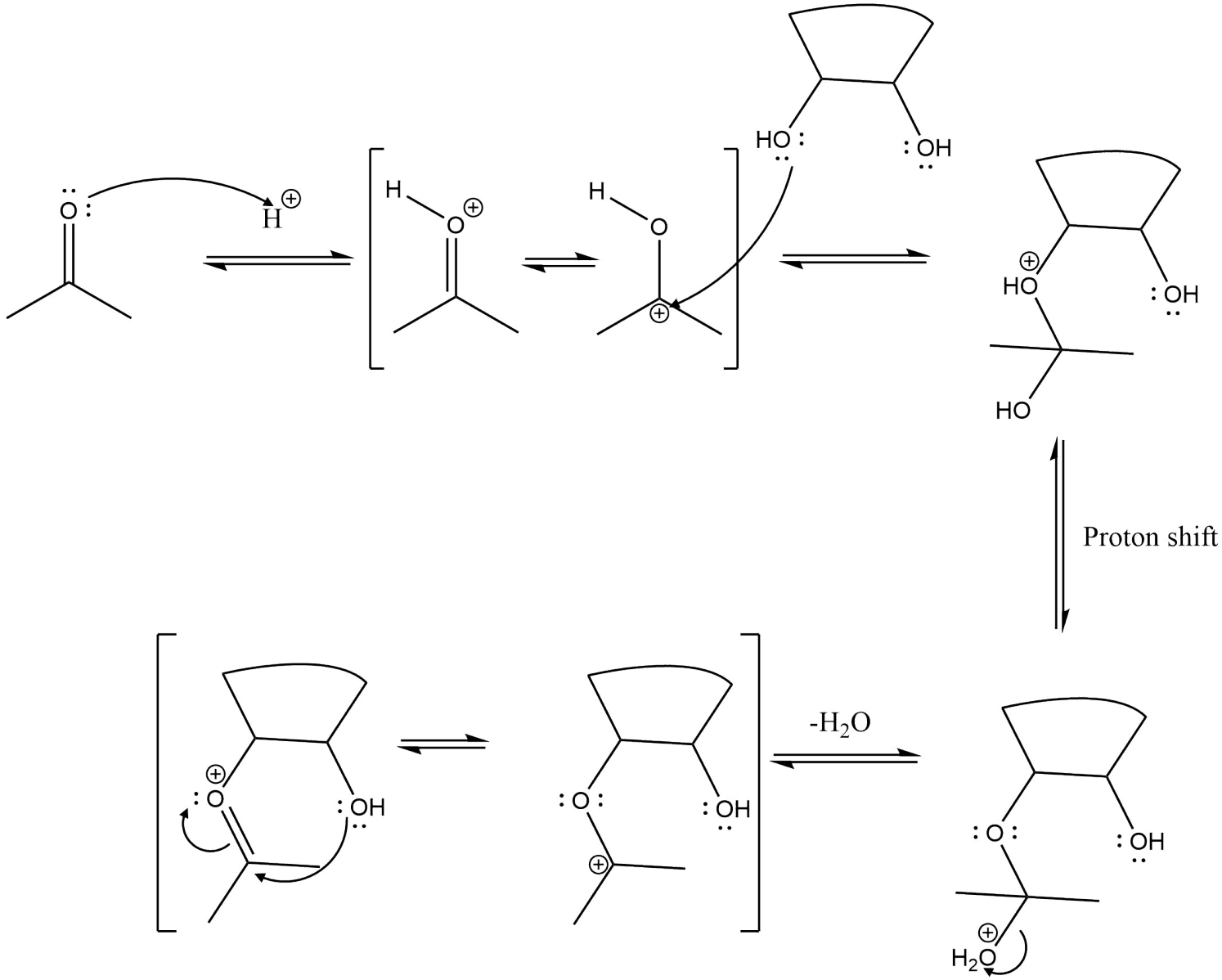
3) Indicate whether the anomeric linkages are α or β (1,2-cis or 1,2-trans)

4) Propose strategic building blocks for the GalNAc β (1→4) Gal β(1→4) Glu portion of fucosyl GM1. Indicate which positions must be permanently protected and which must be temporarily protected.

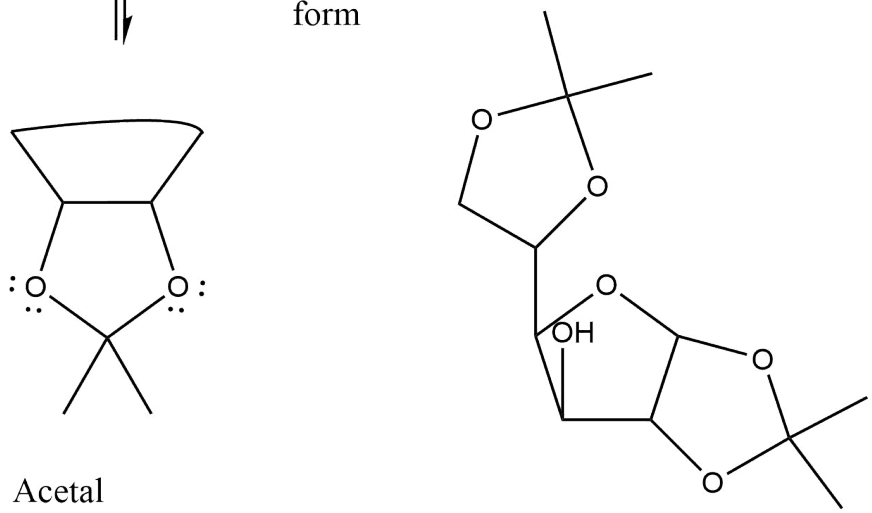
5) Suggest a glycosylation method for the construction of this motif.

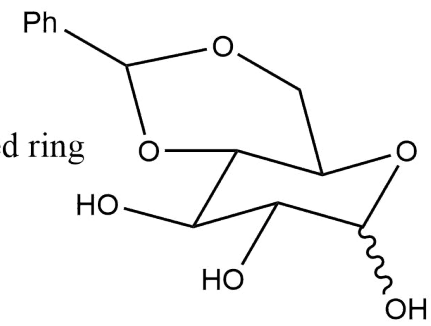
6) In class we discussed the reaction of glucose with acetone in the presence of catalytic amounts of pTsOH to form a bis-acetonide. Make sure that you can draw the mechanism via which this product forms.

Glucose



Most stable in 5-membered ring with cis-conformation e.g. furanose form



Acetal

Benzylidene acetal most stable in 6-membered ring