



Oppg 1

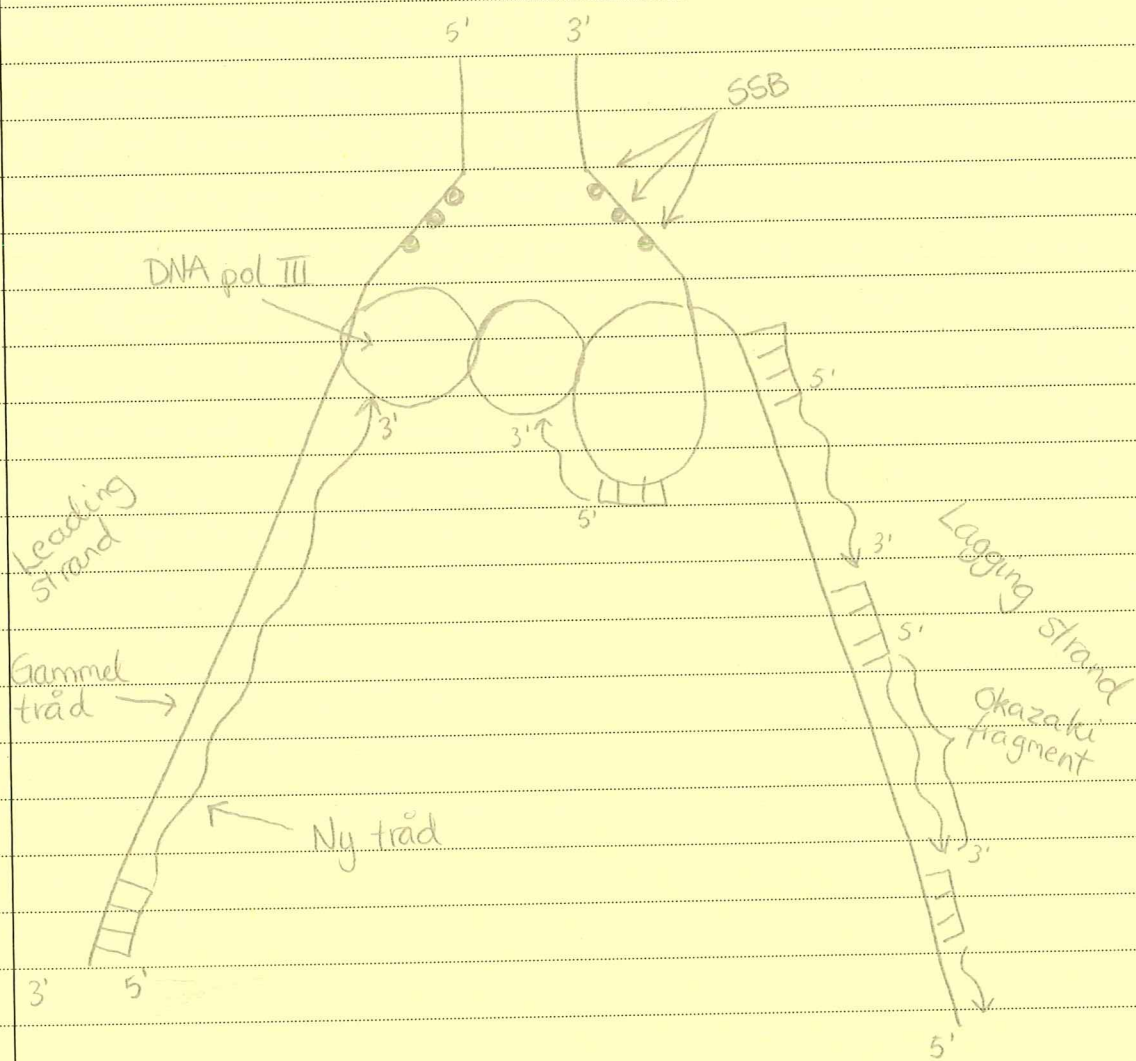
DNA-replikasjon hos prokaryoter :

DNA-replikasjon hos prokaryoter skjer kontinuerlig mens de vokser. Stedet der replikasjonen starter kalles *oriC*. Dette er et A-T-rikt område. Proteinene ~~DnaA~~ *DnaA* starter med å åpne DNA-heliksen her. Enzymet *Helicase* har som oppgave å tvinne opp dobbeltråden. Dobbelttrådene holdes separert vha. *SSB* (single-strand binding protein). Det er enzymet *DNA polymerase III* som står for selve syntesen i prokaryoter. *DNA pol III* krever en primer eller en påbegynt DNA-tråd å forlenge. Dette løses ved at primase (en RNA polymerase) syntetiserer en kort RNA primer. Primer settes på i startpunktet, og nå kan *DNA pol III* syntetisere ny DNA-tråd med den gamle tråden som templat. Syntesen skjer i $5' \rightarrow 3'$ retning ved at riktige nukleotider (dNTP = ATP/TTP/GTP/CTP) som er komplementære med templattråden settes på OH-gruppen på 3'enden av forrige nukleotid. Den ene tråden syntetiseres sammenhengende og kalles *leading strand*. For at syntesen skal kunne foregå i $5' \rightarrow 3'$ retning på den andre tråden, blir den syntetisert som mange korte *Okazaki-fragmenter*. Denne tråden kalles dermed *lagging strand*. Etterpå fjernes alle primerene på *lagging strand* av *DNA pol I*, som også fyller inn hullene med riktige nukleotider. Etter dette limer *DNA ligase* dem sammen slik at dette også blir en sammenhengende tråd. DNA-syntesen er semikonservativ siden de ferdige dobbelttrådene består av en ny og en gammel tråd.



Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 8534
Dato : 01.12.16
Ark nr. : 2 av 8

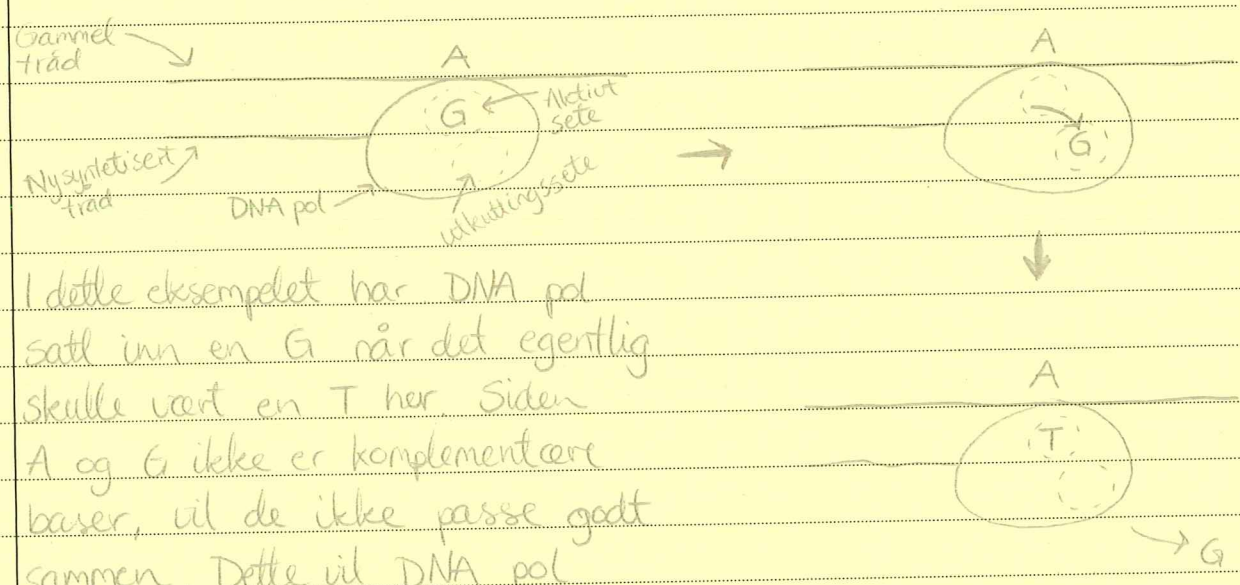
I løpet av syntesen dannes det positive supercoils (spenning/twisting av DNA-tråden), som følge av opptviningen. Dette løses ved at enzymet gyrase (topoisomerase II) legger inn negative supercoils foran replikasjonsgaffelen. Disse vil nøytralisere supercoilsene. I tillegg finnes det også et clamp protein som hjelper med å holde DNA pol III på plass.





Oppg. 2 a) Exonucleolytic proofreading:

Mens DNA pol syntetiserer ny DNA-tråd i DNA replikasjonen har den også en proofreading-funksjon (korrekturlesning). Det vil si at etter at DNA pol har satt på et nukleotid på OH-gruppen på 3'enden av forrige nukleotid, sjekker den at det faktisk er riktig nukleotid som er påsatt. At det faktisk stemmer med det templatstråden sier. Dette kan illustreres med et eksempel:



I dette eksemplet har DNA pol satt inn en G når det egentlig skulle vært en T her. Siden A og G ikke er komplementære baser, vil de ikke passe godt sammen. Dette vil DNA pol kunne fange opp. Forøvrig blir aktiviteten til DNA pol mye mindre effektiv når den har feil base i sitt aktive sete. Den feile basen vil bli skjøvet over i et utkuttingssete og fjernet. Nå kan DNA pol sette inn riktig base, nemlig T i dette tilfellet.

Det hender at DNA pol overser slike feil, og da finnes det andre mekanismer som kan rette dem opp.



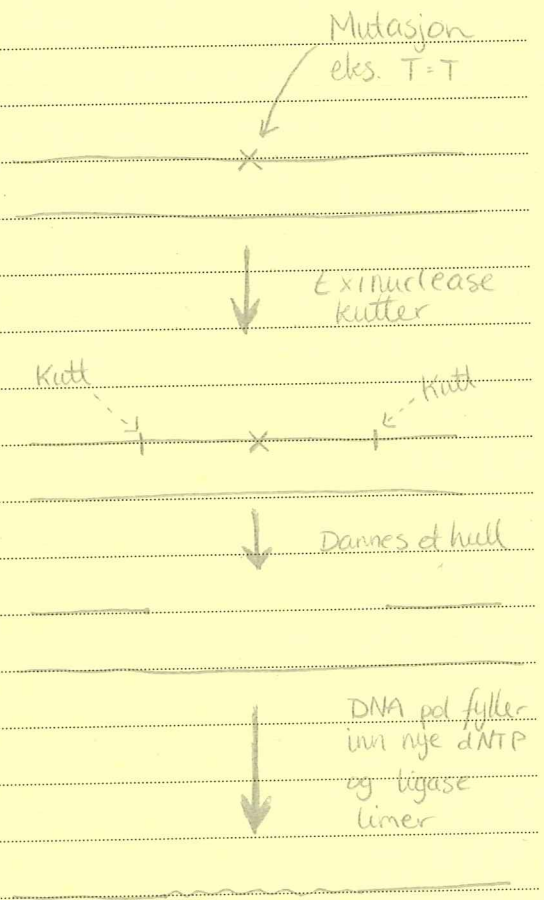
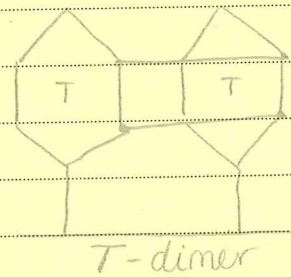
Oppg. 2 b) Nucleotide excision repair:

UV-stråler kan føre til mutasjoner. Et eksempel på dette er at det dannes kovalente bindinger mellom to baser på samme tråd. Oftest omfatter dette tyminer. Det som dannes kalles en T-dimer (T=T).

Dette kan rettes opp med direct repair, men også med nucleotide excision repair. I denne reparasjonen inngår det Uvr-proteiner, såkalte exinucleaser.

Disse vil lage et kutt på hver side av mutasjonen og et stykke på 12-13 ~~baser~~ nukleotider fjernes. Videre vil

DNA pol I legge inn nye, riktige nukleotider i hullet med den andre DNA-tråden som templat. Til slutt vil DNA ligase lime sammen

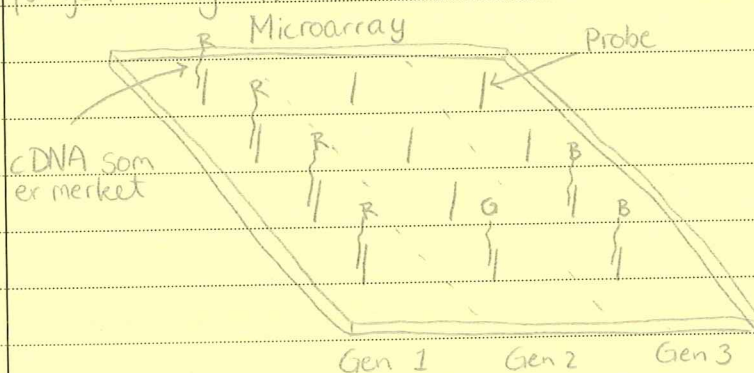


Oppg 3

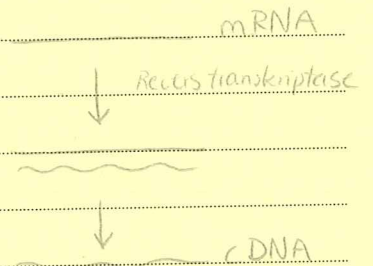
Når vi skal se på genekspressjon, må vi ta utgangspunkt i mRNA. mRNA gjenspeiler hvilke gener som er aktive i et gitt tidspunkt. Når medikamentet er gitt, må vi ekstrahere mRNA fra de hvite blodcellene. mRNA er derimot ustabil, derfor omdanner vi mRNA-molekylene til cDNA (komplementært DNA). Dette kan gjøres ved hjelp av virusenzymet revers transkriptase. Dette enzymet lager DNA-tråd med mRNA som template. mRNA vil nedbrytes og vi sitter igjen med cDNA som vil gjenspeile hvilke gener som uttrykkes, og er mye mer stabilt enn mRNA.

Til denne microarrayen lager vi prober ~~som~~ med utgangspunkt i alle genene i de hvite blodcellene, eller bare de vi mener er aktuelle. Disse vil kunne hybridisere med cDNA vi har laget.

Probene festes på microarray-platen. cDNA som vi har laget blir merket med fluorescens eller ulike farger. Jeg vil tro at man f.eks. kan merke alt cDNA som kommer fra gen 1 med rød farge, cDNA fra gen 2 med grønn farge osv. cDNA overføres deretter til microarrayen og hybridiserer med passende prober. Der hybridisering har skjedd vil vi få farge reaksjon.



R = red farge
 G = grønn farge
 B = blå farge
 (Microarrays gjennomføres selvfølgelig i større skala enn vist på tegningen.)





Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 8534
Dato : 01.12.16
Ark nr. : 6 av 8

Dersom vi observerer mye rød farge, vil dette indikere at gen 1 er mye uttrykt. Lite grønn farge betyr at gen 2 er lite uttrykt osv. Resultatet burde sammenliknes med en microarray ~~med~~ med cDNA fra personen før medikamentet ble tilsatt for å kunne se noe om genene har blitt oppregulert eller nedregulert.

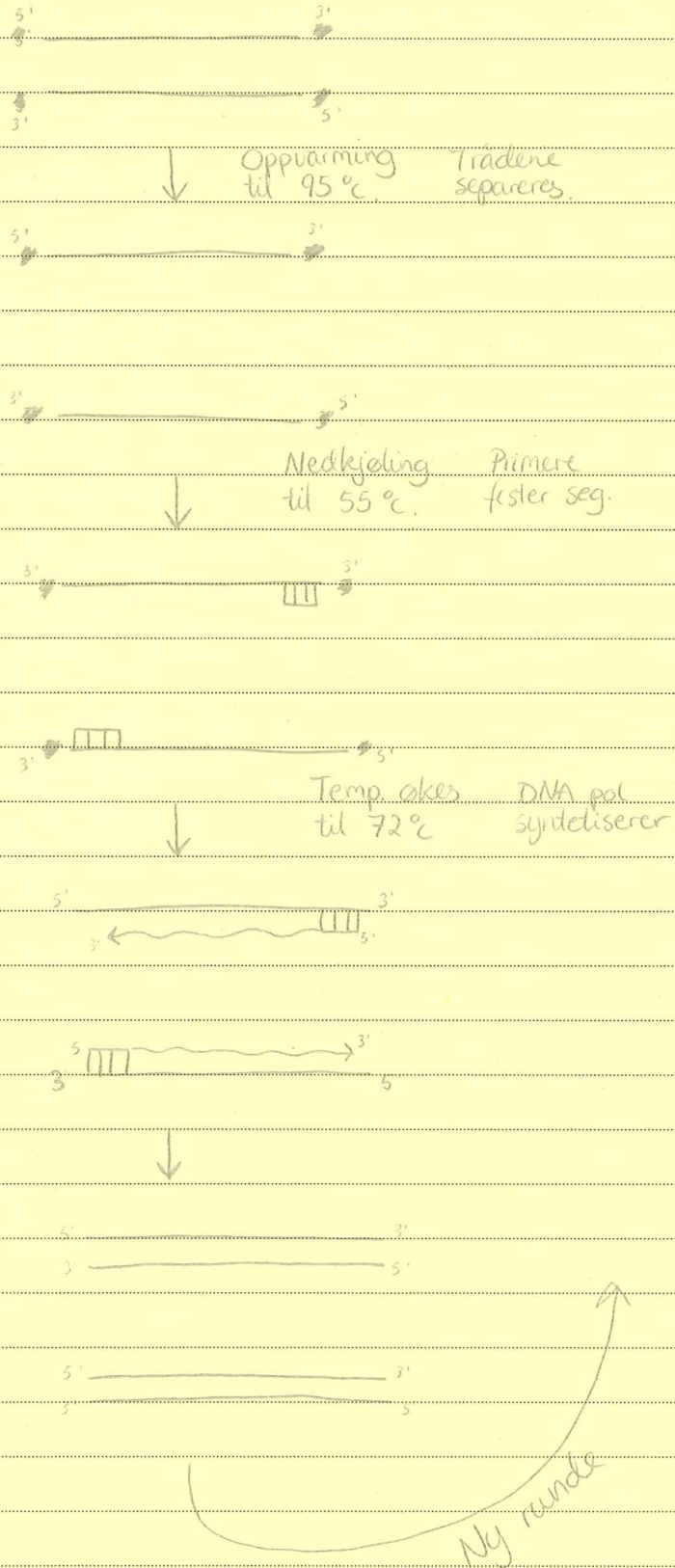
Oppg. 4 a) Prinsipp for PCR:

PCR står for Polymerase (chain) Reaction og er en metode for å effektivt amplifisere (kopiere) korte DNA-segmenter. Første trinn går ut på å varme opp løsningen til 95°C . Dette er for å denaturere DNA-dobbeltråden (bryte hydrogenbindingene) slik at vi oppnår to enkelttråder. Neste trinn innebærer avkjøling til 55°C slik at primerene kan feste seg. Videre skjer en oppvarming til 72°C , som er optimumstemperaturen til vår DNA polymerase. Det vil si at DNA pol arbeider mest effektivt ved denne temperaturen. DNA pol syntetiserer nye DNA-tråder ved å legge til nukleotider som er komplementære til templattråden, akkurat som ved DNA-replikasjon. Vi har nå fått to kopier av den ønskede DNA-sekvensen. Nå starter en ny runde med akkurat de samme trinnene som beskrevet over. Prosessen gjentas helt til vi har fått ønsket antall av DNA-sekvensen.



Emnekode : ML-208
Kandidatnr. : 8534
Dato : 01.12.16
Ark nr. : 7 av 8

Illustrasjon
av PCR-
prinsipp:





Oppg 4 b)

Det kan tenkes flere grunner til at vi har fått uspesifikke bånd i brønn A:

Kanskje har de to prøvene blitt behandlet litt annerledes. Chelexkuler tilsettes vanligvis prøver i forkant av PCR-analyse for å binde metallioner og diverse andre forstyrrende molekyler som kan interferere med PCR. Kanskje de har vært glemt tilsatt i prøve A og vi dermed har fått et uiktig resultat. Det er mulig at det av en eller annen grunn har blitt en ugunstig temperatur i prøve A. Dette kan ha gjort at noen primere har bundet seg til områder de bare er delvis komplementære til og i utgangspunktet ikke skulle ha gjort. Dermed har det oppstått flere PCR-produkter som har gitt flere bånd enn ønsket. Kanskje når prøve A skulle appliseres i brønnen på gelelektroforesen, at ikke alt traff oppi. Lite prøve betyr få PCR-produkter. Dette kan ha gjort at det har blitt et stort overskudd av primere. Noen primere kan også ha dannet primer-dimerer. Dette vil vises som bånd som har vandret langt i gelen.

Uspesifikke bånding →

For å unngå slike ekstrabånd er det viktig at man er svært nøye ved gjennomføringen av alle forberedelsestrinnene. Chelexkuler må tilsettes og riktig temperatur må opprettholdes på prøven. Selvfølgelig må man heller ikke få med annet DNA enn det som vi er interessert i å analysere. Prøvene må i tillegg appliseres riktig på gelen. Sørg for at primerene ikke binder seg uspesifikt til DNA-sekvensen vår!