

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΙΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ DNA

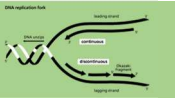
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ:

- Η αντιγραφή γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο (δλδ κάθε νέο μόριο DNA αποτελείται από μία παλιά και μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα).
- Συνήθως ένα μόριο απομονώνεται και μεταφέρεται σε ραδιενεργό περιβάλλον. Το μητρικό μόριο είναι μη ραδιενεργό σε φωσφόρο ή άζωτο. Εάν η αντιγραφή γίνει σε ραδιενεργό περιβάλλον, κάθε νεοσυντιθέμενη θυγατρική αλυσίδα αποτελείται από νουκλεοτίδια που φέρουν ραδιενεργά στοιχεία. Με το πέρας της διαδικασίας της αντιγραφής τα μόρια DNA που είναι ραδιενεργά είναι τα συνολικά μόρια DNA – 2 (δλδ τα μητρικά μόρια). Αν η αντιγραφή γίνει σε περιβάλλον με ραδιενεργό θείο, οι θυγατρικές αλυσίδες δεν επηρεάζονται.

Μην ξεχνάτε να κάνετε σχήμα!

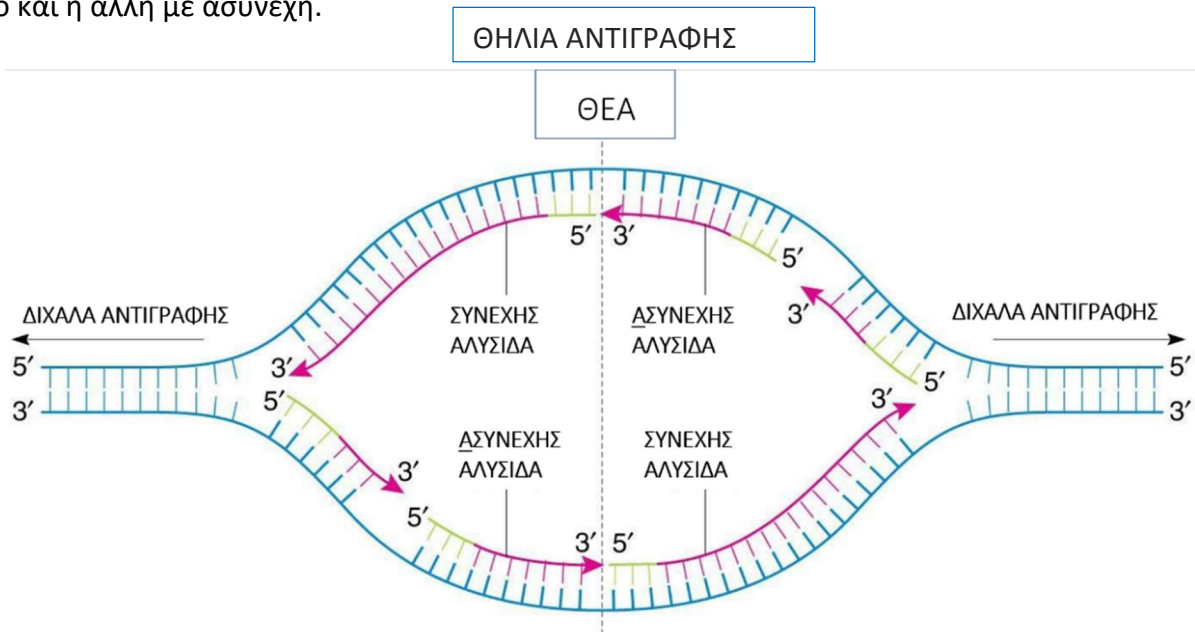
- Σε κάθε ΘΕΑ δημιουργείται μια θηλιά αντιγραφής, η οποία σταδιακά αναπτύσσεται και προς τις 2 κατευθύνσεις με αφετηρία τη ΘΕΑ. Συνεπώς, έχουμε 2 διχάλες αντιγραφής, στις οποίες η αντιγραφή γίνεται ταυτόχρονα εκατέρωθεν της ΘΕΑ και προς τις δύο κατευθύνσεις. Στις ασκήσεις η ταχύτητα αντιγραφής στις 2 διχάλες της ίδιας θηλιάς είναι η ίδια.
- Επιπλέον, προσέχουμε την εκφώνηση, εάν αναφέρεται σε θηλιά ή διχάλα. Αν μας δίνεται ότι συντέθηκαν π.χ. 10 πρωταρχικά τμήματα σε διχάλα, ένα θα είναι σε συνεχή αλυσίδα και 9 σε ασυνεχή. Αν μας δίνεται ότι συντέθηκαν 10 τμήματα σε θηλιά, 2 θα είναι σε συνεχή αλυσίδα και 8 σε ασυνεχή.
- Οι DNA πολυμεράσες δρουν μόνο σε $5' \rightarrow 3'$ κατεύθυνση. Αυτό σημαίνει πως συνδέουν στο $3'$ άκρο της πεντόζης του κάθε δεοξυριβονουκλεοτιδίου το επόμενο δεοξυριβονουκλεοτίδιο με $3'-5'$ φωσφοδιεστερικό δεσμό βάσει του κανόνα συμπληρωματικότητας των βάσεων. Άρα η αντιγραφή γίνεται με προσανατολισμό $5' \rightarrow 3'$.
- Οι DNA πολυμεράσες αδυνατούν να ξεκινήσουν τη διαδικασία της αντιγραφής σε μονόκλωνο τμήμα DNA. Απαιτείται ελεύθερο $3' \text{ OH}$ (ριβόζης ή δεοξυριβόζης) και μονόκλωνη αλυσίδα ως καλούπι. Ο πολυμερισμός ξεκινά παρουσία ριβονουκλεοτιδίων μήκους 18-24 βάσεων που ονομάζονται πρωταρχικά τμήματα. Αυτά είναι συμπληρωματικά στη μητρική αλυσίδα και βρίσκονται πάντα στο $5'$ άκρο του συνεχούς ή ασυνεχούς νεοσυντιθεμένου τμήματος. **Συνεπώς, προαπαιτείται η ύπαρξη νουκλεϊκού τμήματος συμπληρωματικού με το μητρικό κλώνο με ελεύθερο -OH για τη δράση της DNA πολυμεράσης.**

*Σε επόμενο κεφάλαιο θα μάθουμε πως τα ριβονουκλεοτίδια των πρωταρχικών τμημάτων μπορούν *in vitro* να αντικατασταθούν από δεοξυριβονουκλεοτίδια που ονομάζονται «εκκνητές» και εξυπηρετούν στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).



ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΙ ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΤΡΟΠΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Για να δράσει η DNA πολυμεράση στην κατεύθυνση 5'→3' η μια αλυσίδα αντιγράφεται με συνεχή τρόπο και η άλλη με ασυνεχή.



Με **συνεχή** τρόπο αντιγράφεται πάντα το τμήμα της μητρικής αλυσίδας που έχει το **5'** άκρο του προς τη μεριά που ανοίγει η διχάλα της αντιγραφής.

Με **ασυνεχή** τρόπο πάντα το τμήμα της μητρικής αλυσίδας που έχει το **3'** άκρο του προς τη μεριά που ανοίγει η διχάλα της αντιγραφής.

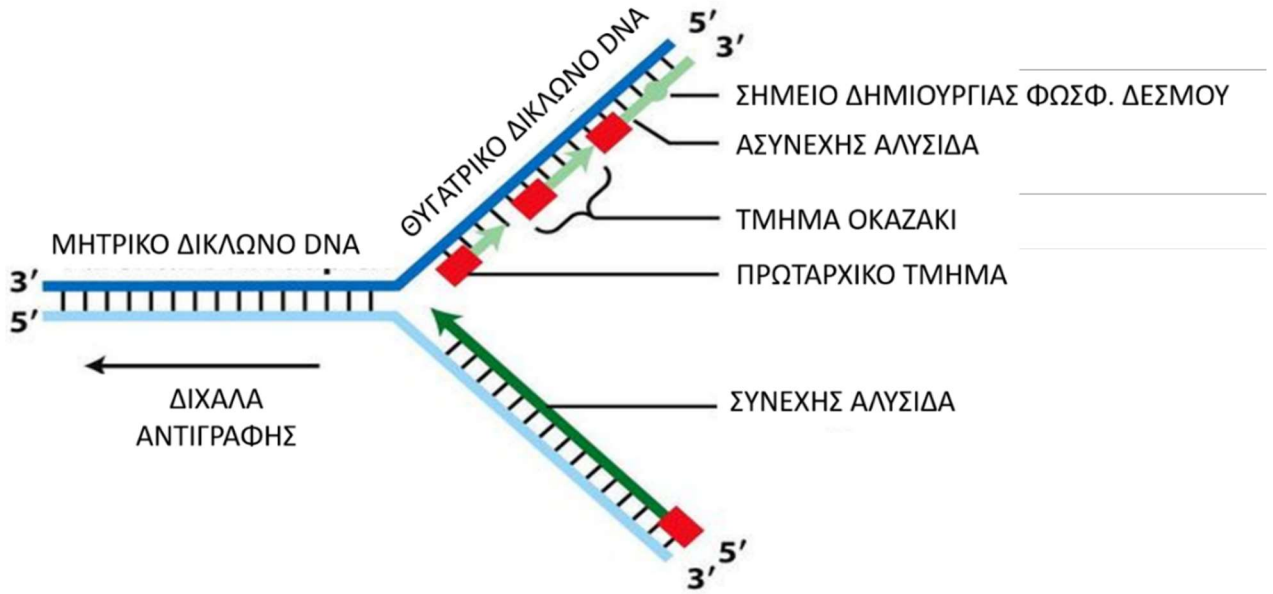
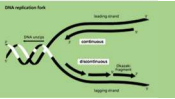
Συνεπώς, σε κάθε θηλιά αντιγραφής, όπως γίνεται η διαδικασία (συνεχής ή ασυνεχής) στη μία διχάλα, το ίδιο γίνεται χιαστί και στην άλλη.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Αν δε δίνονται κατευθύνσεις αντιγραφής, το πρωταρχικό τμήμα που ξεκινά από τη ΘΕΑ δηλώνει πως ο πολυμερισμός (αντιγραφή) θα είναι συνεχής!

Αν το πρωταρχικό τμήμα ξεκινά πριν τη ΘΕΑ μας δηλώνει ότι η αντιγραφή στην αλυσίδα αυτή γίνεται με ασυνεχή τρόπο.

Το ασυνεχές τμήμα που είναι πιο κοντά στη ΘΕΑ συντέθηκε πρώτο.

Η ΘΕΑ ορίζεται από το πρωταρχικό τμήμα που θα τοποθετηθεί στην αλυσίδα, η οποία αντιγράφεται με συνεχή τρόπο.



- Εάν σε μια άσκηση μας δίνεται ένα στιγμιότυπο αντιγραφής και μας ζητείται να προσδιορίσουμε το μήκος του πρωταρχικού τμήματος, τότε πρέπει μετά την τελευταία U να ακολουθεί απευθείας T.

Π.χ.

Θυγατρική αλυσίδα:	U A C G A U T A A C G T
Μητρική αλυσίδα:	A T A T G C T A A T T G C A C G

Αρχικά, αν μας ζητηθεί να τοποθετήσουμε τα 5' και 3' άκρα στο μόριο DNA, πάντα ξεκινάμε από τη θυγατρική αλυσίδα – αναγνωρίζουμε το πρωταρχικό τμήμα που τοποθετείται στο 5' άκρο κάθε νεοσυντιθεμένης αλυσίδας και τοποθετούμε τα άκρα με δεδομένο η αντιγραφή γίνεται 5' → 3'.

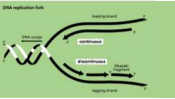
Άρα στο παράδειγμα, λόγω της βάσης U, το πρωταρχικό τμήμα τοποθετείται αριστερά της θυγατρικής αλυσίδας με άκρο 5'. Συνεχίζουμε και στα υπόλοιπα άκρα.

Επιπλέον, αποτελείται από 6 ριβονουκλεοτίδια. Μετά την 6^η (και τελευταία U) ακολουθεί T (δεοξυριβονουκλεοτίδιο).

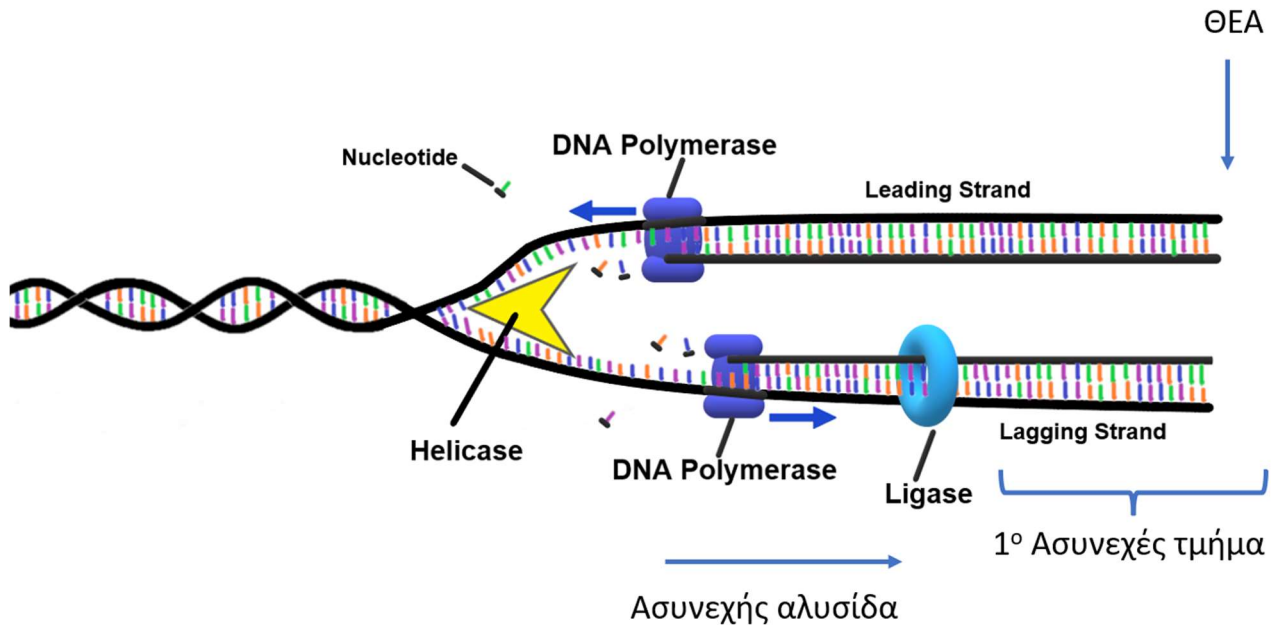
Εάν ακολουθεί άλλο νουκλεοτίδιο (π.χ. G) παίρνουμε περιπτώσεις.

ΠΡΟΣΟΧΗ! Τα RNA πρωταρχικά τμήματα, εκτός από τη βάση U αντί για T έχουν και ριβονουκλεοτίδια, αντί για δεοξυριβονουκλεοτίδια.

- Η αντιγραφή σε ένα κύτταρο γίνεται όπου υπάρχει γενετικό υλικό, δηλ σε ένα ευκαρυωτικό σε πυρήνα, μιτοχόνδρια και χλωροπλάστες (εάν είναι φυτικό). Στα κυκλικά μόρια υπάρχει μια ΘΕΑ.



- Η DNA πολυμεράση όσο πολυμερίζει ενώνει και τα νουκλεοτίδια με ομοιοπολικό φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η DNA δεσμάση ενώνει τα τμήματα Okazaki . Δηλαδή δημιουργεί φωσφοδιεστερικό δεσμό εκεί που αδυνατεί να ενώσει η DNA πολυμεράση τα ασυνεχή τμήματα.



Καθώς μία από τις DNA ροι θα αντικαθιστά τα ριβονουκλεοτίδια του πρωταρχικού τμήματος με δεοξυριβουκλεοτίδια θα αφήσει ένα κενό μεταξύ του τμήματος που πριν ήταν πρωταρχικό τμήμα και του ήδη πολυμερισμένου τμήματος. Εκεί δρα η DNA λιγάση (δεσμάση) σχηματίζοντας φωσφοδιεστερικό δεσμό.