

METABOLISMO DO DNA

3.1 Replicação do DNA

3.1.1 Aspectos gerais da replicação

Verdadeiro/Falso

1. A síntese de DNA é contínua numa cadeia de DNA (cadeia líder) e descontínua na cadeia complementar (cadeia atrasada). V
2. O movimento do garfo de replicação acompanha o movimento de síntese da cadeia atrasada de DNA. F
3. Ocasionalmente, a DNA polimerase adiciona um nucleótido incorrecto na extremidade de DNA em crescimento. A presença de um nucleótido erradamente emparelhado activa a actividade exonucleásica 3' – 5', também denominada actividade de revisão de provas. V
4. A propriedade de revisão de provas, das DNA polimerases, depende da actividade exonucleásica 5' – 3' destas enzimas. F
5. Uma molécula de DNA ou uma região de DNA que replica como uma unidade individual designa-se de replicão. V
6. A replicação *teta* (θ) não requer qualquer quebra das cadeias da molécula de DNA para iniciar este processo. V
7. Numa molécula de DNA circular, com replicação θ , são encontrados um ou dois garfos de replicação dependendo se a replicação é uni- ou bidireccional. V

Escolha múltipla

1. Qual das seguintes características não é considerada uma propriedade fundamental do material genético? a) ter capacidade de ser copiado correctamente; b) codificar a informação necessária para produzir proteínas; c) mutar ocasionalmente; d) ter capacidade de se adaptar a cada célula dos diferentes tecidos do corpo; e) ser uma molécula de ácido nucleico. d
2. A síntese de DNA *in vivo* requer: a) desoxirribonucleósidos trifosfatados; b) desoxirribonucleósidos monofosfatados; c) ribonucleósidos trifosfatados; d) ribonucleósidos monofosfatados; e) ATP como fonte de energia. a, e
3. A síntese de DNA é contínua numa das cadeias e descontínua na cadeia complementar porque: a) as duas cadeias são antiparalelas; b) requer sequências específicas de reconhecimento para replicar o DNA; c) a síntese de DNA se processa no sentido 5' – 3'; d) ocorre simultaneamente em ambas as cadeias ao longo do garfo de replicação; e) a síntese de DNA ocorre no sentido 3' – 5'. a, c, d
4. A replicação descontínua refere-se ao facto de: a) a síntese de DNA ocorrer em origens múltiplas de replicação; b) uma das cadeias filhas ser sintetizada através de fragmentos pequenos, posteriormente interligados; c) a síntese de DNA não ser simultânea com a síntese de RNA; d) a síntese de DNA começar e parar muitas vezes antes de terminar; e) haver assimetria na sequência das origens de replicação. b
5. As origens de replicação: a) contêm sequências nucleotídicas necessárias e suficientes para iniciar a replicação de uma molécula de DNA circular, no hospedeiro adequado; b) contêm geralmente sequências ricas em resíduos de adenina e timina; c) não existem em moléculas de DNA plasmídico; d) podem ser funcionais quando clonadas em plasmídeos; e) são específicas dos diferentes organismos. a, b, d, e
6. Os principais requisitos para a DNA polimerase catalisar a síntese de DNA são os seguintes: a) uma extremidade 5' trifosfato na cadeia em síntese; b) extremidades 5' trifosfato dos 4 desoxirribonucleótidos; c) extremidades 5' monofosfato dos 4 desoxirribonucleótidos; d) um curto segmento de RNA ou DNA (*primer*) que emparelha com a cadeia molde; e) DNA molde. b, d, e
7. O desenrolamento da dupla hélice ao nível do garfo de replicação, durante a replicação do DNA, é função da(s): a) DNA polimerase; b) proteínas de ligação a DNA de cadeia simples (SSB); c) topoisomerase; d) helicase; e) primase. d
8. A primase é uma: a) DNA polimerase dependente de DNA; b) DNA polimerase dependente de RNA; c) RNA polimerase dependente de DNA; d) RNA polimerase dependente de RNA; e) enzima cujos precursores da sua actividade polimerásica são ribonucleótidos trifosfatados. c, e

9. Os *primers* de RNA nas extremidades dos fragmentos de Okazaki devem ser removidos e substituídos por DNA, pois caso contrário, verificar-se-ia um dos seguintes acontecimentos: a) o RNA não seria correctamente lido durante a transcrição, interferindo assim com a síntese de proteínas; b) o RNA poderia conter erros porque a primase não tem actividade de revisão de provas; c) as pequenas sequências de RNA desestabilizariam e começariam a quebrar-se em ribonucleótidos, gerando intervalos na sequência; d) os *primers* de RNA estabeleceriam pontes de hidrogénio, originando estruturas complexas que poderiam interferir com a correcta formação da dupla hélice; e) a DNA ligase não ligaria os fragmentos de Okazaki, impedindo a conclusão da replicação. b, e
10. As helicases: a) são enzimas que quebram as pontes de hidrogénio existentes entre as duas cadeias da dupla hélice de DNA; b) participam no relaxamento da dupla hélice quando superenrolada; c) são o produto da expressão do gene *DnaB*; d) são específicas de organismos procarióticos; e) participam na replicação e na transcrição da molécula de DNA. a, c, e
11. As topoisomerasas: a) estão envolvidas no controlo do enrolamento do DNA; b) reduzem a tensão gerada pelo superenrolamento do DNA na frente do garfo de replicação; c) geram tensão na dupla hélice durante a sua replicação; d) resolvem o entrelaçamento das moléculas de DNA plasmídico após a replicação; e) religam as cadeias de DNA após o relaxamento da dupla hélice. a, b, d, e
12. A DNA polimerase I de *E. coli*: a) possui actividade polimerásica 3' – 5'; b) possui actividade exonucleolítica 5' – 3'; c) possui actividade exonucleolítica 3' – 5'; d) utiliza como precursores da sua actividade polimerásica desoxirribonucleótidos monofosfatados; e) utiliza como precursores da sua actividade polimerásica desoxirribonucleótidos trifosfatados. b, c, e
13. O replissoma: a) coordena a replicação simultânea de ambas as cadeias de DNA; b) refere-se ao complexo multiproteico assimétrico da DNA polimerase III; c) refere-se à maquinaria de replicação do DNA; d) tem a mesma função que o primossoma; e) é exclusivo dos organismos procarióticos. a, c
14. A replicação baseada no modelo θ ocorre predominantemente em moléculas de: a) DNA cromossómico circular; b) DNA cromossómico linear; c) DNA plasmídico; d) DNA mitocondrial; e) DNA de fagos filamentosos. a, c

Questões básicas

1. Qual a diferença entre replicação conservativa e semiconservativa?
R. A replicação conservativa é uma forma hipotética de síntese de DNA em que as duas cadeias-molde permanecem juntas mas ditam a síntese de duas cadeias novas de DNA, que então formam uma segunda hélice de DNA. Resultam então duas duplas hélices em que uma contém apenas DNA antigo e a outra apenas DNA novo. Verificou-se que esta hipótese não é correcta. A replicação semiconservativa é uma forma de síntese de DNA em que as duas cadeias molde se separam e cada uma dita a síntese de uma nova cadeia. O resultado origina duas duplas hélices, ambas contendo uma cadeia nova e uma cadeia antiga de DNA. Verificou-se ser esta a hipótese correcta.
2. Qual é a característica química da extremidade 3' da cadeia de DNA, que é essencial para o alongamento durante o processo de síntese? A mesma cadeia também pode ser alongada a partir da extremidade 5'? Justifique a sua resposta?
R. A extremidade 3' da cadeia de DNA possui um grupo hidroxilo (3'-OH), essencial para estabelecer a ligação fosfodiéster com o grupo 5'-P do nucleótido adjacente previamente inserido durante o processo de polimerização no sentido 5' – 3'. A cadeia não pode ser alongada a partir da extremidade 5' porque não existem DNA polimerases com actividade de síntese 3' – 5'.
3. Considerando as exigências em precursores nucleotídicos, pode uma cadeia de DNA ser sintetizada *in vivo*, apenas a partir dos quatro desoxirribonucleósidos trifosfatados? Porquê?
R. Não, porque a síntese da cadeia de DNA *in vivo* requer a síntese de um *primer* de RNA, sendo por isso também necessários os quatro ribonucleótidos.
4. Qual é a diferença química entre os grupos que são ligados pela DNA polimerase e pela DNA ligase?
R. A DNA polimerase, na sua actividade de síntese, liga o grupo 3'-OH da pentose do último nucleótido introduzido na cadeia de DNA nascente ao grupo α 5'-P do novo desoxirribonucleósido trifosfatado a ser introduzido na mesma cadeia. A DNA ligase une o grupo 3'-OH da pentose de um nucleótido na dupla cadeia de DNA ao grupo 5'-monofosfato do nucleótido imediatamente adjacente, localizado na mesma cadeia.
5. Num sintetizador de oligonucleótidos obteve as seguintes moléculas de DNA:
DNA 1 – 5' ACGTAAATCAATGATCCTGG 3'
DNA 2 – 5' TTTACGT 3'
DNA 3 – 5' GGATCATTG 3'

Posteriormente adicionou estas moléculas a tubos que continham DNA polimerase, tampão adequado à actividade desta enzima, dATP, dCTP, dGTP e dTTP. Indique em que tubo(s) a DNA polimerase sintetizou novas moléculas de DNA e escreva a(s) sequência(s) neo-sintetizada(s).

tubo A- DNA 1 + DNA 2

tubo B- DNA 1 + DNA 3

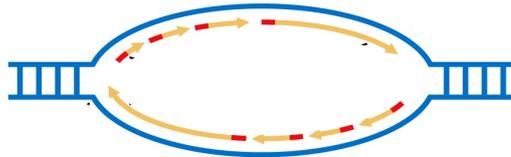
tubo C- DNA 2 + DNA 3

R. Só se sintetizou DNA no tubo B e a sequência neo-sintetizada é: 5' ATTTACGT 3'.

6. Na replicação do DNA, que características distinguem a cadeia líder da cadeia atrasada?

R. A cadeia líder é sintetizada de forma contínua, no sentido 5' – 3', a partir de um único *primer* de RNA inicial. A cadeia atrasada, sendo também sintetizada de 5' – 3', é no entanto sintetizada de forma descontínua, por intermédio dos fragmentos de Okazaki. Cada um destes segmentos neo-sintetizados inicia-se a partir de um *primer* de RNA.

7. A figura abaixo representa uma bolha de replicação segundo o modelo de replicação bidireccional.



a) Em cada garfo de replicação, assinale quais são as cadeias líder e atrasada, e identifique as extremidades 3' e 5'.

b) Se as cadeias de DNA fossem paralelas em vez de antiparalelas, a replicação também envolveria uma cadeia líder e uma cadeia atrasada? Explique, fundamentando a sua resposta.

R. Não. Ambas as cadeias seriam líderes ou atrasadas, dependendo do movimento do garfo de replicação, porque a actividade de síntese da DNA polimerase é no sentido 5' – 3'.

8. A replicação do DNA de *E. coli*, que possui apenas uma origem de replicação (*oriC*), reinicia-se quando se submete a célula a condições de crescimento rápido, isto é, antes de ter terminado a primeira etapa da replicação. Nestas circunstâncias, quantos garfos de replicação existirão? R. 6

9. Porque é que os eucariotas têm origens de replicação múltiplas?

R. Tipicamente as origens de replicação dos eucariotas distam de aproximadamente 40 000 nucleótidos. Isto permite que cada cromossoma replique rapidamente, em poucos minutos. Porque se não fossem as múltiplas origens de replicação, a replicação cromossómica levaria dias.

10. Qual é o papel da primase na replicação?

R. A primase é uma RNA polimerase. Sintetiza curtas moléculas de RNA ou *primers*, que fornecem os grupos 3'-OH necessários ao início da actividade de ligação dos desoxirribonucleótidos pela DNA polimerase durante a replicação do DNA.

11. Explique por que razão a replicação de DNA requer curtos *primers* de RNA e o que acontece aos *primers* durante a síntese das novas cadeias.

R. A razão prende-se com o facto de a DNA polimerase não ser capaz de iniciar a síntese de DNA. Todas as DNA polimerases identificadas até à data, iniciam a síntese de DNA a partir de um grupo 3'-OH livre que é fornecido por um *primer* de RNA e que é alongado por adição sucessiva de desoxirribonucleótidos à extremidade 3'. Posteriormente, o *primer* de RNA é degradado e substituído por uma extensão equivalente de DNA.

12. A sequência de bases, a seguir indicada, está presente numa molécula de DNA que formou uma bolha e iniciou o garfo de replicação.

3' AAATCGTCT**C**GTAAGTGAATC 5'

Neste DNA molde, a síntese do *primer* de RNA inicia-se a partir da base a negrito (**C**), isto é, a primeira base que a RNA polimerase copia é a citosina.

a) Se o *primer* de RNA constar de oito nucleótidos, qual é a sua sequência de bases?

b) No *primer* de RNA, que nucleótido contém um grupo terminal hidroxilo (-OH) livre, e qual é o grupo químico do nucleótido na outra extremidade do *primer*?

c) Se a replicação da outra cadeia, no DNA original, se processar de forma contínua, o garfo de replicação irá mover-se da direita para a esquerda ou da esquerda para a direita?

a) 5' GCAUCUUA 3'; b) É o ribonucleótido da extremidade 3', neste caso, a adenosina 5'-monofosfatada (adenilato). Na extremidade 5' do *primer*, o grupo químico é o fosfato, e neste caso trata-se de um ribonucleótido trifosfatado (a guanosina 5'-trifosfatada); c) Da direita para a esquerda.

13. Represente a molécula de DNA linear de um cromossoma eucariótico, durante a replicação, identificando:

- i. a origem
- ii. a polaridade das cadeias-molde e das cadeias neo-sintetizadas
- iii. as cadeias líderes e as cadeias atrasadas
- iv. os fragmentos de Okazaki
- v. a localização dos primers

- 14.** Uma preparação de DNA de cadeia dupla foi tratada com uma baixa concentração de DNase microcócica de modo a originar apenas algumas quebras ao longo de cada uma das cadeias. Poderão as moléculas resultantes servir de molde para a síntese de DNA utilizando a DNA polimerase I? Porquê?
- R. Sim, porque a DNA polimerase I tem actividades exonucleolítica e polimerásica 5' – 3'. Logo, a partir das quebras desfasadas numa das cadeias do DNA, a DNA polimerase I pode iniciar a remoção e a síntese dessa cadeia.
- 15.** Suponha que as duas cadeias simples de DNA, abaixo representadas, são incubadas conjuntamente em condições que permitem o emparelhamento de sequências complementares.
- 5' AAGTCTCTTTTTTAAAAAAA 3'
5' GAGACTT 3'
- Poderá a DNA polimerase II usar este DNA como molde para sintetizar novo DNA? Se sim, diga qual a sequência do DNA neo-sintetizado. E a DNA polimerase I?
- R. Nem a DNA polimerase I nem a DNA polimerase II poderão utilizar este DNA, na medida em que depois do correcto emparelhamento a extremidade 3'-OH livre não tem molde para que possa ocorrer síntese de DNA.
- 16.** Indique a principal razão pela qual os erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA são tão raros.
- R. Este facto é devido à actividade exonucleolítica 3' – 5', de revisão de provas, das principais enzimas processivas (DNA polimerase III em *E. coli* e DNA polimerase δ em eucariotas).
- 17.** Explique em que consiste a função de revisão de provas da DNA polimerase III e de enzimas eucarióticas equivalentes.
- R. A actividade de revisão de provas serve para reduzir os erros da replicação. Através da actividade exonucleolítica 3' – 5', a enzima remove os nucleótidos que durante a polimerização foram incorrectamente inseridos, e reinsere os nucleótidos correctos. Nos eucariotas, as DNA polimerases δ (nuclear), γ (mitocondrial) e possivelmente ϵ (nuclear, e que colabora com δ) também têm esta função.
- 18.** Qual é a função das proteínas SSB?
- R. A função das proteínas SSB reside na sua forte afinidade para DNA de cadeia simples, ligando-se de um modo cooperativo às cadeias de DNA que se formam no garfo de replicação durante a replicação do DNA. Assim, a função destas proteínas é estabilizar as cadeias simples, impedindo a sua renaturação.
- 19.** Como é que o replissoma copia ambas as cadeias de DNA, simultaneamente, na direcção de progressão do garfo de replicação e no sentido 5' – 3'?
- R. A hipótese mais aceite considera que o replissoma é dimérico, contendo duas unidades catalíticas, em que cada unidade é responsável pela síntese de uma das cadeias de DNA (a cadeia líder ou a cadeia atrasada). Pensa-se que a cadeia molde para a síntese da cadeia atrasada se dobra (*loop* de 180°) de forma a permitir a síntese simultânea e no sentido 5' – 3'.
- 20.** A replicação completa da molécula de DNA cromossómico de *E. coli* a partir de uma origem de replicação bidireccional única requer aproximadamente 30 minutos. Como é possível que em condições de cultura uma célula de *E. coli* se divida a cada 20 minutos?
- R. É possível porque cada novo ciclo de replicação tem início na origem a cada 20 minutos, isto é, quando o ciclo de replicação anterior ainda não está concluído. Logo, numa cultura de células de *E. coli* em divisão, a molécula de DNA transmitida a cada célula filha encontra-se já no processo de replicação de DNA.
- 21.** As moléculas de DNA circular, à semelhança da maioria dos cromossomas bacterianos, não apresentam o problema encontrado na replicação do DNA linear. Qual é esse problema?
- R. É o problema da manutenção das extremidades do DNA (telómeros).

3.1.2 Replicação em procariotas

Verdadeiro/Falso

1. A sequência *oriC* de *E. coli* é idêntica à origem de replicação do DNA cromossómico eucariótico. F
2. Nas bactérias, a mesma DNA polimerase sintetiza a cadeia líder e a cadeia atrasada do DNA. V
3. Nas bactérias, a mesma DNA polimerase sintetiza a cadeia líder e a cadeia atrasada do DNA, mas o mesmo não acontece nos eucariotas. F

Escolha múltipla

1. A síntese de DNA em *E. coli* inicia-se: a) após o corte de uma das cadeias da molécula de DNA; b) numa região que contém elementos repetitivos; c) após o desenrolamento do DNA nas origens de replicação; d) após a interacção da proteína DnaA com a sequência *oriC*; e) num único local do cromossoma. b, c, d, e
2. A sequência *oriC*: a) é a origem de replicação do DNA cromossómico dos eucariotas; b) é a origem de replicação do DNA cromossómico de *E. coli*; c) é a origem de replicação do DNA cromossómico de todas as espécies bacterianas; d) é a origem de replicação do DNA plasmídico que replica segundo o modelo θ ; e) é o local onde a replicação termina. b
3. A DNA polimerase I de *E. coli*: a) sintetiza o *primer* de RNA; b) remove os *primers* de RNA; c) preenche o intervalo deixado pela remoção dos *primers*; d) possui actividade polimerásica 5' – 3'; e) satisfaz todas as condições acima mencionadas. b, c, d
4. A DNA polimerase III de *E. coli*: a) é composta por várias subunidades; b) inclui uma subunidade que é responsável pela processividade da enzima; c) possui actividade exonucleolítica 5' – 3'; d) possui actividade exonucleolítica 3' – 5'; e) remove os *primers* de RNA. a, b, d
5. Qual o número de replicões em *E. coli*? a) nenhum; b) 1; c) mais do que 1; d) muitos; e) nenhuma das situações anteriores. b
6. Em que é que a replicação do DNA nos procariotas se assemelha à dos eucariotas? a) origens de replicação servem de pontos de início da replicação; b) síntese na direcção 5' – 3'; c) replicação contínua na cadeia atrasada e descontínua na cadeia líder; d) são necessários *primers* de RNA para se iniciar a replicação; e) replicação semiconservativa. a, b, d, e

3.1.3 Replicação em eucariotas

Verdadeiro/Falso

1. Em eucariotas, a actividade de primase está associada à DNA polimerase α . V
2. A DNA polimerase α não tem actividade de revisão de provas, nem remove os *primers* de RNA. V
3. A DNA polimerase α continua a polimerização a partir do *primer* de RNA, sendo depois substituída pela DNA polimerase δ . V
4. A DNA polimerase δ tem actividades exonucleolíticas 3' – 5' e 5' – 3'. F
5. A DNA polimerase γ é uma DNA polimerase mitocondrial. V
6. Actualmente, o que está descrito acerca da replicação em eucariotas é que o mesmo tipo de DNA polimerase sintetiza a cadeia líder (*leading*) e a cadeia atrasada (*lagging*) do DNA. F
7. A transcriptase reversa é uma DNA polimerase dependente de RNA. V
8. Durante a síntese de DNA, a telomerase alonga a extremidade 3' da cadeia molde, complementar da cadeia atrasada, nas extremidades da molécula. V
9. Uma das consequências da perda de actividade da telomerase é o encurtamento dos telómeros após cada ciclo de replicação. V
10. Durante a replicação do DNA, a telomerase actua na extremidade da cadeia atrasada, alongando a cadeia neo-sintetizada. F

Escolha múltipla

1. Considere um segmento do genoma de *Drosophila* com a seguinte sequência:

5' CCATGCTGACAGGGTACAATTGCA 3'
3' GGTACGACTGTCCCATGTAAACGT 5'

Qual dos seguintes *primers* utilizaria para replicar *in vitro* a cadeia de cima?

- A. 5' CCAUGCU 3'
- B. 5' CCATGCT 3'
- C. 5' TGCAATT 3'
- D. 5' UGCAUUU 3'
- E. 5' ACGTTAA 3'

R. c

2. Os fragmentos de Okazaki: a) iniciam-se com um *primer* de RNA; b) terminam a sua síntese imediatamente antes do *primer* de RNA do fragmento que irá ser sintetizado; c) terminam a sua síntese imediatamente antes do início do *primer* de RNA do fragmento previamente sintetizado; d) são ligados pela DNA ligase, após substituição do *primer* de RNA, quer em procariontes quer em eucariotas; e) são ligados pela DNA ligase, que estabelece a ligação entre a extremidade 5' de um fragmento e a extremidade 3' do fragmento seguinte. a, c, d
3. Em eucariotas, a DNA polimerase α : a) não tem actividade exonucleolítica 3' – 5'; b) tem actividade polimerásica 5' – 3'; c) tem actividade exonucleolítica 5' – 3'; d) é a principal polimerase envolvida na replicação do DNA; e) participa na síntese das cadeias líder e atrasada. a, b, e
4. Em eucariotas, a DNA polimerase δ : a) não tem actividade exonucleolítica 5' – 3'; b) tem actividade polimerásica 5' – 3'; c) substitui a actividade polimerásica da DNA polimerase α ; d) é a principal polimerase envolvida na replicação do DNA; e) contém actividade de primase. a, b, c, d
5. Qual o número de replicões de um cromossoma humano? a) nenhum; b) 1; c) maior que 1, mas menor que 10; d) indeterminado; e) nenhuma das situações anteriores. d

Questões básicas

1. Quando é que o processo replicativo de um cromossoma eucariótico requer a actividade de transcriptase reversa?
R. A actividade de transcriptase reversa, realizada pela telomerase, é requerida para a replicação dos telómeros. Esta enzima é uma ribonucleoproteína com actividade de transcriptase reversa, na medida em que promove a síntese de DNA, tendo como molde uma molécula de RNA transportada pela própria enzima. A molécula de RNA, que serve de molde para a síntese de DNA, tem a particularidade de conter sequências repetitivas, específicas da espécie.
2. Por que razão o DNA telomérico não pode ser replicado através de um mecanismo normal de replicação de DNA?
R. Porque o DNA telomérico apresenta sempre uma extremidade 3' projectada, na cadeia que serve de molde à síntese da cadeia atrasada, necessitando da intervenção de outras enzimas específicas para a sua correcta replicação, nomeadamente da telomerase.
3. Como é que os telómeros, localizados nas extremidades dos cromossomas eucarióticos, são replicados?
R. Os telómeros são replicados por intermédio da telomerase. Nas regiões teloméricas, isto é, nas extremidades dos cromossomas lineares, a cadeia que serve de molde à síntese da cadeia atrasada apresenta extremidades 3' projectadas, cuja origem poderá ser explicada pela remoção, na cadeia atrasada, das sequências de RNA sintetizadas pela primase. A telomerase permite então alongar estas extremidades, sintetizando DNA a partir do seu próprio molde de RNA. O DNA neo-sintetizado, segundo a hipótese mais aceite, dobra-se sobre si mesmo, reassociando-se ao próprio DNA molde recém sintetizado. A síntese de DNA prossegue no sentido 5' – 3', por acção de uma DNA polimerase, até ao primeiro nucleótido da extremidade 5' da cadeia atrasada.

3.2 Mutação e reparação do DNA

Verdadeiro/Falso

1. Uma mutação é uma alteração hereditária num gene ou cromossoma. V
2. A deleção de uma base na sequência codificante de um gene altera a grelha de leitura do gene. V
3. A inserção de um nucleótido na região do promotor gera uma mutação *frameshift*. F
4. A inserção de um nucleótido no RBS (*Ribosome Binding Site*) gera uma mutação *frameshift*. F
5. Os desvios tautoméricos nas bases que constituem os ácidos nucleicos são uma das causas das mutações pontuais. V
6. As mutações pontuais podem originar mutações *nonsense*. V
7. As inserções e as deleções resultam muitas vezes em mutações *missense*. F
8. A maioria das mutações silenciosas afecta a 1ª base do códon (5' – 3'). F
9. As mutações supressoras de mutações *nonsense* envolvem sobretudo alterações no anticódon da molécula de tRNA. V
10. A supressão intergénica é uma alteração mutacional num segundo gene independente, que elimina o fenótipo mutante. V
11. As mutações ocorrem na sequência peptídica. F

12. A taxa de mutação é a probabilidade de um gene sofrer uma mutação numa única geração. V
13. Numa população bacteriana, as mutações introduzidas pela luz UV ocorrem aleatoriamente. V
14. A lisina e a arginina são dois aminoácidos que possuem um grupo R semelhante (ambos são resíduos básicos), com um comportamento bioquímico semelhante. Uma mutação resulta na substituição da lisina pela arginina, mas não se deteta qualquer alteração no fenótipo da proteína em causa porque o organismo tem *codon bias* para estes dois aminoácidos. F

Escolha múltipla

1. Uma mutação *nonsense*: a) converte um codão codificante num codão *stop*; b) converte um codão *stop* num codão codificante; c) converte um aminoácido noutra aminoácido devido à substituição de um nucleótido; d) gera uma proteína truncada; e) afecta a transcrição do gene. a, d
2. Quais dos seguintes agentes são mutagénicos? a) UV; b) NTG (nitrosoguanidina); c) transposições; d) cloreto de potássio; e) todos os agentes mencionados. a, b, c
3. Muitas vezes as mutações ocorrem como resultado de substituição de bases. As causas mais comuns da substituição de bases consistem em: a) desvios tautoméricos; b) erros mitóticos; c) erros meióticos; d) inserções de bases; e) deleções de bases. a
4. Um desvio tautomérico que causa a substituição de uma purina por outra purina chama-se: a) transversão; b) translocação; c) transição; d) deleção; e) inversão. c
5. Quando um acontecimento mutacional leva à substituição de um codão por outro codão do mesmo aminoácido, a mutação resultante é conhecida como: a) *frameshift*; b) transição; c) transversão; d) deleção; e) silenciosa. e
6. Qual dos seguintes produtos pode causar mutações *frameshift* numa molécula de DNA em replicação? a) 5-bromouracilo; b) laranja de acridina; c) 2-amino-purina; d) ácido nitroso; e) hidroxilamina. b
7. A reparação dos locais apurínicos ocorre nos nucleótidos da cadeia de DNA que: a) sofreram metilação; b) sofreram desaminação; c) perderam a sua base; d) estão localizados no *D-loop*; e) foram sujeitos a um tratamento com uma solução básica de baixa molaridade (ex. NaOH). c, e
8. Em genética diz-se: a) mutação de DNA; b) proteína mutante; c) mutação numa proteína; d) estirpe mutante; e) gene mutante. a, b, d, e
9. Num gene, um dos codões da alanina é GCU. Se houver uma mutação neste codão dando origem ao codão CCU, que acontecimento terá de ocorrer para que a alanina volte a ser codificada? a) existir um *codon bias*; b) uma mutação reversa; c) existir um tRNA supressor de mutações *nonsense*; d) existir *whobble* para este codão; e) todos os acontecimentos mencionados. b
10. Quando numa região codificante, próximo do local onde ocorreu uma mutação, ocorre a inserção de uma única base, e o fenótipo é revertido, qual das seguintes mutações ocorreu inicialmente? a) deleção de 10 bases; b) deleção de duas bases; c) inserção de duas bases; d) mutação *missense*; e) mutação *nonsense*. c
11. Quando numa região codificante, próximo do local onde ocorreu uma mutação, ocorre a inserção de uma única base, e o fenótipo é revertido, diz-se que ocorreu: a) uma verdadeira reversão; b) uma supressão intragénica; c) uma supressão intergénica; d) uma supressão de mutação *nonsense*; e) uma reversão de mutação *nonsense*. b

Questões básicas

1. Expôs-se uma cultura de células de levedura à luz UV. As células foram plaqueadas e uma caixa foi colocada no escuro e a outra à luz. Na primeira caixa foram recuperadas 5 colónias e na segunda 440 colónias. Explique estes resultados e descreva o processo subjacente.

R: As células na presença de luz são capazes de reparação dos dímeros de pirimidina induzidos por UV (fotorreativação). Neste processo, a fotoliase liga-se aos dímeros e usa a energia da luz azul para clivar as ligações químicas que se estabelecem entre as pirimidinas.

2. Porque é que a perda de função de proteínas ocorre maioritariamente devido a mutações *frameshift* e não a mutações *missense*?

R. Uma mutação *missense* altera apenas um único codão e conseqüentemente, um aminoácido na proteína. Esta alteração pode ou não afectar a função proteica, dependendo da importância desse aminoácido particular na estrutura e função da proteína. Em contrapartida, uma mutação *frameshift* irá alterar todo o código genético que se segue, podendo por este motivo implicar a substituição de um número variável de aminoácidos. Dependendo do local onde

ocorreu a mutação, as consequências poderão ser mais ou menos severas, como por exemplo a terminação precoce da tradução devido à ocorrência prematura de um codão *stop*.

3. A seguinte sequência de bases representa parte da cadeia de DNA que é complementar do mRNA.

3' AGGTCCAAGCTAAAGCTACGT . . . 5'

- Especifique a sequência do mRNA e assinale as respectivas extremidades 3' e 5'. Indique os aminoácidos resultantes da tradução deste mRNA?
- Qual o efeito da inserção de uma adenina nesta cadeia, após a primeira guanina (3' – 5')? Escreva a sequência de aminoácidos do péptido mutante.

R: a) DNA 3' TAC GCC AAA CTA AAG CTA CGT . . . 5'
mRNA 5' AUG CGG UUU GAU UUC GAU GCA . . . 3'
Polipéptido Met – Arg – Phe – Asp – Phe – Asp – Ala

b) DNA 3' TAC GAC CAA ACT AAA GCT ACG T . . . 5'
mRNA 5' AUG CUG GUU UGA UUU CGA UGC A . . . 3'
Polipéptido Met – Leu – Val – Stop

O péptido mutante é truncado, possuindo apenas três aminoácidos, e a arginina e a fenilalanina foram substituídas por leucina e valina, respectivamente. O codão *nonsense* localiza-se no 4º codão.

4. Explique que tipo de mutações no *locus* do gene da hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HPRT) podem estar na origem dos seguintes fenótipos:

- Uma quantidade normal de HPRT, mas sem actividade enzimática
- Ausência de detecção de mRNA
- Uma quantidade normal de mRNA, mas ausência de proteína
- Padrão de restrição alterado no *locus* HPRT, sem alteração da actividade enzimática

- R. a) Uma mutação que resulta na substituição de um aminoácido importante para a função enzimática.
b) Deleção génica ou uma mutação que afecta a actividade do promotor.
c) Mutação nonsense que gera uma proteína truncada instável, ou uma mutação que afecta a tradução da mensagem.
d) Mutação numa sequência de restrição localizada no *locus* do gene HPRT, que altera o padrão de restrição, mas não afecta a proteína.

5. A metilase Dam metila a adenina na sequência GATC. Poderá a frequência de mutações aumentar em estirpes de *E. coli* com mutação no gene *dam*? Justifique.

R. Sim, porque o sistema de reparação MutHLS se baseia no reconhecimento da cadeia não metilada vs metilada para identificar qual das cadeias deve ser reparada.

6. Em teoria, a desaminação quer da citosina quer da 5-metilcitosina conduz a uma mutação. Contudo, substituições de nucleótidos produzidas pela perda de um grupo amino da citosina são raramente observadas, e as resultantes da perda de um grupo amino da 5-metilcitosina são relativamente frequentes. Qual é a explicação para este fenómeno?

R. A perda de um grupo amino pela citosina gera uracilo, que é removido do DNA por uma enzima de reparação específica (uracilo glicosilase). Porém, a desaminação da 5-metilcitosina produz timina, que sendo uma base normal do DNA, não é removida, resultando numa mutação.

7. Como poderá um organismo que contém uma mutação letal e sensível à temperatura, ser homocigótico?

R. Se crescer sempre à temperatura permissiva.

8. Em *E. coli*, quais são os dois processos de reparação dos dímeros de pirimidinas que ocorrem, por mutação, no DNA?

9. Quando as mutações envolvem substituições *missense*, a frequência de mutação directa (do alelo selvagem para o alelo mutante) é sempre maior do que a frequência de mutação reversa. Explique porquê.

R. Porque para uma mutação, que ocorreu de um modo provavelmente aleatório, deixar de ser *missense* terá de ocorrer uma mutação reversa no mesmo codão e no mesmo nucleótido. A probabilidade de isto acontecer, tendo em consideração a taxa de mutação e a especificidade da mutação reversa, é muito baixa.

10. Com base no conhecimento do código genético, indique a razão pela qual a maioria das mutações silenciosas afecta a 3ª base do codão.

R. A razão pela qual a maioria das mutações silenciosas afecta a 3ª base do codão prende-se com o facto de o código genético ser degenerado.

11. O que é a mutagénese sítio-específica? Como é que este processo de mutagénese pode ter como alvo genes específicos?

R. A mutagénese sítio-específica refere-se à estratégia de mutagenização de uma sequência específica de DNA, podendo por este motivo ter como alvo genes específicos. Pode ser realizada por PCR utilizando, por exemplo, oligonucleótidos específicos da sequência que se pretende alterar.

12. Indique dois fenótipos de mutações que são particularmente úteis em análise genética de bactérias.

R. Os dois fenótipos são: fenótipo de auxotrofia, em que os mutantes não crescem em meio mínimo porque a mutação os torna incapazes de produzir um componente essencial; fenótipo condicional, em que os mutantes apenas se podem replicar em condições específicas (permissivas) mas não sob condições não permissivas ou restritivas. É o caso dos mutantes termosensíveis e dos mutantes letais.

13. É fundamental que a translocação do ribossoma decorra com grande exactidão, de forma a manter a grelha de leitura correcta. Contudo, algumas vezes ocorrem erros de leitura do mRNA (*frameshift*). Compare o impacto que tem na célula um ribossoma que introduz frequentemente erros de *frameshift* (ribosome *frameshift*) no mRNA de um determinado gene, com o impacto de uma mutação *frameshift* no mesmo gene.

R. O ribossoma poder introduzir frequentemente erros de leitura do mRNA, mas o seu efeito não tem o carácter constante das mutações génicas que darão sempre origem a mRNAs que contêm a mutação *frameshift*.

14. A depurinação espontânea é uma causa frequente de danos no DNA, mas a grande maioria dessas lesões é reparada. Como se processa a sua reparação?

15. O sistema de reparação *mismatch* (MMR – MuthLS) pode detectar erros de emparelhamento que ocorrem durante a replicação do DNA e pode corrigi-los após a replicação. Em *E. coli*, como é que este sistema usa a metilação do DNA para determinar qual a base incorrecta?

R. Para distinguir a cadeia molde da cadeia recentemente sintetizada, o sistema tira partido do atraso normal da metilação da cadeia neo-sintetizada na sequência GATC, após a replicação. Durante um intervalo de alguns minutos, a nova cadeia mantém-se não metilada, o que permite ao sistema reconhecer e corrigir a base errada.

16. Por que é que o sistema SOS tem tendência para o erro (*error prone*)?

R. A reparação SOS que é encontrada em *E. coli* e em bactérias relacionadas é um conjunto complexo de processos que inclui um sistema que contorna os dímeros de pirimidina ou outras distorções do DNA durante a replicação (*bypass*), mas com um elevado custo na fidelidade deste processo. Embora se formem cadeias de DNA intacto, estas são muitas vezes defectivas. Por esta razão o sistema de reparação SOS tem tendência para o erro. Uma característica importante deste sistema é que não está sempre activo, sendo induzido pelos danos do DNA.

3.3 Recombinação genética e molecular

3.3.1- Transferência de informação génica em bactérias: conjugação, transformação e transdução

Verdadeiro/Falso

- 1.** A integração do genoma do fago λ depende apenas dos locais de integração do DNA do hospedeiro. F
- 2.** No ciclo lisogénico de um bacteriófago virulento, o DNA fágico recombina com o cromossoma do hospedeiro. V
- 3.** No ciclo lítico de um bacteriófago virulento a bactéria hospedeira transmite o bacteriófago às células filhas. F
- 4.** Um fago temperado significa que o seu ciclo de vida é lisogénico. V
- 5.** A transformação é um tipo de transferência génica encontrada em bactérias, em que uma molécula de DNA exógeno entra na célula bacteriana, podendo ou não integrar-se no DNA genómico. V
- 6.** A transdução é um tipo de transferência génica encontrada em bactérias, em que o DNA é transferido de uma célula bacteriana para outra por intermédio de um bacteriófago. V
- 7.** A inserção do plasmídeo F no cromossoma bacteriano ocorre numa IS. V
- 8.** A recombinação sítio-específica é o mecanismo pelo qual o bacteriófago λ se integra no cromossoma do hospedeiro. V
- 9.** Numa estirpe *recA*⁻, a transferência do DNA é afectada mas a recombinação não. F
- 10.** Numa estirpe *recA*⁻, a transferência do DNA não é afectada mas a recombinação sim. V
- 11.** A integração do DNA do fago λ no genoma do hospedeiro faz-se por recombinação homóloga. F

Escolha múltipla

1. O processo molecular pelo qual as células receptoras adquirem genes a partir de moléculas de DNA livres no meio circundante denomina-se: a) transdução especializada; b) transdução generalizada; c) transformação; d) recombinação; e) conjugação. c
2. O processo molecular pelo qual o DNA é transferido de uma célula bacteriana dadora para uma célula receptora, por contacto célula a célula, é conhecido como: a) transdução especializada; b) transdução generalizada; c) transformação; d) recombinação; e) conjugação. e
3. A integração do DNA fágico no cromossoma bacteriano depende de: a) uma recombinase sítio-específica codificada pelo fago; b) uma recombinase sítio-específica codificada pelo genoma do hospedeiro; c) uma DNA polimerase codificada pelo genoma do hospedeiro; d) uma topoisomerase codificada pelo fago; e) várias proteínas, algumas das quais codificadas pelo fago e outras pelo genoma do hospedeiro. A
4. Numa estirpe de *E. coli recA⁻*, é afectada a: a) transferência de plasmídeos por conjugação; b) integração de plasmídeos no DNA cromossómico; c) reparação do DNA após tratamento com um agente mutagénico; d) replicação do DNA; e) transcrição do gene *recBCD*. b
5. No modelo de Holliday, de recombinação homóloga, duas moléculas de DNA de cadeia dupla com quebras entram em contacto para formar regiões que podem ser substratos para reparação de emparelhamentos errados e conversão génica, e são conhecidos como: a) garfos de replicação; b) heterodúpliques; c) primossomas; d) fragmentos de Okazaki; e) regiões *chi*. b

Questões básicas

1. Descreva as diferenças entre a integração do genoma do fago λ e do plasmídeo F no cromossoma de *E. coli*.
R. A integração do genoma do fago λ requer um local *att* específico e é integrado por via de uma enzima fágica especializada, a integrase, enquanto que o plasmídeo F está apto a integrar-se virtualmente em qualquer local do cromossoma da bactéria com o qual apresente uma considerável homologia, como por exemplo sequências de inserção (IS), ou se for F' através dos segmentos de DNA cromossómico com os quais apresenta homologia, sendo o mecanismo de recombinação em si dependente de *recA*.
2. Foi descoberto um fago mutante a que faltava um gene funcional da integrase. Poderá este mutante funcionar ainda como fago de transdução especializada? Poderá ainda infectar *E. coli*? Explique.
R. Este mutante poderá ainda infectar *E. coli* e completar o ciclo lítico. Contudo, não seria capaz de transdução especializada, porque este mecanismo requer integração fágica no local *att*. Esta etapa requer a actividade da enzima integrase.
3. É correcto dizer-se que a estrutura de Holliday e um quiasma correspondem ao mesmo fenómeno molecular?
R. Não. Um quiasma é uma estrutura citológica observada como uma quebra aparente e reunião entre cromátídios não irmãos num bivalente (dois cromossomas). Resulta de uma troca física entre ambas as cadeias de DNA nestes cromátídios. Uma estrutura de Holliday, por outro lado, é uma configuração ultramicroscópica cruzada, resultante da troca de uma cadeia polinucleotídica simples entre dois DNAs de cadeia dupla. Só se ocorrer a resolução da estrutura de Holliday é que ambas as cadeias de DNA ficam com segmentos trocados.