

Questões de Biologia Molecular I BMM600 – Replicação do DNA

Questões a serem discutidas em grupos de no máximo 4 alunos. Entregar relatório.

1. O fragmento de DNA representado na Figura 1 é dupla fita, porém tem uma lacuna em uma delas, como indicado. A polaridade da fita contínua também é indicada. Em que extremidade da molécula de DNA o fosfato mostrado na figura? E que extremidade está o OH? Esta molécula poderia funcionar como substrato para a DNA polimerase de *Escherichia coli*? Explique por que e qual seria a extremidade onde pode haver síntese de DNA?

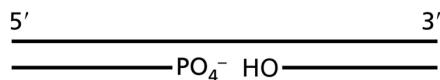


Figura 1. Fragmento de DNA com lacuna em uma das fitas.

2. Representamos na figura 2A abaixo, uma molécula de DNA em processo de replicação, com as indicações de polaridade da molécula. Na figura 2B temos 4 precursores possíveis. Responda: a) qual a posição da figura 2A deve ser incluído o novo nucleotídeo precursor? b) indique quais entre os 4 precursores da figura 2B podem de fato ser incorporados no DNA. Qual a principal diferença entre os precursores 1 e 2? Os dois podem ser incorporados por uma DNA polimerase? Por quê? c) quais as consequências de incorporação dos precursores B3 e B4? Por quê?

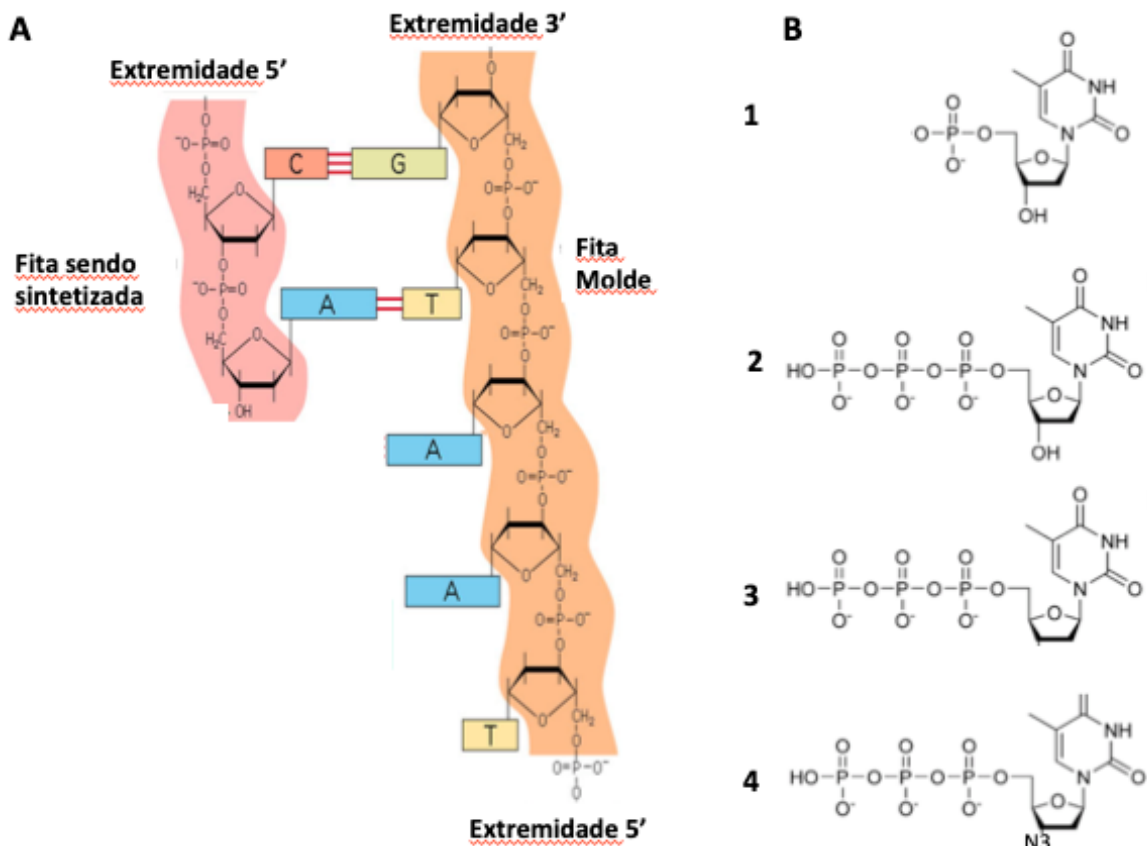


Figura 2. Replicação de uma molécula de DNA (A) e potenciais precursores (B)

3. Na figura 3 são mostradas duas estruturas de análogos do nucleotídeo citidina.

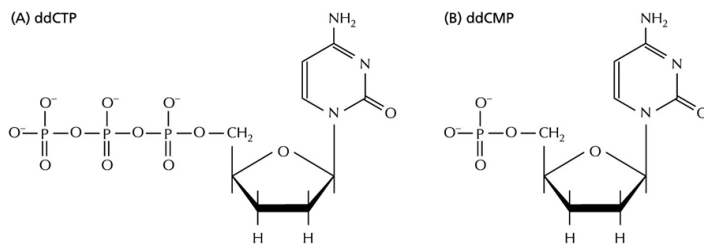


Figura 3. Estruturas de didesoxicitidina trifosfato (ddCTP) e monofosfato (ddCMP)

- O que você esperaria se ddCTP fosse adicionado em excesso (em relação a dCTP) a uma reação de polimerização de DNA com DNA polimerase humana? Por quê?
 - Por que há necessidade de adição em excesso para que isso ocorra?
 - E se fosse adicionado ddCMP?
4. Para o estudo de atividade exonuclease 3'-5' editorial da DNA polimerase I de *E.coli*, você prepara um substrato artificial com uma fita molde poli(dA) e uma fita poli(dT) como primer. A fita poli(dT) contém alguns nucleotídeos dT marcados radioativamente (^{32}P), seguidos com dC marcados com ^3H , na extremidade 3', como ilustrado na figura 4.

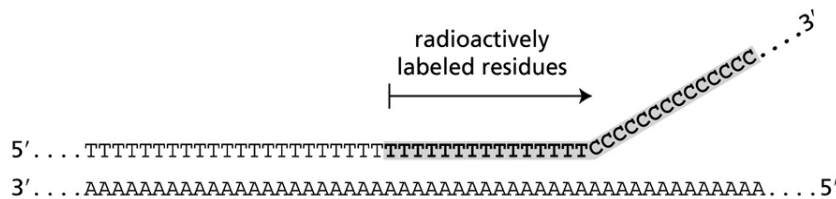


Figura 4. Substrato artificial para estudo da atividade exonuclease 3'-5' editorial da DNA polimerase I.

Você mede perda de nucleotídeos marcados na presença de dTTP (e, portanto, com síntese de DNA) ou na ausência de dTTP (sem síntese de DNA possível). Os dados estão apresentados na figura 5.

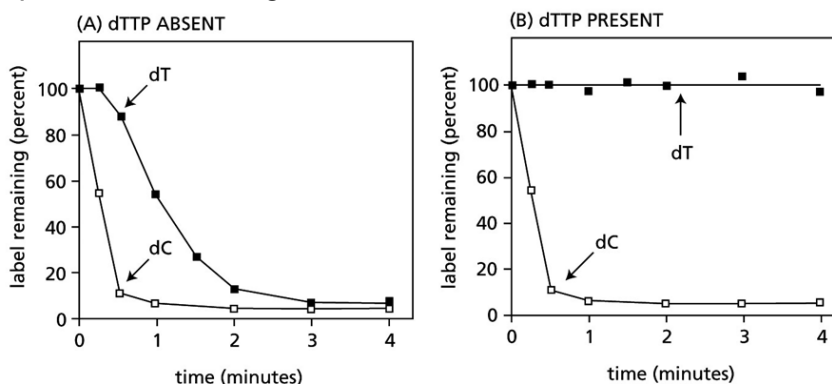


Figura 5. Medida de atividade exonuclease 3'-5', na ausência (A) ou presença (B) de dTTP.

- Por que são empregados isótopos diferentes para marcar o dCs e dTs?
- Por que em (A) os dCs são removidos mais rapidamente do que os dTs?
- Em (B) os dTs não são removidos na presença de dTTP, mas os dCs sim. Por quê?
- Se você incluísse dCTP na reação (B), você esperaria resultados diferentes? Explique.

5. Vários mutantes de *Escherichia coli* foram identificados como sendo sensíveis a irradiação UV, em relação à bactéria selvagem. Entre eles encontramos aqueles defectivos nos genes *UvrA*, *UvrB*, *UvrC* e *RecA*. Duplos mutantes afetando dois genes *Uvr*, não aumentam a sensibilidade da bactéria à luz UV, por exemplo, o duplo mutante *uvrA.uvrC* não é mais sensível do que a bactéria *uvrA*. Entretanto a combinação do duplo mutante *uvrA.recA* é ultra sensível a luz UV (ver figura 6). Dê uma explicação para a diferença de fenótipos observada nesses duplos mutantes.

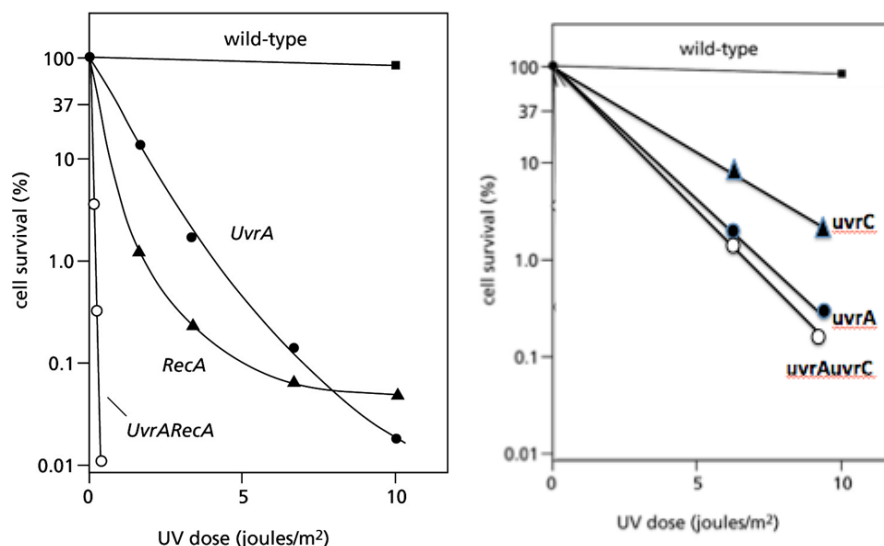


Figura 6. Sobrevivência de cepas bacterianas deficientes em genes relacionados a reparo de DNA após irradiação com luz UV. Os genes mutados, assim como as doses de UV, são indicados na figura.

6. Uma sequência de DNA que codifica uma proteína pode sofrer mutações e isso pode afetar a tradução de proteína. Imagine a sequência abaixo e identifique o que ocorre se a base sofre uma mutação no local indicado pela seta. Identifique o que ocorre na sequência proteica em cada um dos casos:
- transição G→A (nucleotídeo 16)
 - deleção de um nucleotídeo
 - inserção de um nucleotídeo
 - e se a transição ocorresse no 3º nucleotídeo desse mesmo códon, o que aconteceria?



atgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgg
M I E Q D G L H A G S P A A W