

Genética Molecular- Comisión B (turno mañana)

Guía de Problemas 2: Reparación y Recombinación del DNA

1. Indicar la o las respuestas correctas.

1.1. La desaminación de bases puede causar mutaciones porque

- a) G desaminada se parece estructuralmente a U
- b) G desaminada se aparea con U
- c) C desaminada se parece estructuralmente a A
- d) C desaminada se aparea con A

1.2. El mecanismo de escisión de bases (BER)

- a) se usa sólo para bases que se han desaminado
- b) usa las DNA glicosilasas para generar un sitio apurínico o apirimidínico
- c) extrae de 10-15 nucleótidos
- d) necesita de la acción de la DNA Pol III de *E.coli*
- e) tiene lugar en procariotes y no en eucariotes.

1.3. Una cepa bacteriana conteniendo una proteína mutante MutH que se une igualmente al DNA metilado y al no metilado.

- a) repara una base mal apareada predominantemente en el nucleótido tipo salvaje
- b) repara una base mal apareada predominantemente en el nucleótido mutante
- c) repara una base mal apareada la mitad del tiempo en el nucleótido tipo salvaje y la otra mitad del tiempo en el nucleótido mutante
- d) no puede reparar un apareamiento erróneo.

1.4. ¿Cuál de las siguientes actividades enzimáticas no participa en la reparación del apareamiento erróneo (*mismatch repair*)?

- a) Helicasa
- b) Exonucleasa de cadena simple
- c) DNA ligasa
- d) Primasa

2. Compare los mecanismos de reparación por escisión y la fotorreactivación para corregir los dímeros de timina inducidos por UV. Explique cómo podría diferenciar ambos mecanismos empleando ³H timidina

3. Un cultivo de fibroblastos normales se expone a radiación UV; se toman alícuotas a distintos tiempos, se extrae el DNA y se lo centrifuga en un gradiente de sacarosa alcalino. Luego de la ultracentrifugación se fraccionan los gradientes y se determina la A_{260nm} de cada una de las fracciones en función de la distancia desde el fondo del tubo.

a. Dibuje el/los gráfico/s que se obtendría/n en las muestras sacadas a los 5 minutos y a las 12 hs.

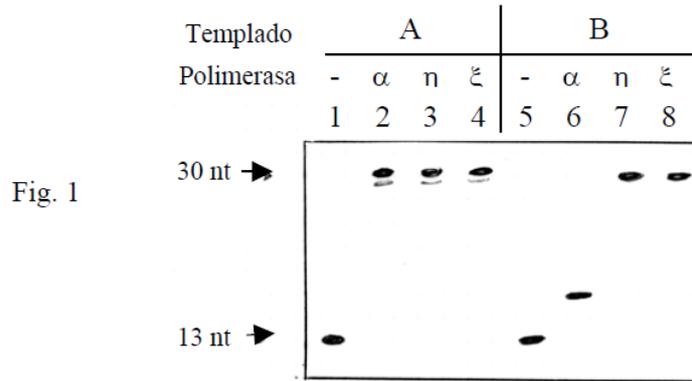
b. Los pacientes que padecen *Xeroderma pigmentosum* poseen mutaciones en alguno de los genes que intervienen en la reparación por escisión de nucleótido (NER). Se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos de estos pacientes y trataron como en el inciso a). ¿A cuál de las curvas que Ud. mostró en el inciso a) se parecería el gráfico obtenido en este caso?

4. Se está estudiando la actividad de dos DNA polimerasas (η - eta- y ξ -xi-) identificadas en células humanas, y de las que se sabe que tienen cierto papel en la replicación de DNAs dañados por UV. Se compara su actividad con la de la DNA pol α . Se diseñó el siguiente experimento:

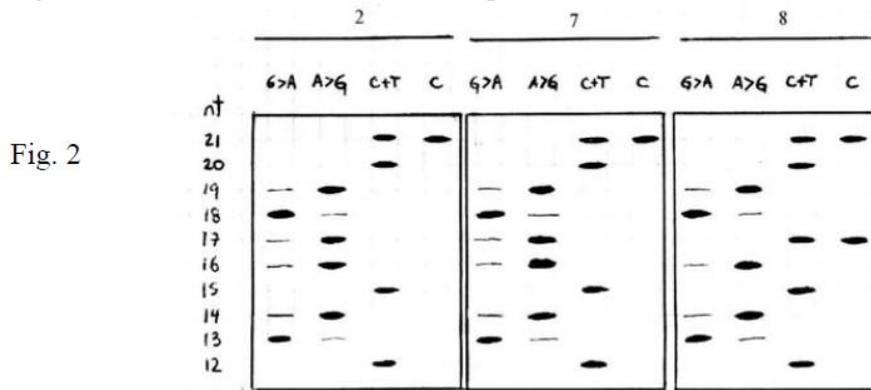
Primer (marcado en 5' con ³² P)	5' CACTGACTGTATG
Templado A (no dañado)	3' GTGACTGACATACTATTCTAGCACTGCTCT 5'
Templado B (dañado)	3' GTGACTGACATACTA <u>TT</u> CTAGCACTGCTCT 5'

dímero de T

El primer marcado con ³²P fue incubado con los templados A o B, en ausencia (-) o presencia de DNA pol α, η o ξ, y en presencia de todos los nucleótidos trifosfato. El resultado se muestra en la Fig. 1.



Luego de la reacción se aislaron los productos de 30 nucleótidos de las calles 2, 7 y 8 y se los secuenció por el método de Maxam y Gilbert. El resultado se muestra en la Fig. 2.



a. Describa la actividad de las tres polimerasas, tanto sobre el templado normal como sobre el templado que contenía un dímero de T (interprete para su respuesta los resultados de ambas figuras)

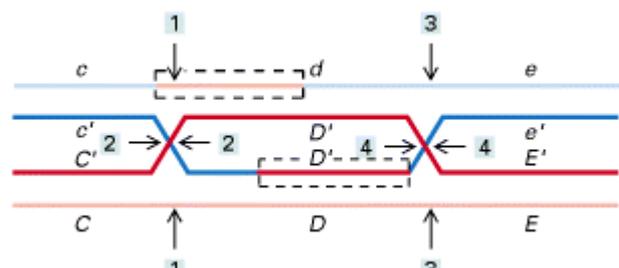
b. Cultivos de células *wild type*, mutantes en pol η (mutante I), mutantes en pol ξ (mutante II) o mutantes en pol η y ξ (mutante III) fueron irradiadas con UV y se cuantificó el % de supervivencia:

células	%
wild type	60
mutante I (mut. η)	35
mutante II (mut. ξ)	55
mutante III (mut. η y ξ)	5

¿Puede sugerir una explicación para el hecho de que la mutante II presente mayor resistencia a la UV que la mutante I? ¿Cómo explica el resultado con la mutante III?

5. Indicar la o las respuestas correctas.

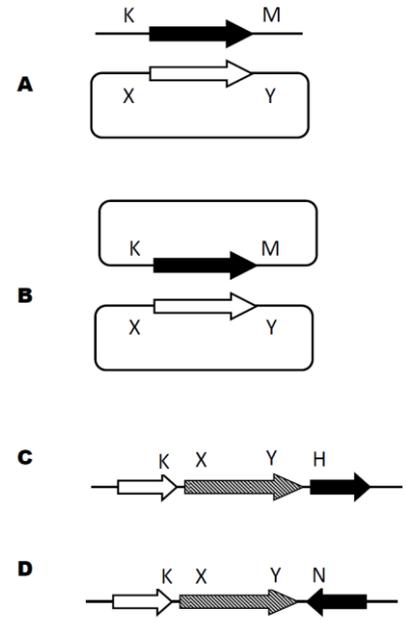
Los cortes en los sitios 1 y 3 de la siguiente figura resultarán en un fragmento de DNA conteniendo la siguiente combinación de alelos



- a. c-D-E.
- b. c-d-e.
- c. c-D-e.
- d. c-d-E.

¿Darán como resultado una molécula recombinante?

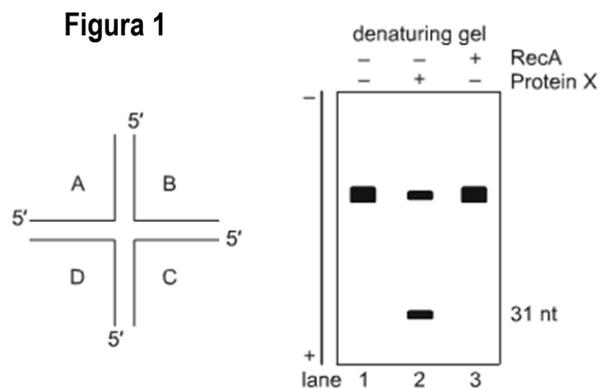
6. Esquemas de moléculas de DNA doble cadena. Las flechas blancas y negras corresponden a la misma secuencia nucleotídica repetida en dos moléculas o en la misma molécula de DNA (las puntas de las flechas indican la orientación de dicha secuencia en cada caso). Las letras sobre los esquemas deben servir para ubicar los diferentes tramos en los productos de RH (recombinación homóloga)



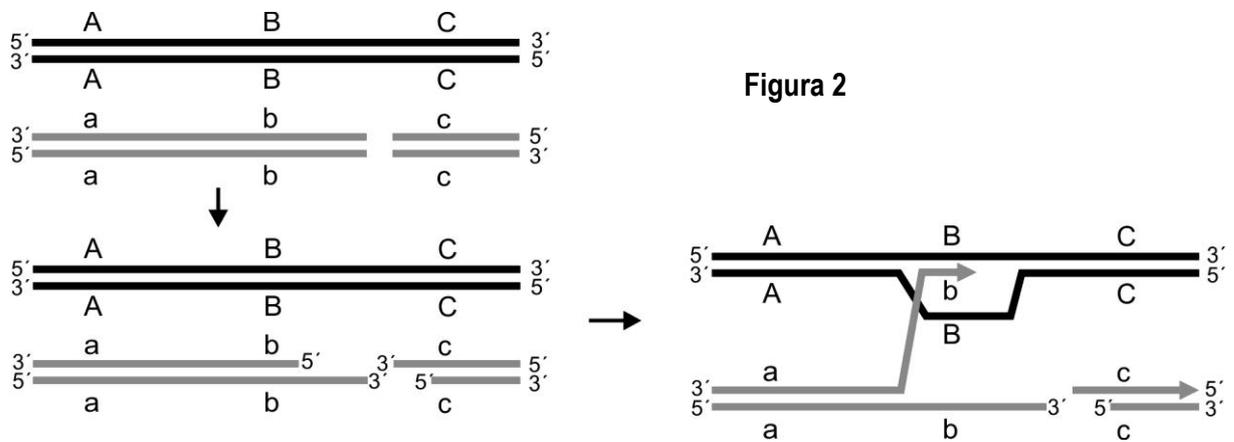
Mantenga los colores en los esquemas de los productos para poder diferenciar el origen de las secuencias.

- Dibuje los productos de recombinación entre las regiones homólogas de las moléculas representadas en la figura **A**
- ídem en la figura **B**
- ídem en la figura **C**
- ídem en la figura **D**
- Escriba las secuencias de 5 pares de bases correspondientes al esquema **D** (solo un ejemplo que se adecue al criterio de **secuencia repetida**)

7. Un grupo de investigadores ha caracterizado una proteína humana asociada a la resolución del intermediario de Holliday. Luego de purificar dicha proteína, la usaron en un ensayo con el sustrato que se muestra en la **figura 1a**. Cada una de las 4 hebras del ADN (A, B, C, D) tiene 60 nucleótidos de longitud y sólo la hebra A está marcada con 5'-³²P. Los investigadores realizaron 3 reacciones con el sustrato de ADN, incubado sin proteínas (1), con la proteína purificada (2) y con RecA como control. Los productos de cada reacción fueron luego corridos en distintas calles en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. La **Figura 1b** muestra una autorradiografía del gel (1, 2 y 3 indican los tratamientos antes mencionados)



- Analice los datos experimentales y proponga una función para la proteína purificada.
- La **figura 2** representa las etapas de la recombinación homóloga por rotura de doble hebra, aunque este esquema contiene errores. Enumere el/los error/es y diga cómo afecta/n este/os error/es en el proceso de recombinación y cómo sería el esquema correcto.



- ¿Cuáles son las diferencias entre la recombinación homóloga y la recombinación sitio específica?

8. Escriba el resultado de la recombinación sitio específica entre las secuencias sombreadas pertenecientes a la misma molécula de DNA. Escriba solamente la secuencia de la hebra superior (5'-3') resultante:

a. 5' **AGTT**GGAAGCTATCTCTAGCT**AGTT** 3'
 3' **TCAA**CCTTCGATAGAGATCGA**TCAA** 5'

b. 5' **AGTT**GGAAGCTATCTCTAGCT**AACT** 3'
 3' **TCAA**CCTTCGGATAGAGATCG**TTGA** 5

c. Si entre secuencias normalmente reconocidas por una recombinasa sitio específica se produjera una recombinación homóloga, ¿existe alguna diferencia en el producto final de la recombinación? ¿Por qué?