

# **GENÉTICA CLÍNICO-LABORATORIAL**

## **Aula 7**

Licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais

2016/17  
1º Semestre

# Sumário

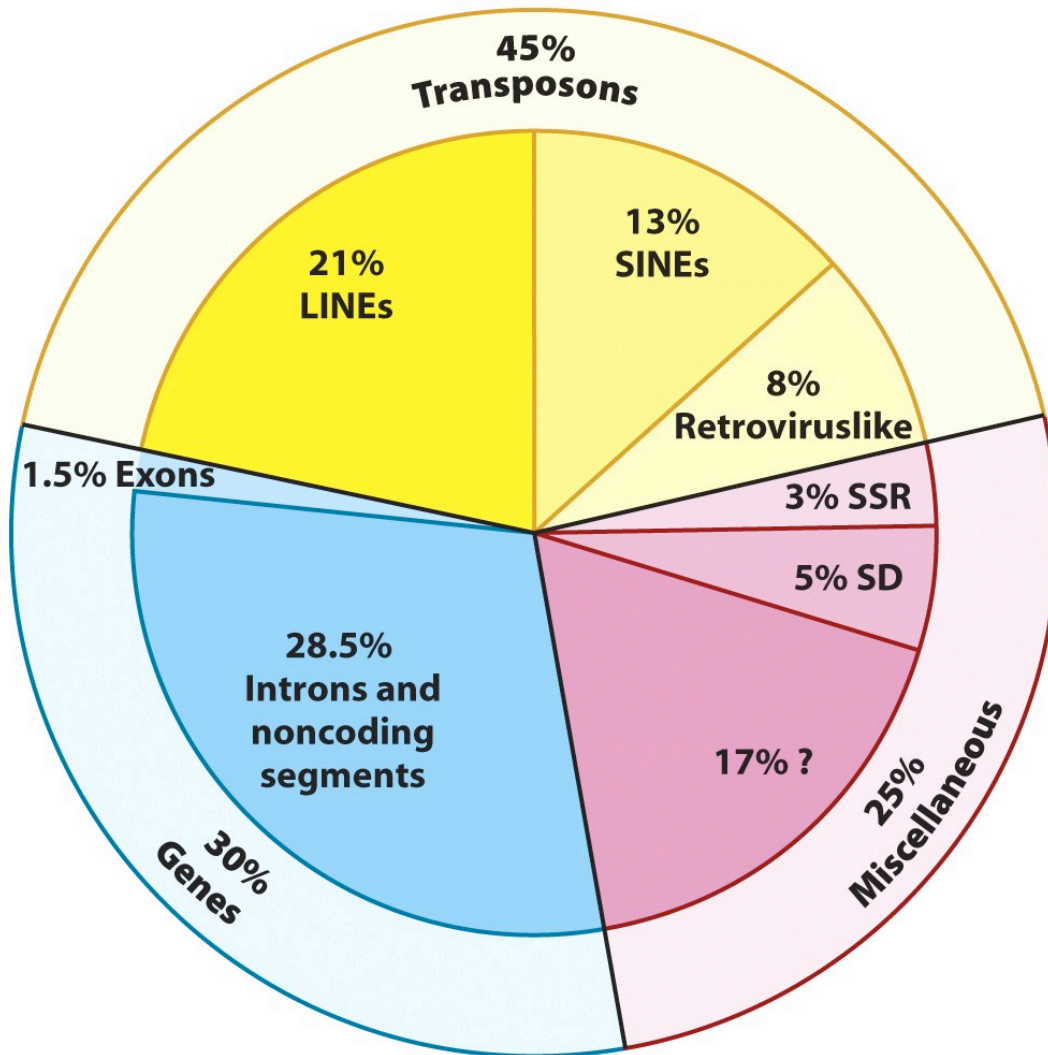
DNA Não Génico:

- **DNA Repetitivo**
  - **Transposões**

DNA Extranuclear:

- **DNA mitocondrial**

# Diversidade do DNA - Transposões



Genes → aprox 30%

Exões → 1,5%

## Transposões

Longos

Curtos

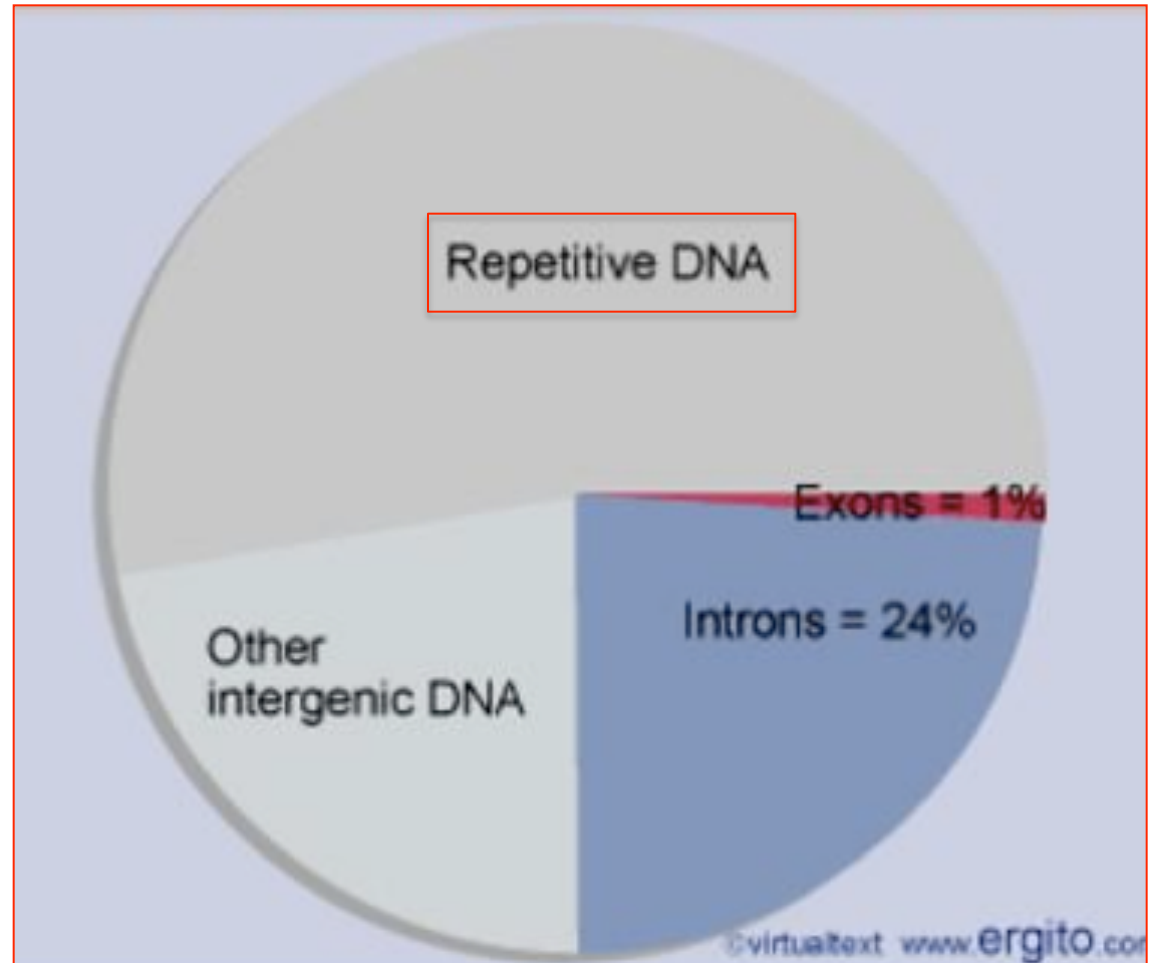
Retrotransposões

## Outros

Sequências repetitivas

Pseudogenes, enhancers, silencers, etc

# DNA Repetitivo



## DNA Repetitivo

- Os cromossomas têm uma grande quantidade de DNA repetitivo que constitui muitas vezes elementos repetitivos que podem ser organizados segundo o número de repetições e estrutura molecular.
- Os elementos repetitivos encontram-se por todo o cromossoma.
- Alguns elementos repetitivos, como os dos centrómeros e dos telómeros desempenham uma função especial na manutenção cromossoma.

# DNA Repetitivo

- Outros elementos são apenas vestígios genéticos da nossa evolução enquanto humanos
- ***Tandem Repeats***: número determinado de elementos idênticos em cadeia.
- ***Interspersed Repeats***: elementos genéticos móveis.

*1 bp = 1 par de bases*

*1 kb = 1 000 bp*

*1 Mb = 1 000 000 bp*

## DNA Repetitivo

- ✓ Também chamado de ***copy number variants (CNVs)*** o DNA repetitivo pode variar de 1 Kb até mais de 1MB.
- ✓ Pode representar mutações patológicas (funcionais) ou apenas polimorfismos genômicos sem relevância.
- ✓ O DNA repetitivo inclui ***low copy repeats (LCRs)***, duplicações ou multiplicações de regiões cromossômicas que facilitam rearranjos cromossômicos através de emparelhamento e recombinação não-homóloga

# DNA Repetitivo

**Tandem Repeats**: presença de um número idêntico de elementos em cadeia (de seguida)

- **Microsatélites (*Short tandem repeats STRs*)**: *Tandem repeats* com unidades de 2 a 6 nucleótidos.
- **Minisatélites (*variable number of tandem repeats VNTRs*)**: *Tandem repeats* com unidades de 10 a 60 nucleótidos.
- **DNA Satélite**: unidades repetitivas de 60 a 200 nucleótidos que é constituinte dos centrómeros, estruturas importantes para a manutenção dos cromossomas.

# DNA Repetitivo

**Interpersed Repeats**: Elementos genómicos com mobilidade.

- **Retrotransposões**: elementos constituídos de sequências de DNA que se movem através de transcrição reversa.
- **Transposões de DNA**: Fragmentos de DNA móvel

# DNA Repetitivo

## Cópias múltiplas de regiões de cromossomas:

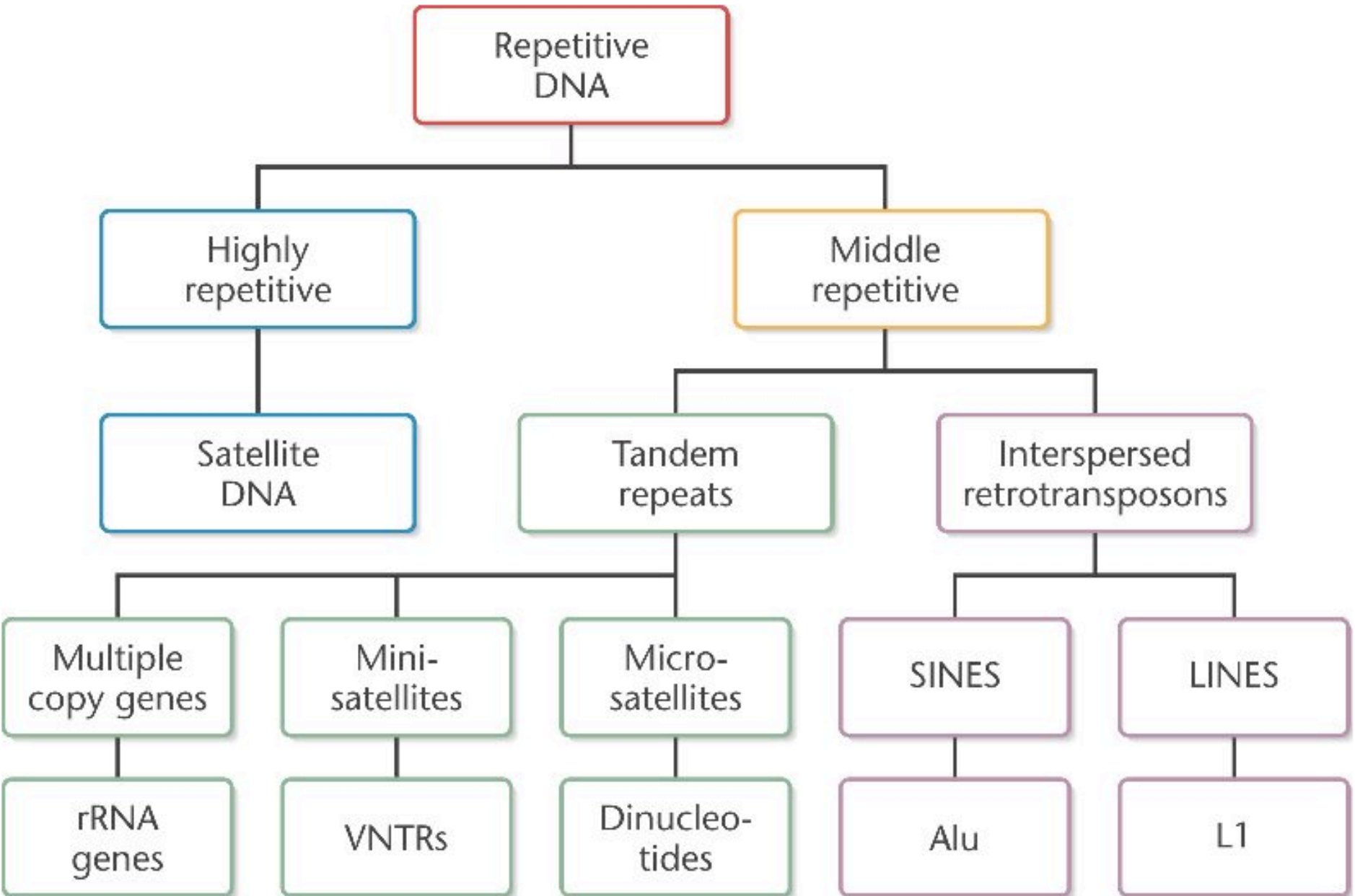
- ***Copy number variants (CNVs)***: Longas ( $\geq 1\text{Mb}$ ) regiões cromossómicas repetidas. O numero de copias destas regiões é variável em diferentes populações.
- ***Low copy repeats (LCRs)***: regiões cromossómicas duplicadas ou multiplicadas ( de 1 a 400Kb).

# DNA Repetitivo

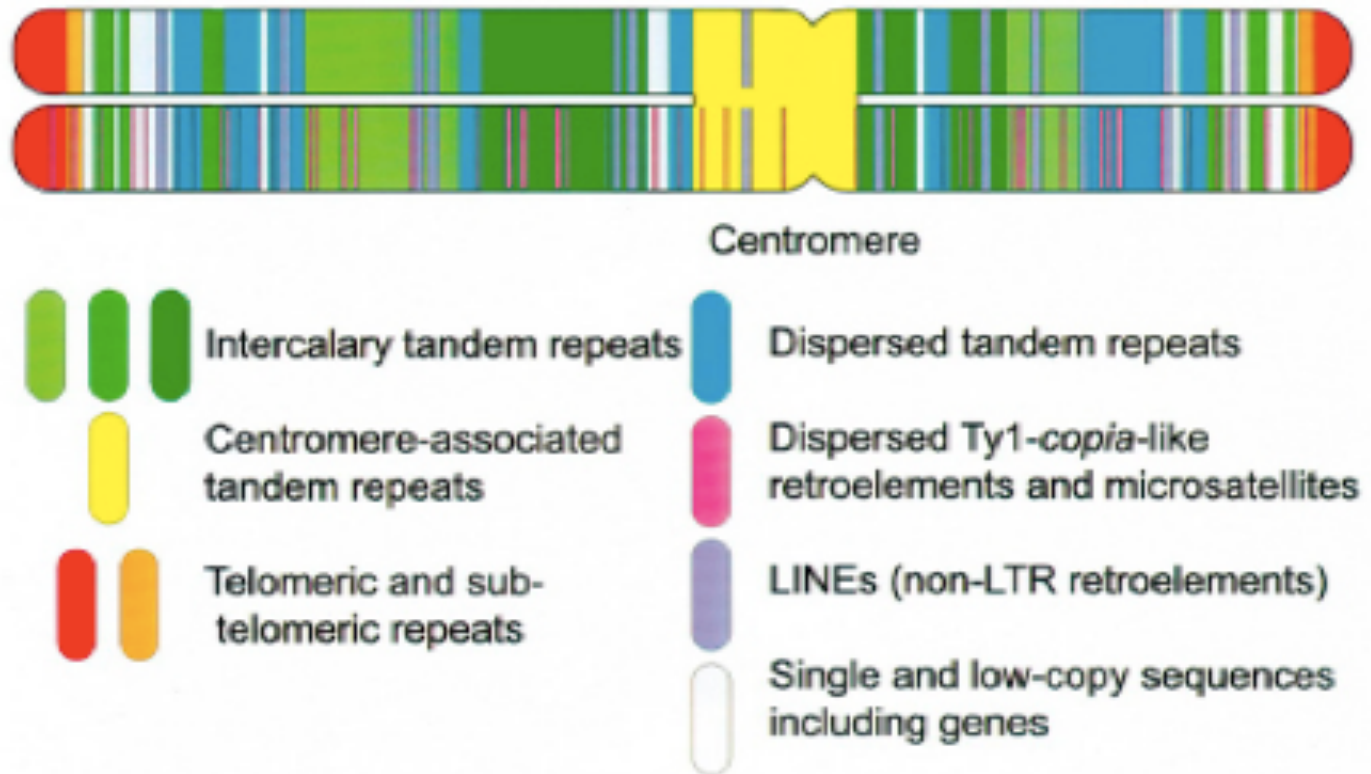
## Cópias múltiplas de regiões de cromossomas:

- ***Low copy repeats (LCRs)***: Facilitam a ocorrência de rearranjos cromossómicos através de emparelhamento e recombinação não homóloga durante a meiose.
- **DNA Ribossomal (rDNA)**: DNA que se encontra no nucléolo (nuDNA), essencial à manutenção da célula e à síntese do RNA ribossomal

# DNA Repetitive



# DNA Repetitivo



## DNA Repetitivo – DNA micro e minisatélite

- ✓ Os mini e microsatélites normalmente não têm uma significância funcional.
- ✓ Como são altamente variáveis e fáceis de analisar, são comumente usados em várias análises genéticas, como em identificação de indivíduos (*genetic fingerprint*), testes de paternidade e na análise de relações genéticas dentro de famílias.
- ✓ Estes elementos desempenham um papel importante nas patologias provocadas por repetições de três nucleótidos

# DNA Repetitive

■ **Table 3.1. Important Trinucleotide Diseases**

<b>Disease</b>	<b>Inheritance</b>	<b>Repeat</b>	<b>Localization of the Repeat</b>	<b>Normal Allele (Number of Repeats)</b>	<b>Full Mutation (Number of Repeats)</b>
Huntington disease (chorea)	Autosomal dominant	CAG	Coding region (polyglutamine tract)	26 or fewer	40 and more
Spinocerebellar ataxias (various subtypes)	Autosomal dominant	CAG	Coding region (polyglutamine tract)	Differs according to subtype	Differs according to subtype
Fragile X syndrome	X chromosomal	CGG	5' UTR	5–40	200 to several thousand
Myotonic dystrophy	Autosomal dominant	CTG	3' UTR	5–34	50 to several thousand
Friedreich ataxia	Autosomal recessive	GAA	Intronic	5–33	66 to several thousand

# **Transposões**

## **(Transposable elements)**

# Transposões (Transposable elements)

- ✓ Descobertos em 1940 por Barbara McClintock no milho.
- ✓ São elementos que se podem mover (transpor) dentro do genoma.
- ✓ Inserem-se em sítios do DNA, modificando a expressão dos genes próximos do sitio de inserção
- ✓ São conhecidos muitos transposões em procariotas e eucariotas.
- ✓ São agrupados em famílias segundo as semelhanças na sequencia de DNA

## Transposões (Transposable elements)

- ✓ Os genomas da maioria dos organismos contém múltiplas cópias de cada família diferente de transposões.
- ✓ Uma vez inseridos no genoma, os transposões persistem durante longos períodos de tempo, sofrendo várias mutações.
- ✓ Aproximadamente 50% do genoma humano consiste em transposões;
- ✓ A maioria dos transposões presentes no genoma humano são vestígios evolutivos que já não possuem habilidade de se transpor no genoma

## Transposões (Transposable elements)

### Transposable Elements in the Human Genome

Type	Number of copies	Percentage of total genome
SINEs	1,558,000	13.1
<i>AluI</i>	1,090,000	10.6
LINEs	868,000	20.4
<i>LINE1</i>	516,000	16.9
LTR elements	443,000	8.3
DNA elements	294,000	2.8
<i>mariner</i>	14,000	0.1
Unclassified	3,000	0.1
<b>Total of all types</b>		<b>44.7</b>

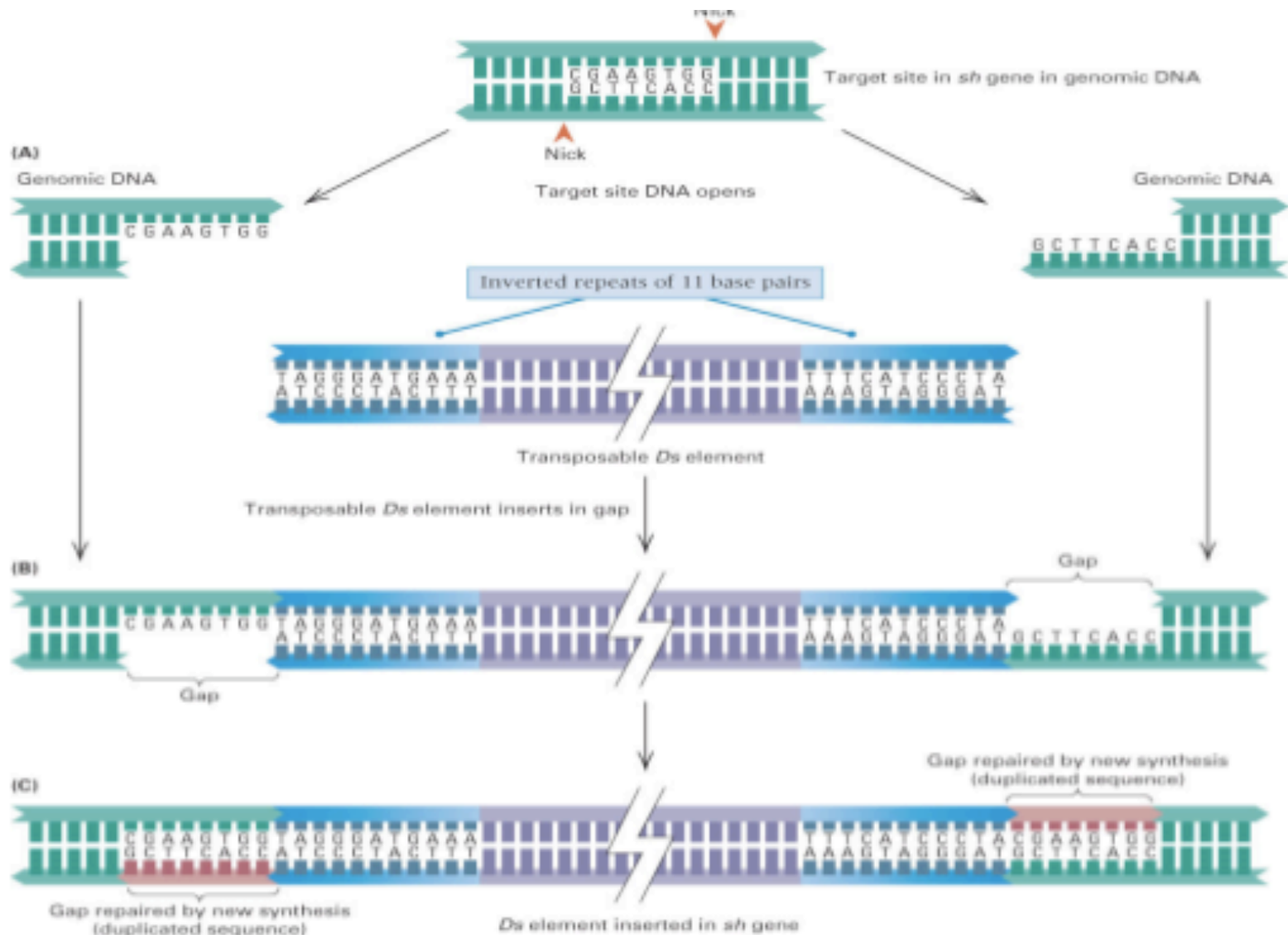
Data from E. S. Landers et al., *Nature* 409 (2001): 860.

# Transposões (Transposable elements)

- Os transposões podem mover-se (transpor) via usando o DNA ou o RNA como intermediários.
- Sitio de inserção dos transposões normalmente é uma duplicação, resultante do corte provocado pelo elemento.
- Uma grande parte dos Transposões chamados transposões de DNA são inseridos no genoma através do mecanismo de corta-e-cola (*cut-and-paste*):

O transposão é cortado da sua posição inicial no genoma e a mesma molécula é inserida noutra posição

# Transposões (Transposable elements)



**Sequence arrangement of a cut-and-paste transposable element and changes that take place when it inserts into the genome**

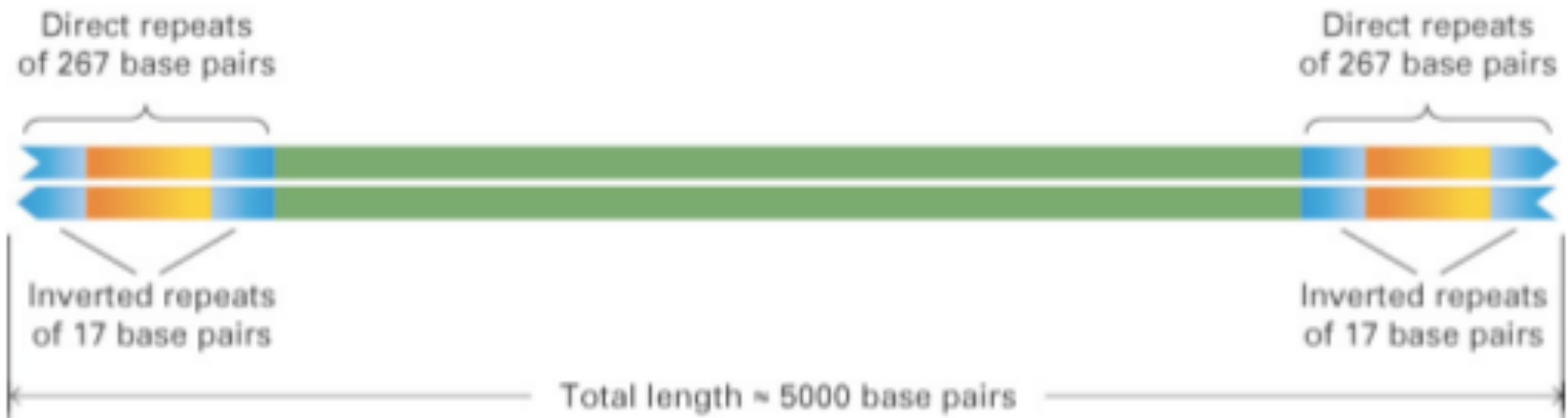
# Transposões (Transposable elements)

- A enzima responsável pela clivagem do DNA para a inserção de transposões é a **transposase**.
- Esta enzima determina a distancia entre os cortes na sequencia alvo de DNA.
- Uma das principais características dos transposões é a presença de pequenas repetições invertidas terminais (***Short terminal inverted repeats***).
- Outra grande classe de transposões possui repetições diretas terminais (***terminal direct repeats***) de 200-500bp de comprimento que se chamam ***long terminal repeats (LTRs)***

## Transposões (Transposable elements)

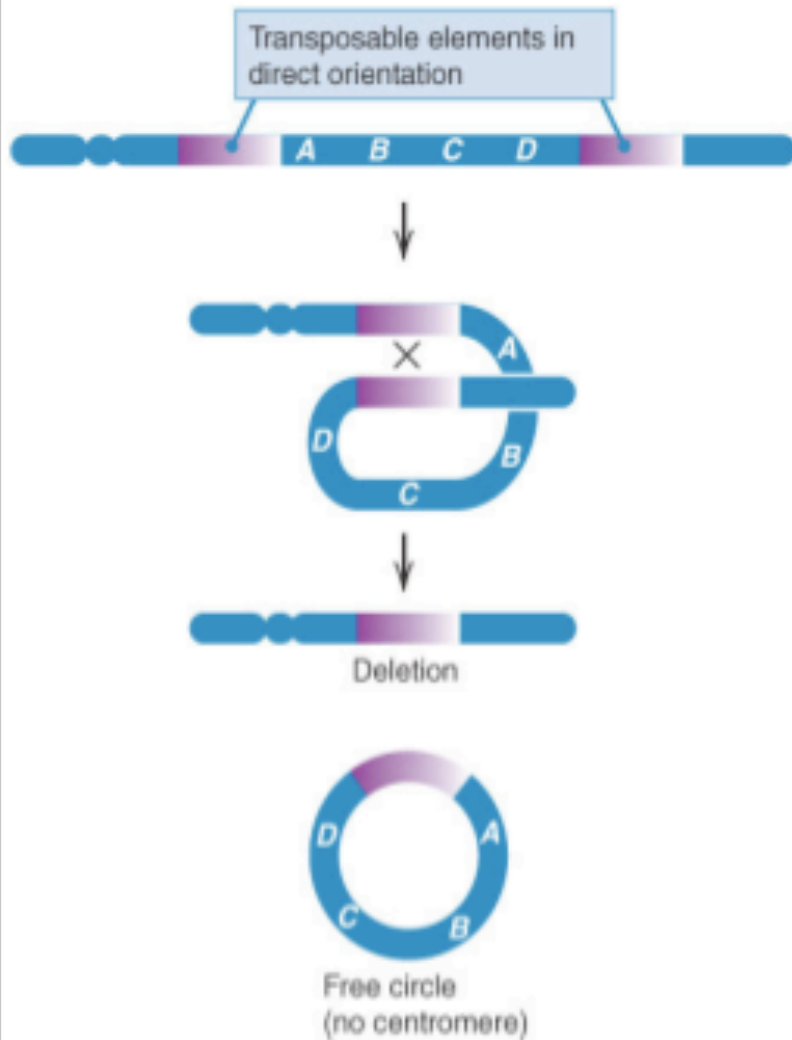
- Os transposões com longas repetições terminais (*long terminal repeats*) são chamados de **retrotransposões LTR**, porque usam o RNA como transcrito intermediário para se transporem.
- Dentro das proteínas codificadas pelo transposição encontra-se a transcriptase reversa, que consegue transcrever ao contrário, usando o RNA como molécula molde.
- Alguns transposões não têm repetições terminais e são chamados de ***non-LTR retrotransposões***

# Transposões (Transposable elements)

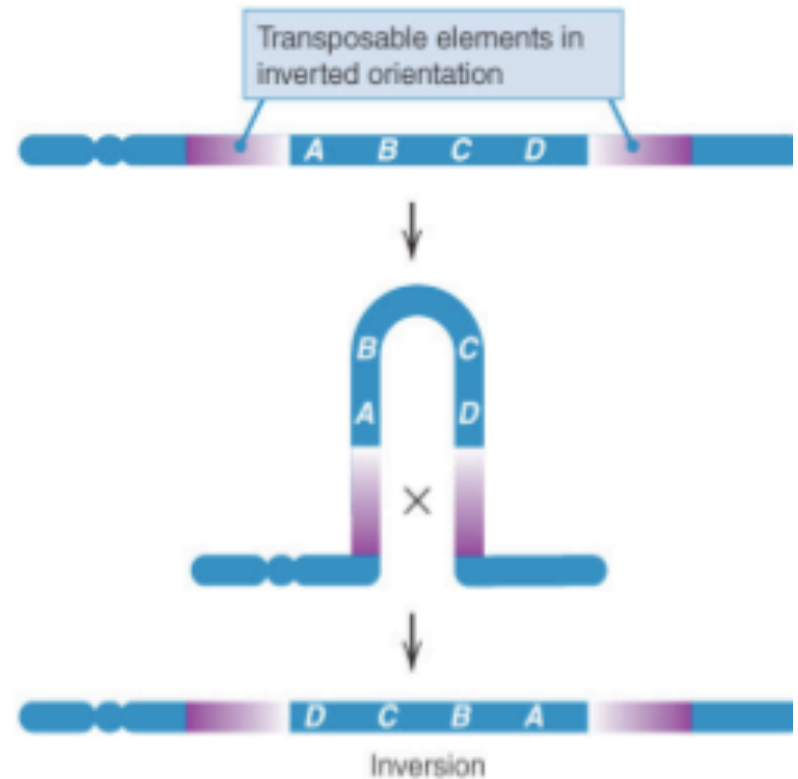


# Transposões (Transposable elements)

(A) Direct orientation

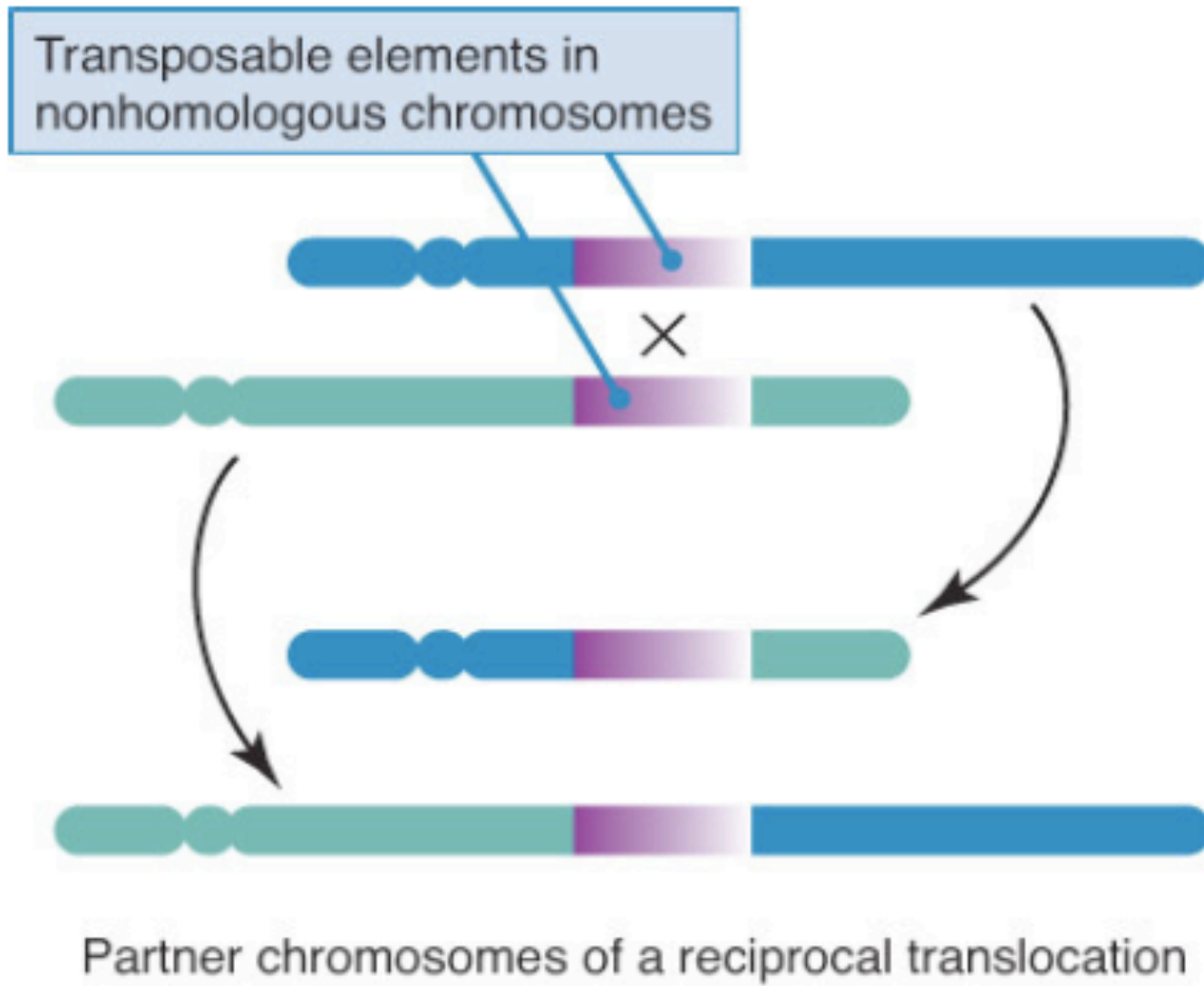


(B) Inverted orientation



Recombination between transposable elements

# Transposões (Transposable elements)



**Unequal crossing-over**

## Transposões (Transposable elements)

- Os transposões podem causar mutações através da inserção no genoma ou através de recombinação
- Os transposões podem também causar aberrações genéticas resultantes da recombinação entre cópias diferentes (não alélicas) do elemento

# Transposões (Transposable elements)

## LINEs : Long interspersed elements

- São um grupo de ***non-LTR retrotransposons*** que se encontra espalhado pelo genoma de muitas eucariotas.
- Estes elementos encontram-se cerca de 20% do genoma humano.
- Também é conhecido o ***Long interspersed nucleotide element***, que é uma versão mais longa do LINE
- São responsáveis por mutações provocadas pela sua retrotransposição dentro de genes e através de recombinação desigual.

# Transposões (Transposable elements)

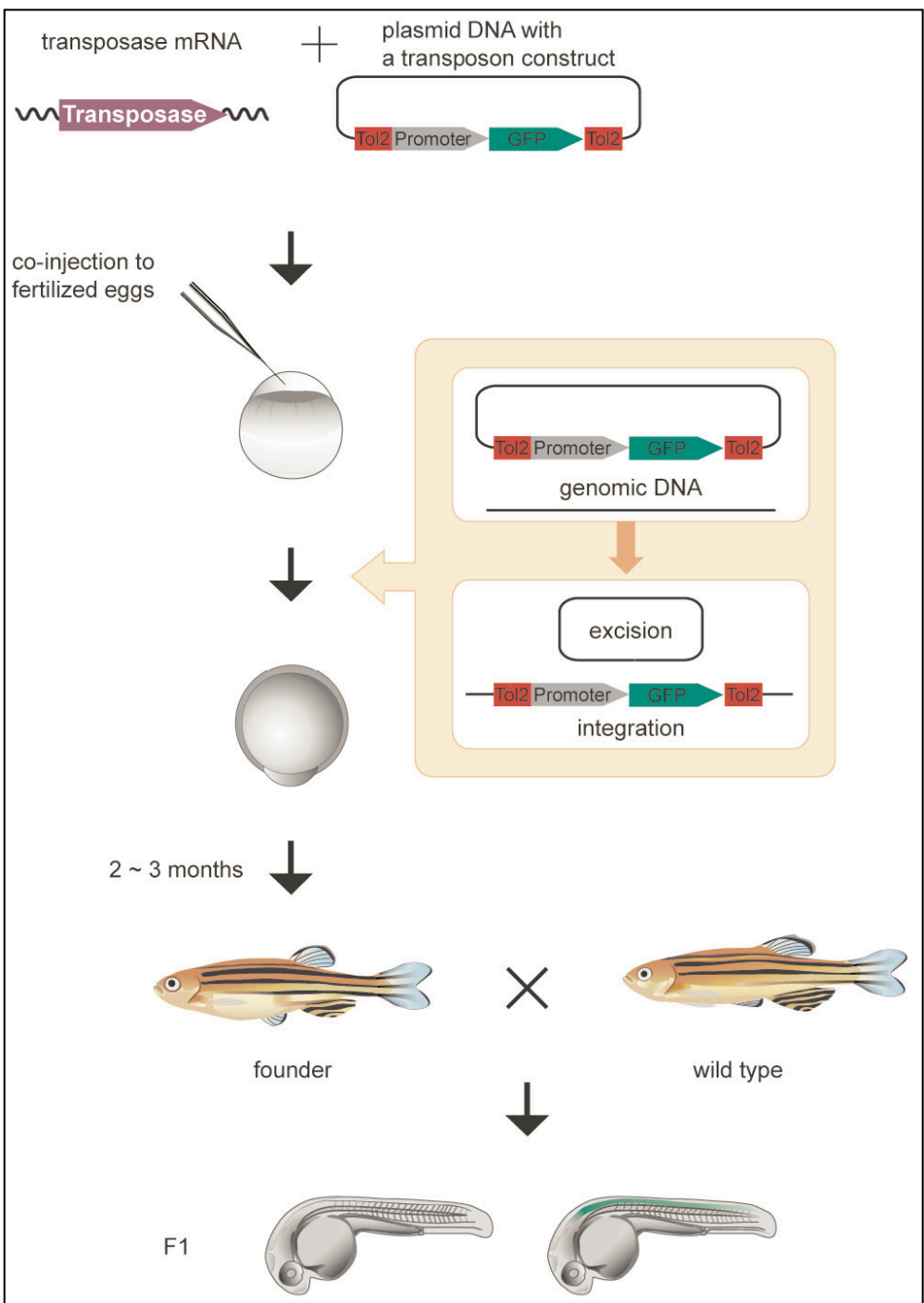
## SINEs: (Short interspersed elements)

- São sequências altamente repetitivas classificadas como non-LTR retrotransposons.
- Estão distribuídos por todo o genoma da maioria dos eucariotas, representando cerca de 10% do DNA total.
- SINEs são responsáveis por mutações provocadas pela sua retrotransposição dentro de genes e através de recombinação desigual.
- São considerados DNA parasita

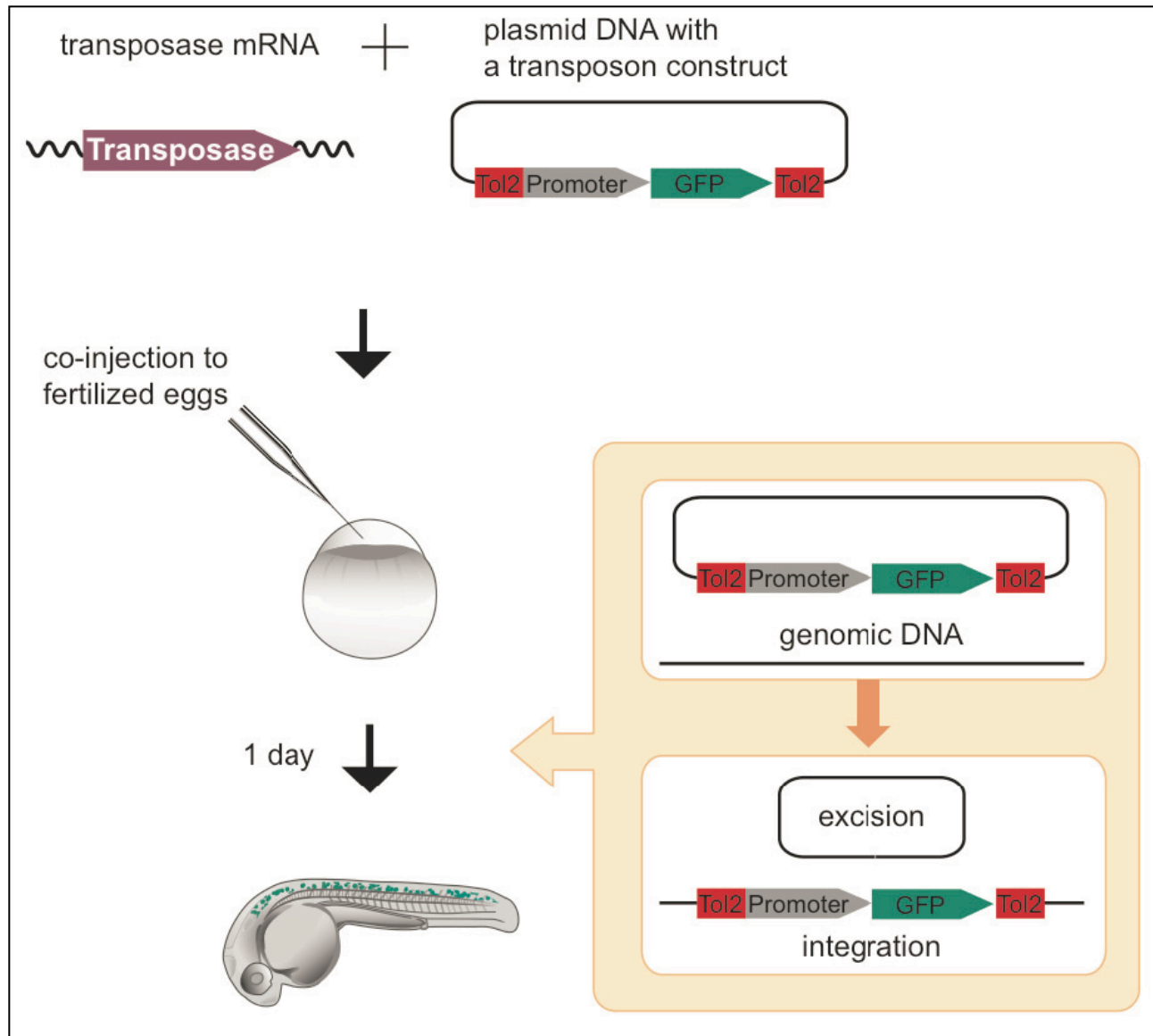
# Transposões (Transposable elements)

Aplicabilidade dos  
transposões na genética molecular

Exemplo: Transposição *ToI2*



# Exemplo: Transposição *Tol2*



# Transposões (Transposable elements)

Aplicabilidade dos transposões na genética molecular

Exemplo: Transposição *Tol2*

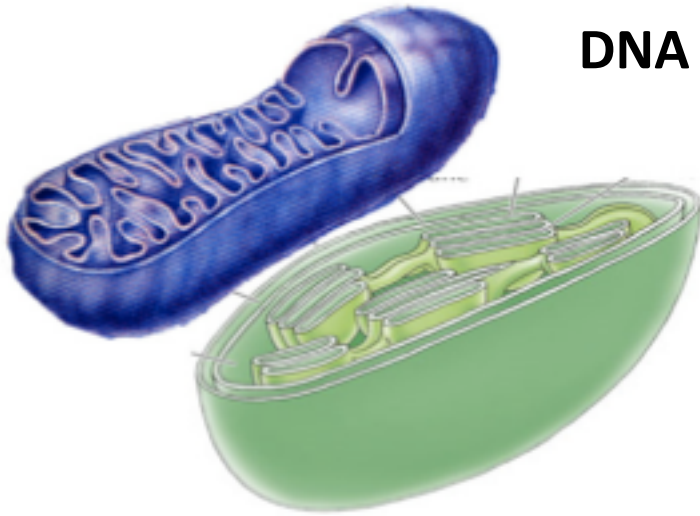


**+ transposase mRNA**

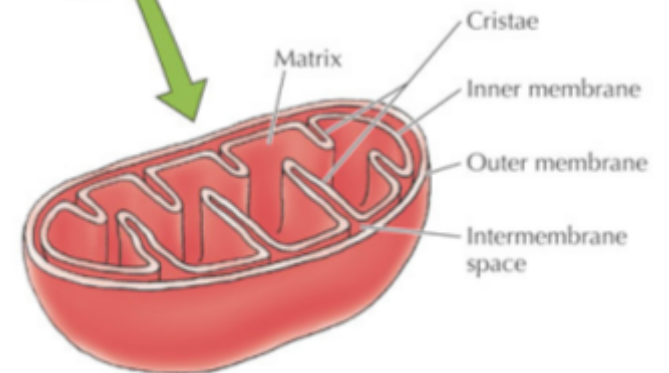
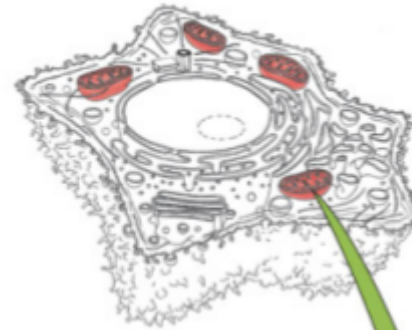
**DNA Mitochondrial**  
**(genoma extranuclear)**

# DNA extranuclear

## DNA Mitochondrial



## Eucariotas



## DNA Mitocondrial

DNA circular parecido ao DNA dos procariotas

- ✓ Apenas 5% é DNA codificante para RNA e proteínas essenciais à função do organelo
- ✓ Outras proteínas essenciais à função da mitocôndria são codificadas pelo DNA nuclear, traduzidas no citoplasma e transportadas para a mitocôndria
- ✓ As proteínas estão presentes em números diferentes nos diferentes tipos de células

# DNA Mitocondrial

- ✓ As mitocôndrias têm um papel determinante nas funções metabólicas da célula:
  - ✓ Sinalização Celular
  - ✓ Regulação da permeabilidade da membrana
  - ✓ Início da apoptose
  - ✓ Regulação do metabolismo celular
  - ✓ Síntese de hormonas

## DNA Mitocondrial

- ✓ Algumas funções da mitocôndria são realizadas consoante o tipo celular.

### Exemplos:

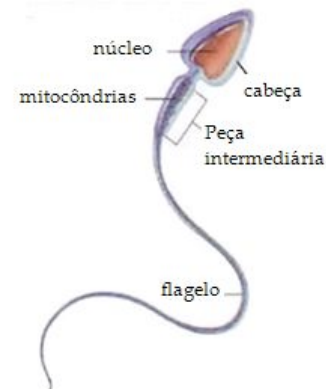
- ✓ Mitocôndrias de células hepáticas contem enzimas que permitem a realização do processo de desintoxicação de amónia.
- ✓ A mutação nos genes mitocondriais que regulam algumas destas funções pode resultar em doenças mitocondriais

# DNA Mitocondrial

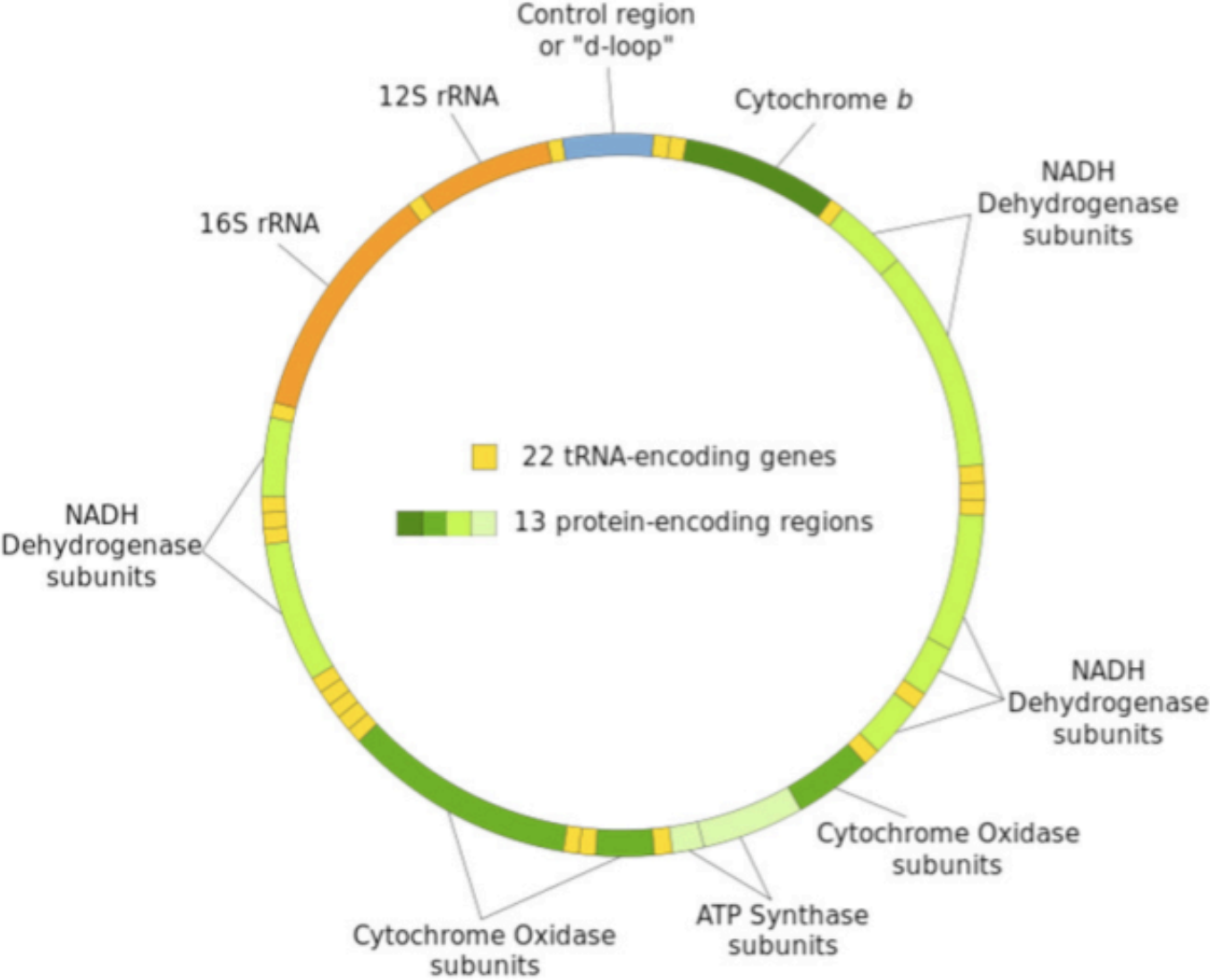
## Herança uniparental

Durante a divisão celular as mitocôndrias reproduzem-se por fissão binária.

- As mitocôndrias contém cerca de 2-10 cópias do seu DNA.
- A recombinação genética não ocorre e a sequencia de DNA mitocondrial representa um ser haploide.
- Devido a este facto a mitocôndria é usada para o estudo da evolução durante a história das populações



# DNA Mitochondrial



## DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

- ✓ As doenças mitocondriais podem ser causadas por mutações que envolvam o genoma mitocondrial e nuclear
- ✓ Devido ao número variável de mitocôndrias e de mtDNA nos diferentes tecidos existe coexistência de mtDNA normal e mutado
- ✓ Este fenômeno é chamado de **Heteroplasmia**

# DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

## Heteroplasmia

- ✓ A mesma mutação produz manifestações clínicas diferentes.
- ✓ Mutações diferentes podem resultar em manifestações clínicas iguais

## DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

As doenças mitocondriais que envolvem mutações no mtDNA produzem um impacto patológico especial no:

1. Fornecimento de ATP na célula, provocado por defeitos na cadeia transportadora de elétrons (*ATP sintetase*).
2. Tecidos que necessitem de grande quantidade de reservas energéticas (sistema nervoso e músculos).
3. Aparecimento de diabetes, doenças coronárias e outras doenças relacionadas com o envelhecimento

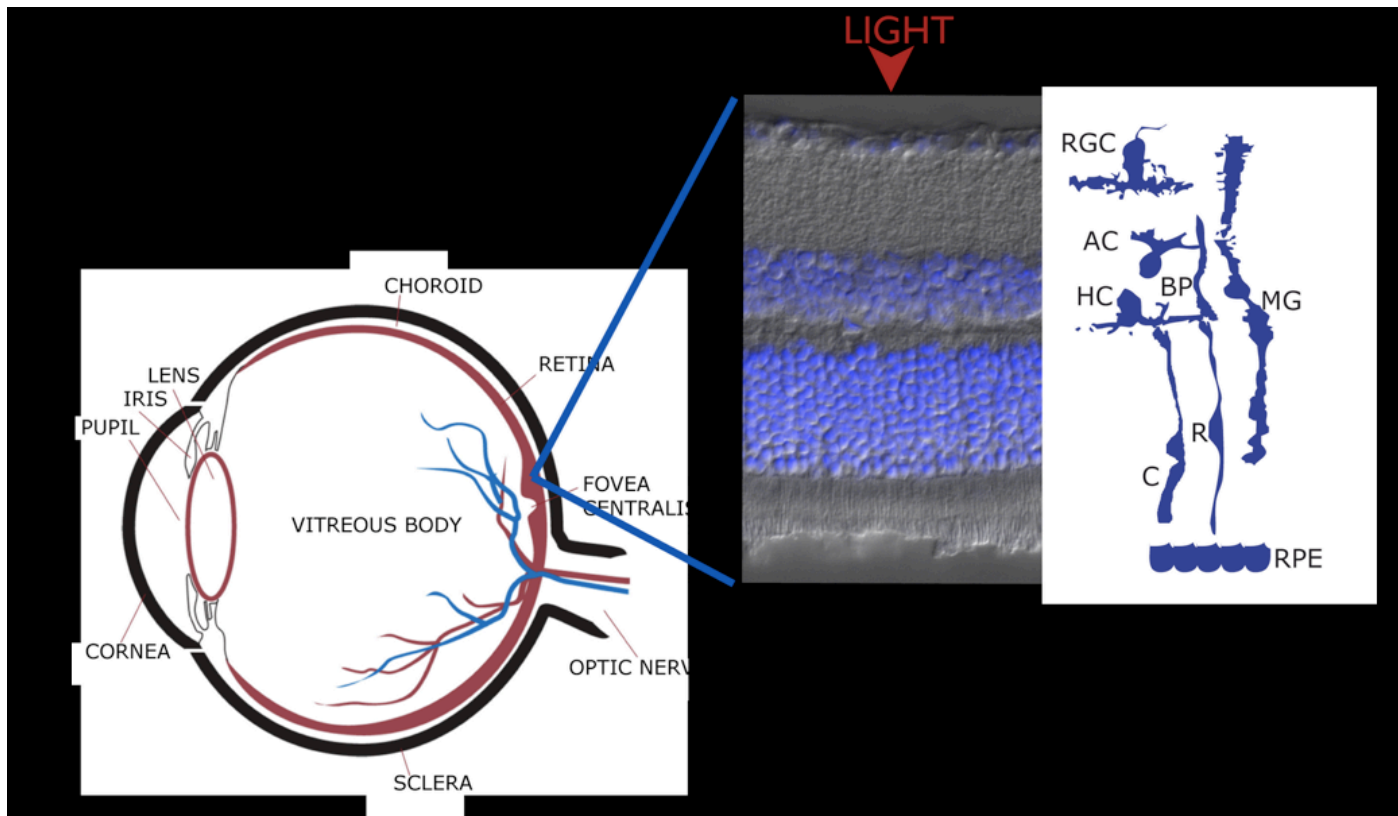
## DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

- ✓ Algumas doenças mitocondriais são herdadas da mãe para a descendência.
- ✓ Nestes casos, as células podem ter mais de um tipo de mitocôndria (normal e mutada) (heteroplasmia), ou apenas um tipo de mitocôndria (homoplasmia).
- ✓ A gravidade da doença mitocondrial depende da proporção de mitocôndrias mutantes e normais entre os indivíduos da descendência (afectados)

# DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

## Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) ou Leber optic atrophy

É uma doença mitocondrial em que ocorre degeneração das *retinal ganglion cells*, o que leva à perda da visão central.



## DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

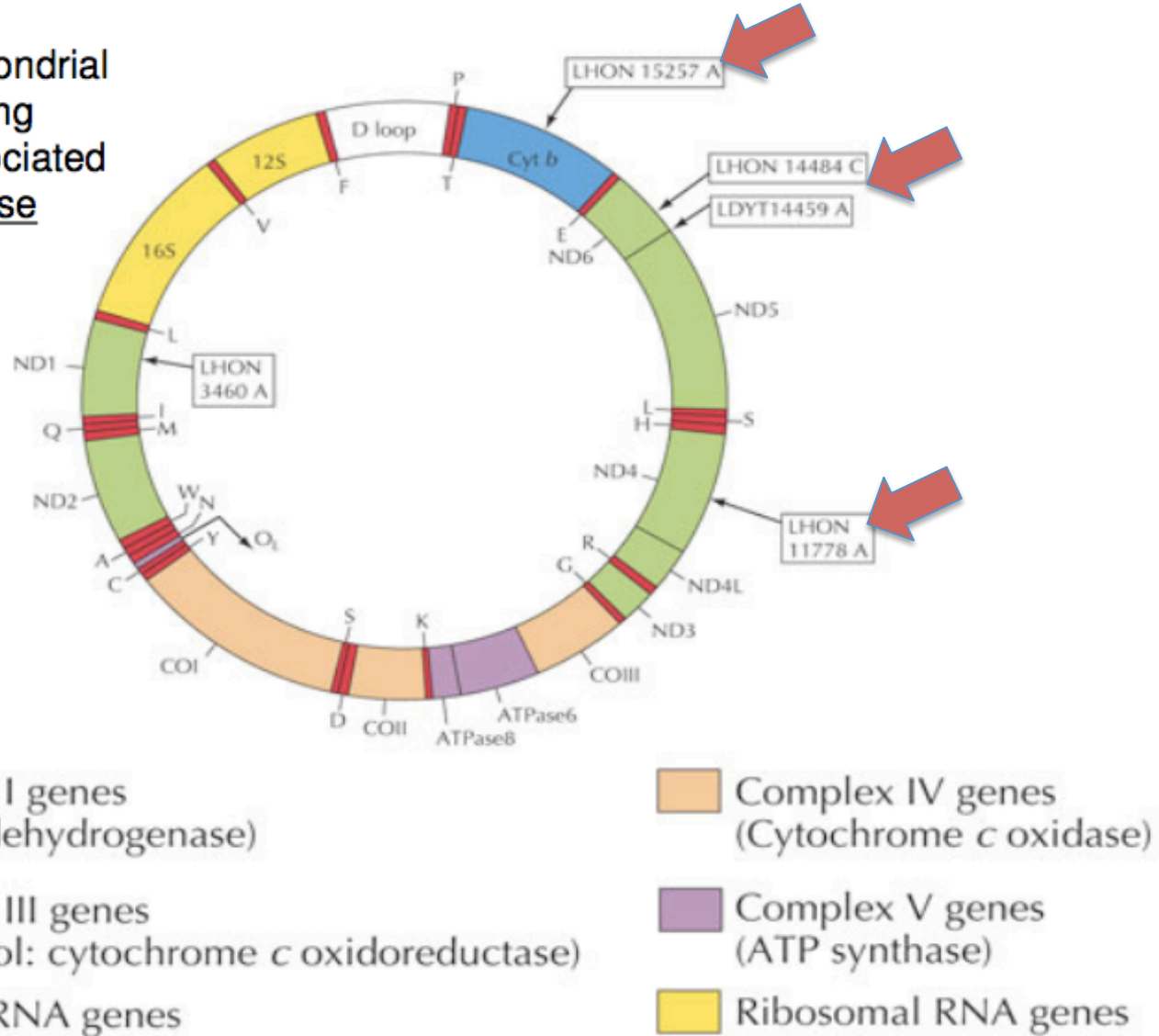
**Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) ou  
Leber optic atrophy**

- ✓ Afecta predominantemente jovens masculinos adultos jovens
- ✓ É provocada por mutações pontuais (SNP) no DNA mitocondrial nos genes do complexo I da cadeia de fosforilação oxidativa da mitocôndria
- ✓ Os homens afetados não passam a doença para os seus descendentes, sendo por isso uma doença rara.



# DNA Mitochondrial – Doenças Mitocondriais

Human mitochondrial genome showing mutations associated to LHON disease



# DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

Quadro Clínico	Gene	Mutação
MELAS: miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios de acidente vascular cerebral	TRNA <sup>leu(ur)</sup>	A3243G T3271C
Diabetes melitus e surdez de herança materna	TRNA <sup>leu(ur)</sup> TRNA <sup>lys</sup> TRNA <sup>glu</sup> Vários genes	A3243G A8296G T14709C Deleções
Diabetes melitus, surdez e distrofia macular	Vários genes	Deleções heteroplásmicas
MERRF: epilepsia mioclônica, ataxia, demência e atrofia do nervo óptico	TRNA <sup>lys</sup>	A8344G T8356C
Lipomatose simétrica múltipla	TRNA <sup>lys</sup>	A8344G
Hiperqueratose palmoplantar + DA	TRNA <sup>ser(ucr)</sup>	A7445G
Síndrome da DA, ataxia e mioclonia	Vários genes	Ins C7442 (inserção do nucleotídeo citosina no locus 7442)
Síndrome de Kearns-Sayre: oftalmoplegia externa progressiva + DA	Vários genes	Deleções heteroplásmicas Duplicações Heteroplásmicas
Síndrome de Wolfran: diabetes melitus, diabetes insípido, atrofia óptica e DA	Vários genes	Deleção Heteroplásmica de 7.670 nucleotídeos
Tubulopatia proximal, diabetes melitus e ataxia cerebelar.	Vários genes	Duplicação parcial e deleção parcial Heteroplásmica
Encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial	Vários genes	Múltiplas deleções

# DNA Mitochondrial – Doenças Mitocondriais

**Table 16.1** Phenotypes associated with some mitochondrial mutations

Nucleotide changed	Mitochondrial component affected	Phenotype <sup>a</sup>
3460	ND1 of Complex I <sup>b</sup>	LHON
11778	ND4 of Complex I	LHON
14484	ND6 of Complex I	LHON
8993	ATP6 of Complex V <sup>b</sup>	NARP
3243	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> <sup>c</sup>	MELAS, PEO
3271	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	MELAS
3291	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	MELAS
3251	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	PEO
3256	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	PEO
5692	tRNA <sup>Asn</sup>	PEO
5703	tRNA <sup>Asn</sup>	PEO, myopathy
5814	tRNA <sup>Cys</sup>	Encephalopathy
8344	tRNA <sup>Lys</sup>	MERRF
8356	tRNA <sup>Lys</sup>	MERRF
9997	tRNA <sup>Gly</sup>	Cardiomyopathy
10006	tRNA <sup>Gly</sup>	PEO
12246	tRNA <sup>Ser(AGY)</sup> <sup>c</sup>	PEO
14709	tRNA <sup>Glu</sup>	Myopathy
15923	tRNA <sup>Thr</sup>	Fatal infantile multisystem disorder
15990	tRNA <sup>Pro</sup>	Myopathy

<sup>a</sup>LHON Leber's hereditary optic neuropathy; NARP Neurogenic muscle weakness, ataxia, retinitis pigmentosa; MERRF Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber syndrome; MELAS Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes; PEO Progressive external ophthalmoplegia.

<sup>b</sup>Complex I is NADH dehydrogenase. Complex V is ATP synthase.

<sup>c</sup>In tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, the R stands for either A or G; in tRNA<sup>Ser(AGY)</sup>, the Y stands for either T or C.

# DNA Mitocondrial – Doenças Mitocondriais

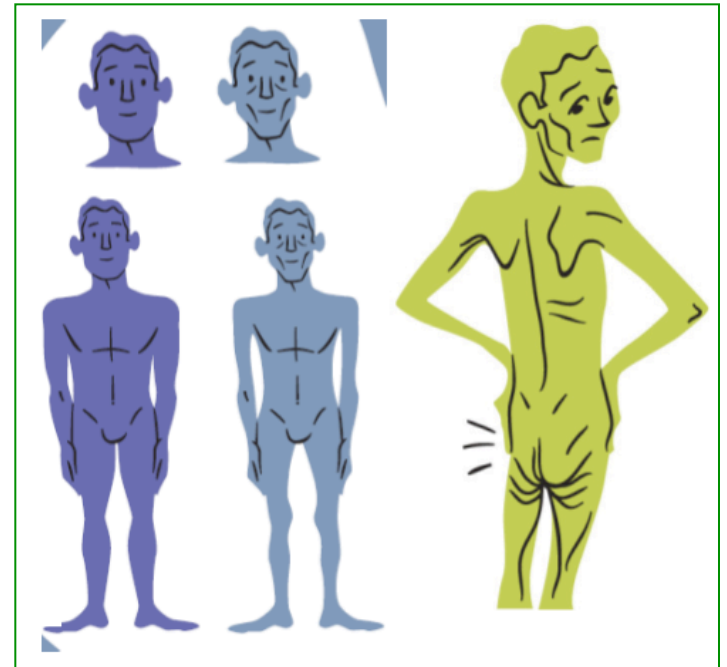
## Que é que acontece quando a função das mitocôndrias é afectada??

As mitocôndrias são células que funcionam como ‘fábricas de energia’, onde o açúcar e as gorduras são transformados em energia

Se as mitocôndrias se encontram danificadas, as células adiposas começam a perder volume e morrem

As mitocôndrias podem ser afetadas por drogas antivirais

O Fenótipo mais recorrente é a ***Lipo-atrophy***



# DNA Mitocondrial – Estudo da evolução de populações

Como a recombinação genética não ocorre no DNA mitocondrial, esta molécula constitui um bom marcador genético dos ancestrais humanos.

- O mtDNA humano apresenta um rácio de aproximadamente **uma** mudança por linhagem mitocondrial de **3800 em 3800 anos**
- As populações modernas atuais são originárias do Subsaaran-África, há aproximadamente há 100,000 anos atrás

# DNA Mitochondrial – Estudo da evolução de populações

## Phylogenetic tree of human migration

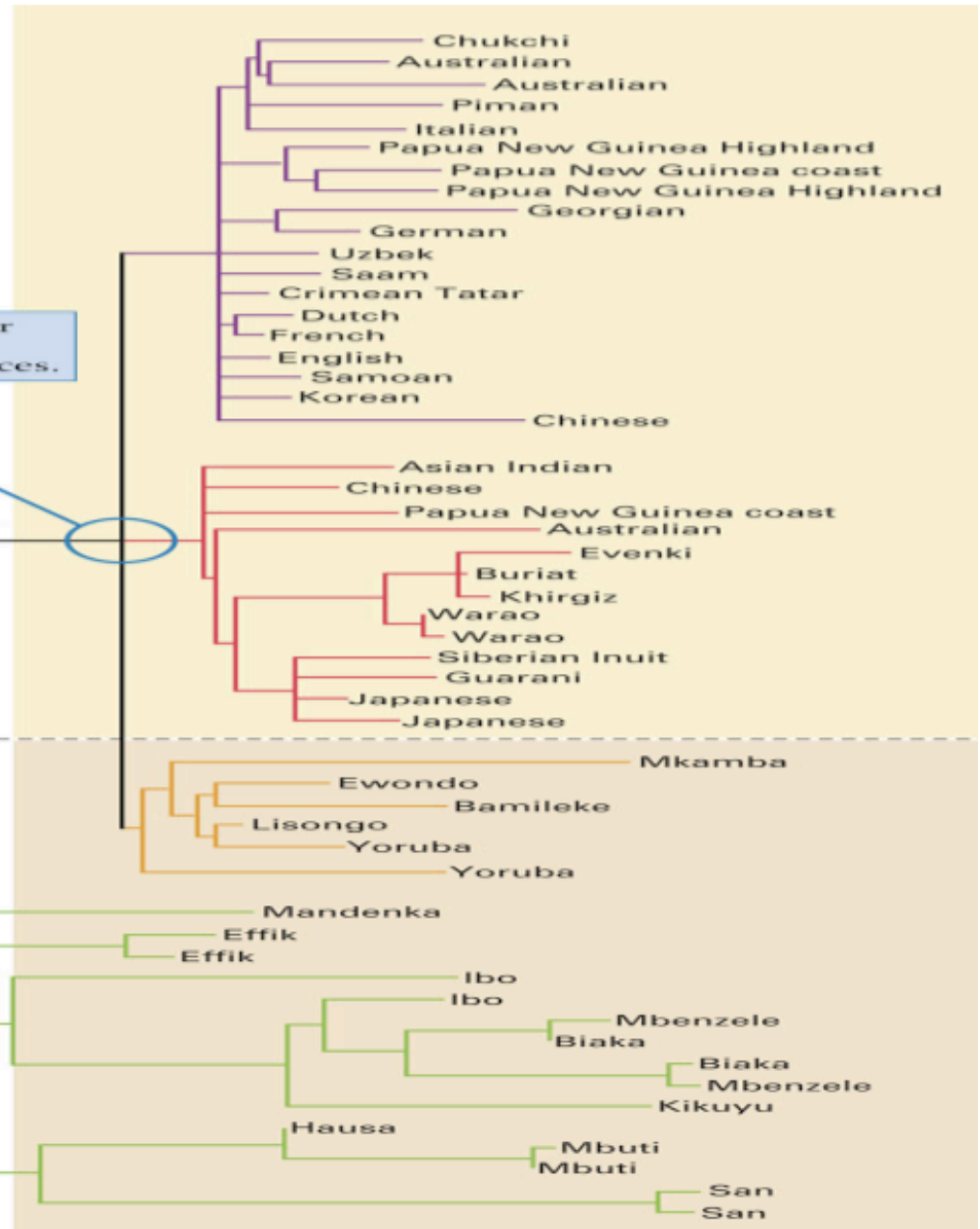
The most recent common ancestor (MRCA) refers to the most recent node that joins a group of sequences.

Scale: 10 nucleotide differences

Non-African  
-----  
African

~170,000  
±50,000 yr

~50,000  
±25,000 yr



# DNA Mitocondrial – Estudo da evolução de populações

Rotas de migração humana

[Data from S.B. Hedges. 2000. *Nature* 408: 652.]



# DNA Mitocondrial – Ciências Forenses

DNA mitocondrial é usado na ciência forense quando:

- O DNA nuclear se encontra degradado
- O DNA nuclear é encontrado em pequenas quantidades
- Não se consegue obter uma amostra de referencia (pessoas desaparecidas, ou mortas há muito tempo)



# DNA Mitocondrial – Ciências Forenses

- As amostras de mtDNA são extraídas do progenitor materno, ou de parentes femininos.
- O DNA mitocondrial pode ser processado da mesma forma que o DNA nuclear (mesmos métodos de análise e diagnóstico).
- A análise de mtDNA permite principalmente a identificação de pessoas desaparecidas, cadáveres em decomposição, estabelecimento de graus de parentesco entre cadáveres.
- É uma molécula muito usada na **Patologia Forense** e na **Antropologia Forense**