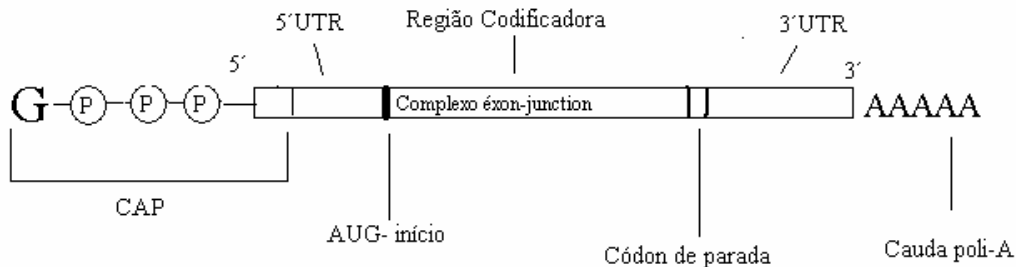


TRABALHO DE GD DE BIOMOL

[1] Através de um desenho esquemático indique os principais elementos de um mRNA eucariótico, citando um papel importante que as regiões 5'UTR e 3'UTR (incluindo CAP e cauda poli A) podem ter.



O CAP tem como função proteger a extremidade 5' do mRNA e é reconhecido pela subunidade menor do ribossomo, que se liga ao mRNA e desliza pela região 5'UTR (que pode conter a sequência de Kozak, sinalizando a proximidade de um códon AUG). Na extremidade 3', a região UTR determina o tempo de meia vida do mRNA de alguns genes por conter sequências sinalizadoras. A cauda poli A mantém a integridade da região 3' (com um nível normal de adenilação) e auxilia na exportação do mRNA para o citoplasma.

Questão Falso/Verdadeiro

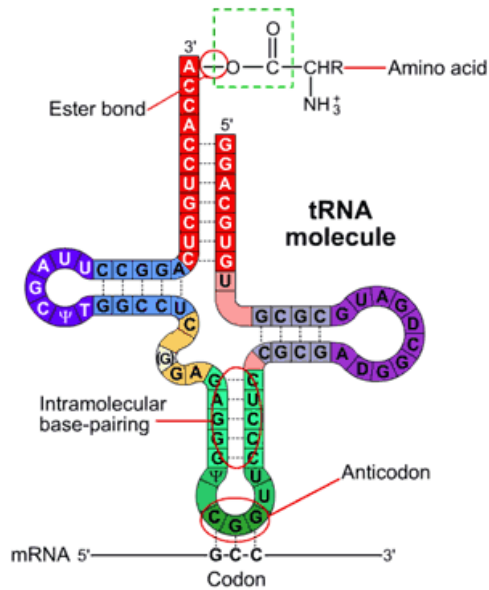
Em procariotos, uma sequência importante no posicionamento correto da subunidade menor do ribossomo na tradução do mRNA é chamada de Shine Delgarno e localiza-se na região 5'UTR. (VERDADEIRO)

Questão Múltipla escolha

São elementos do mRNA importantes para o reconhecimento pelo ribossomo:

- a) Região 3'UTR e Poli A
- b) Cap e região 3'UTR
- c) Região codificadora e cauda Poli A
- d) **Cap e região 5'UTR**

[2] Através de um desenho esquemático, indique os principais elementos de um tRNA, a ligação do aminoácido e duas características das enzimas aminoacil-tRNA sintetase.



A aminoacil-tRNA sintetase são enzimas específicas, existe uma enzima para a ligação de cada aminoácido. Ela possui dois sítios ativos, um que realiza a reação de carregamento do tRNA e outro que reconhece o aminoácido incorreto ligado a sua molécula de transportador (função revisora).

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

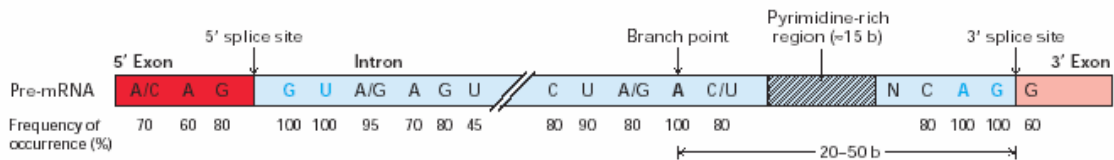
A ligação do aminoácido ao tRNA fornece energia para o acoplamento das duas subunidades do ribossomo na presença de Mg⁺ (Falso)

Questão fechada:

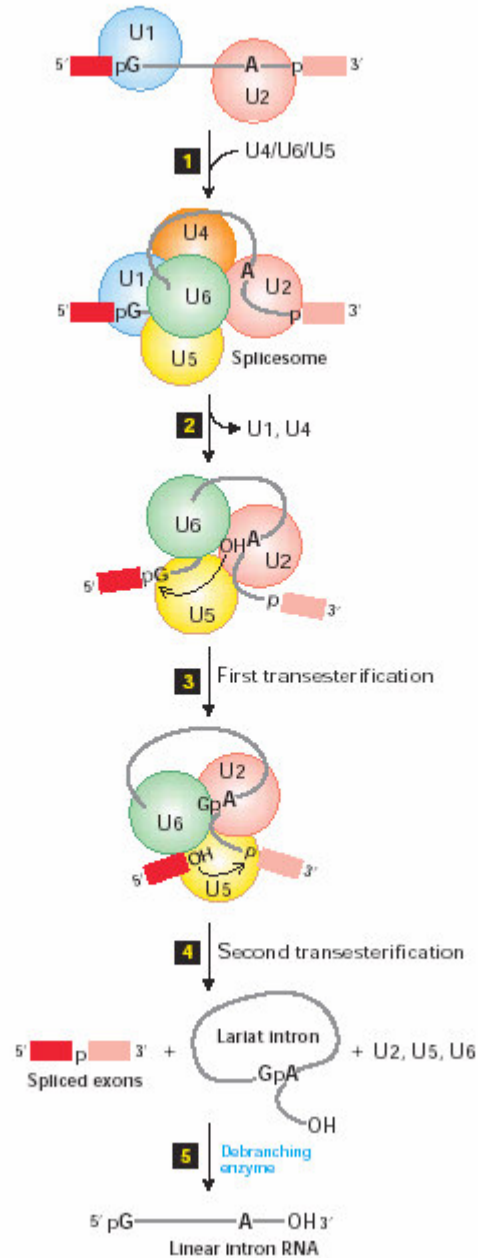
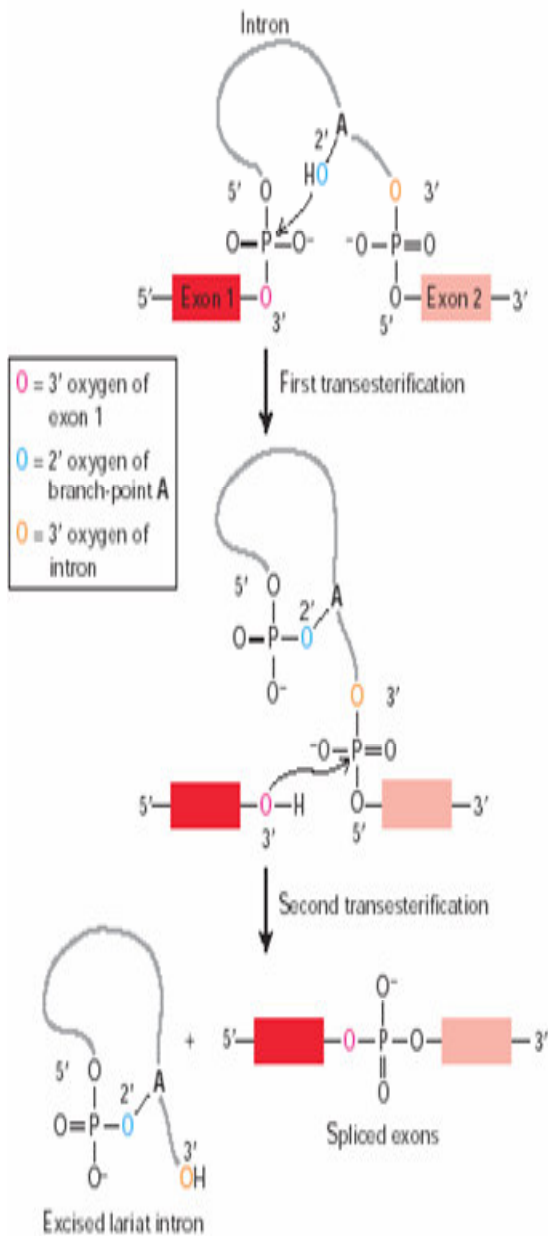
Em relação aos tRNAs não podemos dizer que:

- a) Ocorre uma ligação éster entre o carboxi-terminal do aminoácido e a extremidade 3'OH do tRNA;
- b) Cada tRNA é específico a um aminoácido, porém o aminoácido não é específico a um tRNA;
- c) ***O tRNA é formado de RNA e proteínas;***
- d) Uma única enzima é responsável pela ativação de todos os tRNAs de um aminoácido.

[3] Esquematize um pré-mRNA eucarioto contendo um intron e suas seqüências consenso, as etapas de processo de cis-splicing. Comente, por fim, o acoplamento transcrição processamento.



Seqüências Consenso em um pré-mRNA que determinam o início e fim de um intron.



O cis-splicing acontece em duas etapas:

- O spliceossomo (snRNP U1, U2, U4, U5, U6) se liga no intron ativando a adenina no sítio 3' do intron. Esse nucleotídeo ataca e cliva o sítio 5'.
- A extremidade OH livre da seqüência do primeiro éxon é adicionada ao início do segundo éxon (formando o laço) e cliva a molécula de RNA ligando os 2 éxons. O intron é liberado como um laço.

O mecanismo de splicing ocorre concomitantemente à transcrição gênica.\

Questão V/F

(F) Durante o splicing os nucleotídeos adenina e guanina, dos sítios de clivagem do intron fazem 3 ligações covalentes.

Questão com alternativas.

São regiões altamente conservadas que identificam um intron em pré-mRNAs eucariotos, exceto:

a) um GU no início do intron.

b) Uma seqüência palindromica de purinas no meio da seqüência.

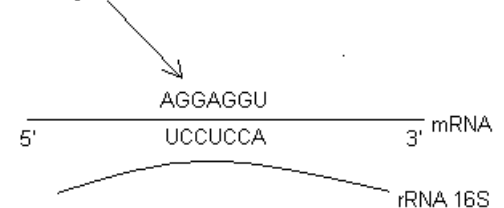
c) Um AG no final da seqüência.

d) Uma região rica em pirimidinas no final do intron.

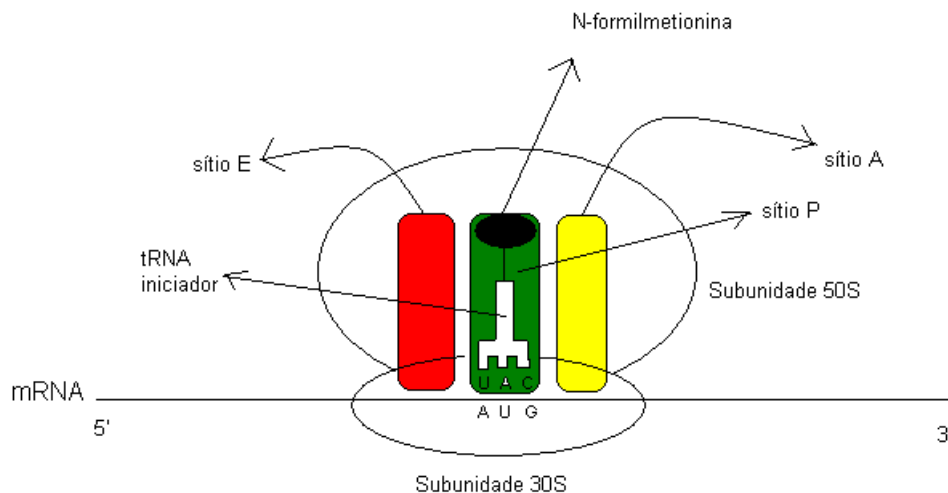
[4] Através de um desenho esquemático faça uma descrição do complexo de iniciação 70S de tradução em procariotos, indicando:

- todos os elementos que fazem parte do complexo;
- a interação códon-anticódon;
- o papel da seqüência de Shine Delgarno no mRNA;
- os sítios A, P e E no ribossomo.

Antes mesmo à formação do complexo 30S há o reconhecimento da seqüência Shine Delgarno.



A seqüência Shine Delgarno posiciona o tRNA iniciador associado a subunidade menor sobre o códon AUG, assegurando a correta matriz de leitura. Após a formação do complexo 30S há a ligação da subunidade grande como aquebra de um GTP.



QUESTÃO DO TIPO FALSO/VERDADEIRO.

Previamente à associação da subunidade maior à menor do ribossomo durante a fase de iniciação da tradução há quebra de um GTP. (Verdadeira).

QUESTÃO FECHADA.

Quanto ao processo de tradução:

a) Os fatores de extensão da cadeia, existentes apenas em procariotos, aumentam a eficiência da tradução.

b) O fator de liberação consiste em um tRNA desacilado.

c) O principal responsável pela catálise da ligação peptídica é o RNA ribossomal.

d) Uma aminoacil tRNA sintetase reconhece apenas um único anticódon correspondente a um determinado aminoácido.

[5] Descreva a etapa de elongação da cadeia polipeptídica. Qual é a enzima que catalisa a formação das ligações peptídicas?

Na fase de alongamento, os aminoácidos são adicionados em sucessão para criar uma cadeia polipeptídica. Após a montagem do ribossomo 80S contendo o primeiro aminoácido (metionina) no sítio P, um tRNA contendo o segundo aminoácido codificado pelo mRNA, se liga ao sítio A. Após uma alteração conformacional do ribossomo induzida pela hidrólise do GTP, a subunidade maior do rRNA pode ser responsável por catalisar a formação da ligação peptídica entre a Metionina e o 2º aminoácido. A hidrólise do GTP provoca outra alteração conformacional no ribossomo, que resulta na translocação de um códon sobre o mRNA, colocando o tRNA que já adicionou a metionina no sítio E; que é o sítio de saída, e o próximo tRNA, com o peptídeo ligado no sítio P. O próximo tRNA que chega carregando o 3º aminoácido se liga no sítio A, começando novo ciclo. A enzima que catalisa essa reação ainda não foi purificada, mas uma das hipóteses é que a responsável seja a peptidil-transferase.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

A enzima peptidil-transferase é uma ribozima presente na subunidade maior do ribossomo e catalisa a formação das ligações peptídicas. (V)

Questão fechada:

São elementos fundamentais para a etapa de elongação na tradução, exceto: (a resposta correta está em negrito)

- a) GTP
- b) EFs
- c) ATP**
- d) Mg²⁺

[6] Num dado experimento, foram obtidas duas populações de células, uma respondia a uma determinada substância a outra não. Explique como o Northern blot poderia ser utilizado para testar a hipótese de que essa diferença se deve a expressão ou não do gene que codifica para receptores dessa substância. Descreva como o experimento que é feito.

O experimento de Northern blot poderia ser realizado utilizando extrato de RNA total, obtidos dos dois tipos celulares. Realiza-se uma eletroforese em um gel, para separar os fragmentos de RNA por tamanho, em condições desnaturantes, na presença de formamida, para que o arranjo tridimensional do RNA não atrapalhe a sua posterior hibridização. Esses fragmentos são transferidos para uma membrana de nitrocelulose, para haver a sua imobilização, e incuba essa membrana com a sequência de DNA marcado referente ao gene que codifica os receptores da substância. O resultado é adquirido através de autoradiografia. Se a marcação aparecer só no extrato referente ao tipo celular que responde a substância, pode-se dizer que só nesses tipos celulares o gene que codifica o receptor dessa substância é expresso.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

Se em um experimento de Northern blot forem verificadas quantidades iguais de RNA provenientes de células submetidas a cultivos diferentes e o experimento de Western blot,

com extratos provenientes das mesmas células, apresentar níveis diferentes de proteínas pode-se dizer que há uma regulação pós-transcricional. (V)

Questão fechada:

Em células sob duas condições de cultivos diferentes foram verificadas quantidades diferentes de um determinado RNA. Com base nessas afirmações marque a alternativa verdadeira: (a resposta correta está em negrito)

a) Essas quantidades diferentes de RNA podem ser verificadas após um experimento de Western blot.

b) Esse resultado indica que pode haver uma regulação pós-transcricional.

c) O experimento realizado para verificar essas quantidades diferentes de RNA foi o Northern blot, e nele utiliza-se anticorpos para detectar os fragmentos desejados.

d) A eletroforese, que ocorre no experimento realizado, para verificar os níveis de um determinado RNA, é em condições desnaturantes. É utilizado material radiativo no processo de hibridização que ocorre também nesse experimento, que é chamado de Northern blot.

[7] Descreva o experimento de Western blot e explique como podemos determinar através deste experimento os níveis de uma determinada proteína em células sob condições de cultivo diferentes. Se os resultados desse experimento forem diferentes do resultado do experimento da questão 6, o que você poderia concluir?

Resposta: Western Blot consiste em hibridizar uma proteína específica do proteoma de um indivíduo com alguma sonda detectável, que pode ser anticorpos imunofluorescentes, radioativos ou ligados a alguma enzima capaz de alterar um substrato e formar cor. Nesse processo, o proteoma do indivíduo corre em um gel de poliacrilamida (que separa as proteínas por tamanho e peso molecular). Essas proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou nylon, essa transferência deve ser feita mediante ação de um campo elétrico devido ao alto peso molecular das moléculas. Esse processo facilita a hibridização, pois transfere as proteínas de um meio tridimensional que é o gel para um bidimensional que é a membrana. Nessa membrana é que é feita a detecção imunológica. Para determinar os níveis de determinada proteína em diferentes tipos celulares, ou em células cultivadas em meios diferentes, basta medir a fluorescência ou emissão radioativa depois da hibridização.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

A técnica de Western blot não utiliza anticorpos para detectar a proteína, em vez disso, compostos radioativos que alteram a cor do substrato são usados. (F)

Questão de múltipla escolha:

(a) A detecção do produto anticorpo-proteína é feita na membrana de celulose. (certo)

(b) Esse método pode ser usado para teste de HIV já que detecta o anticorpo anti-HIV no soro humano. (certo)

(c) A primeira etapa do método consiste em fazer uma eletroforese em gel de poliacrilamida para separar as proteínas por tamanho e peso molecular. (certo)

(d) A transferência das proteínas do gel para a membrana de celulose acontece espontaneamente, pois elas possuem um baixo peso molecular.

[8] Descreva em linhas gerais o procedimento que nos permite sintetizar moléculas de DNA contendo p 32 na cadeia polinucleotídica para serem utilizadas como sondas em

experimentos de hibridização. Indique todos os componentes da sua reação e como deve ser o substrato radioativo que deve ser adicionado a reação.

O processo que permite sintetizar sondas de DNA com P32 consiste em utilizar um conjunto de oligonucleotídios de sequência randômica com comprimento de nove MER como primer para iniciar uma reação de amplificação por PCR. Nessa reação utiliza-se um tipo de nucleotídeo com fosfato alfa radioativo (p32).

Preferencialmente deve-se utilizar ATP ou CTP radioativos devido à afinidade maior da DNA polimerase por essas duas moléculas, essa afinidade permite melhor aproveitamento dos nucleotídeos, reduzindo o desperdício e aumentando a qualidade da reação.

Durante o processo de síntese da molécula de DNA vários nucleotídeos radioativos serão incorporados na sequência, essa sonda marcada pode ser revelada após a hibridização com filme radiográfico.

São necessários para a reação:

1. DNA molde para o qual se deseja sintetizar a sonda
2. Nucleotídeos GTP ATP e TTP
3. Nucleotídeo CTP ou ATP com o fosfato alfa marcado radioativamente (P32)
4. Conjunto de iniciadores (oligonucleotídeos) de sequência randômica
5. Tampão de reação
6. Íon bivalente (cloreto de magnésio)
7. DNA polimerase (Taq)

Questão de falso ou verdadeiro:

Utiliza-se preferencialmente para a síntese de sondas radioativas nucleotídeos CTP e ATP com o fosfato alfa radioativo, pois a taq polimerase tem grande afinidade por essas moléculas.

Múltipla escolha:

Marque a alternativa correta levando em consideração a síntese de sondas de DNA radioativa para experimentos de hibridização:

- a) Preferencialmente utiliza-se CTP ou ATP com fosfato beta radioativos para a síntese de sondas.
- b) Devido à grande afinidade da taq polimerase pelo nucleotídeo TTP com fosfato radioativo, esse nucleotídeo é a melhor opção para a síntese de sondas radioativas.
- c) Um nucleotídeo utilizado na síntese de uma sonda de DNA deve ter o fosfato alfa radioativo, pois é esse fosfato que participa da ligação fósforo-diester.**
- d) Para a síntese de uma sonda de DNA é indispensável um par de iniciadores com o comprimento de pelo menos 20 MER complementares e específicos à sequência que se quer amplificar

[9] Descreva o experimento de nuclear run on e como podemos fazer para determinar se o controle da expressão de um gene ocorre a nível pós-transcricional.

O experimento *nuclear run on* consiste no isolamento do núcleo da célula e realização da transcrição *in vitro* na presença de ribonucleotídeos, inibidor de RNase e UTP radioativo para a incorporação no transcrito nascente. Posteriormente deve ser feita a purificação dos mRNAs e hibridização com sequências de cDNAs dos genes desejados em membrana de nitrocelulose.

Para verificar se o controle é pós-transcricional, deve-se analisar nos testes de Western Blot e Northern Blot diferenças nos níveis de proteína e mRNA respectivamente e, no *nuclear run on*, o resultado deve ser de uma concentração de mRNA igual nas amostras. Em outra

situação, em que o resultado do Northern Blot indicaria níveis iguais de mRNA e o *nuclear run on* indicaria níveis diferentes também é indicativa de controle pós-transcricional

Questão Falso/Verdadeiro

A obtenção de resultados em Western Blot indicando níveis diferentes de proteínas e no Northern Blot níveis iguais de mRNA indica que está ocorrendo um controle traducional, RESPOSTA: Verdadeiro.

Questão Fechada

Qual dos itens abaixo não está relacionado com controle pós-transcricional?

- a) Estabilidade do mRNA
- b) Elementos regulatórios em cis**
- c) RNAi
- d) Tradução do mRNA

[10] Descreva como podemos determinar a meia vida de um mRNA na célula.

Resposta

Podemos determinar a meia vida de um mRNA através da administração de uma droga que pára a transcrição, como a Actinomicina D, em uma cultura de células do tecido específico. Em seguida, quantifica-se o mRNA em intervalos específicos de tempo.

Questão do tipo verdadeiro ou falso

(F) Como o único ponto de regulação gênica em procariotos é o controle transcricional, os mRNAs possuem uma meia vida normalmente maior do que nos eucariotos.

Questão fechada com quatro alternativas

A comparação das meias vidas de um mRNA específico entre 2 tecidos diferentes faz sentido quando:

- a) Resultado \neq no Western Blot e resultado = no Northern Blot
- b) Resultado = no Western Blot e resultado = no Northern Blot
- c) Resultado \neq no Northern Blot e resultado = no Nuclear Run On**
- d) Resultado \neq no Northern Blot e resultado \neq no Nuclear Run On

[11] Compare a expressão de genes procarióticos e eucarióticos com relação a:

- a) Grau de acoplamento entre transcrição e tradução.
- b) Número de produtos gênicos em transcrito primário.
- c) Número de proteínas diferentes que surgem de um tipo de transcrito primário.
- d) Densidade de seqüências codificantes no DNA.
- e) Organização dos genes em operons.

Procariotos	Eucariotos
a) Alto acoplamento, já que não ocorrem em diferentes lugares na célula.	a) Baixo, já que a transcrição ocorre no núcleo e a tradução no citoplasma. Além da necessidade de processamento do pré mRNA.
b) Em procariotos existe RNA policistrômico, onde há mais de um produto gênico em um transcrito primário.	b) Não possui mRNA policistrômico, cada transcrito primário possui um produto gênico.

c) Não possui transcrito primário, o mRNA é obtido ao final da transcrição, ou seja, não há processamento de transcrito primário para obtenção de mRNA maduro. Analisando o mRNA policistrômico podemos verificar mais de uma proteína diferente sendo sintetizada a partir desta molécula única.	c) O transcrito primário sofre processamento que ocorre no splicing alternativo que podem gerar diferentes mRNA maduros em diferentes células que, ao serem traduzidos, originarão diferentes proteínas.
d) Alta devido à ausência de íntrons.	d) Baixa, devido à presença em grande quantidade de íntrons.
e) e) Presente como forma de controle transcricional.	e) Ausente com outras formas de controle transcricional.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

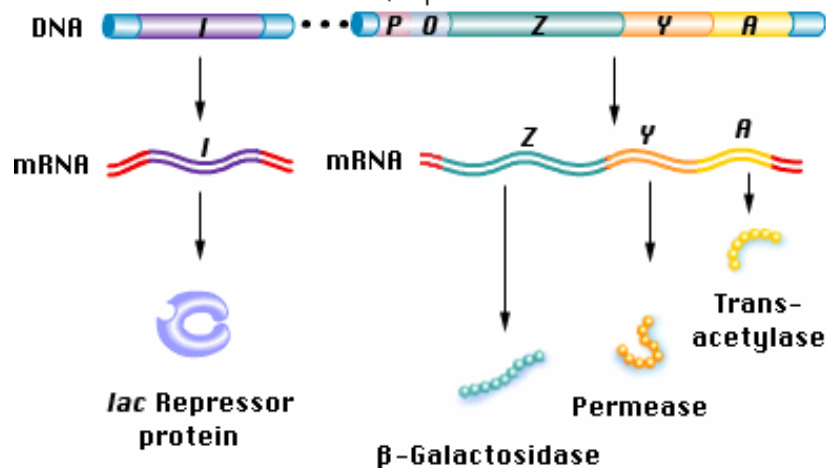
(F) As seqüências intrônicas em eucariotos (ausente em procariotos) não possuem função no genoma, não apresentam significado evolutivo.

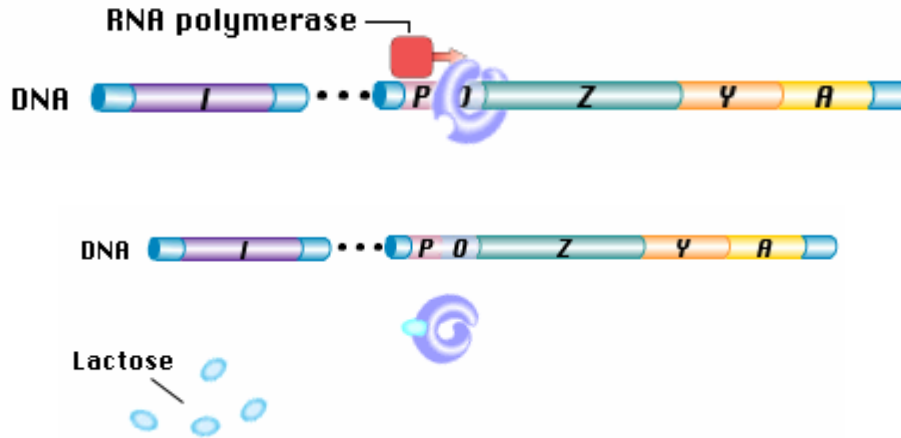
Questão fechada:

Sobre o processo de transcrição e processamento do pré mRNA, assinale a alternativa correta:

- a) A organização genômica em operons é característica de procariotos, não persistindo em eucariotos, demonstrando que é uma falha de controle transcricional.
- b) splicing alternativo não ocorre em procariotos, já que seu genoma possui apenas regiões codificantes.
- c) **A adição do CAP e da cauda poli A evita a ação de exonucleases que poderão degradar o mRNA.**
- d) A taxa de tradução para uma determinada proteína é controlada exclusivamente pela taxa de transcrição.

[12] Faça um desenho esquemático do operon lac indicando todos os elementos regulatórios em cis e os fatores que inibem a expressão destes genes.





Os elementos de regulação em *cis* são as regiões P (Promotor) e O (operador onde se liga a proteína repressora). A célula bacteriana preferencialmente utiliza energia proveniente da glicose, porém quando ela está em falta na célula, os níveis de cAMP se elevam e estes se ligam na proteína CAP que irá encaixar com maior eficiência a polimerase na região do promotor para iniciar a transcrição. Além disso quando a lactose está presente na célula, ela se liga à proteína repressora fazendo com que esta última se desligue da região do operador habilitando a polimerase a realizar a transcrição. As regiões Z, Y e A codificam as proteínas β -Galactosidase, Permease e Transacetilase respectivamente.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro:

(F) No *operon lac*, a proteína CAP está constantemente ligada a RNA polimerase, independentemente dos níveis de cAMP celular.

Questão fechada:

Qual dessas proteínas não é expressa por genes do operon lac:

- a) **Proteína repressora do operon lac**
- b) β -Galactosidase
- c) Permease
- d) Transacetilase

[13] Como o cAMP estimula o início da transcrição de muitos operons indutíveis?

Resposta: O cAMP pode estimular a transcrição através de sua interação com a proteína ativadora de catabolismo (CAP). Quando a CAP está associada ao cAMP ela passa para seu estado ativado e se liga em uma sequência específica acima da região promotora do operon em questão e provoca uma curvatura da região a qual ela se ligou. A RNA polimerase bacteriana consegue interagir com o complexo CAP-cAMP ligado a essa região e essa interação aumenta a afinidade da RNA polimerase a região promotora, o que aumenta a taxa de transcrição.

Questão do tipo Falso/Verdadeiro

(F) Altos níveis intracelulares de glicose induzem um aumento da expressão de operons regulados pela proteína CAP.

Questão fechada

Existe um análogo do CAMP chamado dibutilil cAMP que consegue atravessar a membrana citoplasmática, ao contrário do cAMP, e se ligar e ativar a proteína ativadora do

catabolismo (CAP). Tendo isso em mente, além do mecanismo de ativação da proteína CAP assinale a alternativa verdadeira:

() a) Em um meio com glicose, lactose e dibutilil cAMP com *E. Coli* será observado inicialmente um decaimento da concentração de glicose até níveis baixos e só depois disso a concentração de lactose começará a cair.

(X) b) Em um meio com glicose, lactose e cAMP com *E. Coli* será observado inicialmente um decaimento da concentração de glicose até níveis baixos e só depois disso a concentração de lactose começará a cair.

() c) A proteína CAP e o fator sigma da RNA polimerase não possuem funções biológicas parecidas.

() d) A regulação da transcrição dos genes do *operon lac* é exercida somente através da proteína CAP

[14] ?

[15] Descreva a técnica de Band-Shift

Essa técnica é utilizada quando se quer caracterizar uma proteína que se liga no DNA e pode ter função reguladora. Para tanto, DNA purificado marcado é incubado com extrato celular, contendo a proteína a ser estudada. A mistura é corrida em gel de poliacrilamida. O DNA não ligado a proteínas se localizará na parte de baixo do gel, enquanto as seqüências associadas a proteínas terão baixa mobilidade e ficarão retardadas no gel, podendo ser distintas das proteínas puras pela auto-radiografia. Podem surgir várias bandas no gel, demonstrando a presença de mais de uma proteína regulatória. As bandas podem ser recortadas no gel e a técnica de espectrofotometria de massa pode ser utilizada para descobrir a seqüência da proteína em questão.

Marque Verdadeira ou Falsa:

() A técnica de Band-Shift pode ser utilizada para auxiliar no estudo de elementos de regulação em cis de um gene. (Falsa)

() A técnica do Duplo Híbrido pode ser utilizada para identificar fatores de transcrição que interagem com outros fatores de transcrição. (Verdadeira)

() Um gene que é clivado por ambas as enzimas MspI e HpaII é um gene não metilado, enquanto que um gene que é clivado por MspI e não é clivado por MpaII é um gene metilado. (Verdadeira)

Marque a opção correta:

A técnica do *footprinting* é usada para evidenciar:

a) A velocidade de transcrição

b) Regiões do DNA que se ligam a proteínas

c) Se a cromatina encontra-se acetilada ou não

d) Se há ligação entre fatores protéicos de transcrição

[16] Suponha que você queira determinar se uma sequência presente em um gene humano tem um papel de ativar a transcrição deste gene. Qual experimento você deve fazer?

As seqüências de DNA regulatórias podem ser identificadas para qualquer gene por uma manipulação que envolve a fragmentação da região upstream ou downstream do gene e a ligação de cada um desses fragmentos à seqüência de um gene repórter, que não apresenta seu promotor. Para células eucarióticas as proteínas geralmente utilizadas como repórteres são as enzimas luciferase, β -galactosidase e a cloranfenicol-acetiltransferase (CAT). A

associação citada acima, fragmento de DNA-gene repórter, será introduzida em um plasmídeo. Os diferentes plasmídeos formados devem ser colocados na célula de estudo e, se houver expressão do gene repórter, fica evidente que o fragmento de DNA adicionado àquele plasmídeo é responsável por ativar a transcrição do gene.

VERDADEIRO OU FALSO

(F) A identificação de seqüência regulatória no promotor indica uma regulação em cis, no caso de regulação em trans pode-se usar os seguintes métodos para estudo: imunoprecipitação, band-shift e nuclear run on.

QUESTÃO FECHADA

Depois de identificar os elementos do gene que o tornam ativo deve-se procurar os fatores que se ligam a eles. Dos métodos listados abaixo todos podem ser utilizados para esse propósito, exceto:

- a) Foot-printing
- b) Northern blot (errada)**
- c) Band-shift
- d) Imunoprecipitação de cromatina