

GRUPO 1 – Teoria unificada da expressão gênica

- *Compare a expressão gênica de genes que são utilizados para a manutenção básica da célula, com genes que são usados para realizar uma rápida e curta ação, levando em conta a duração dos mRNA's e proteínas referentes a estes genes.*

Resposta: Os genes que apresenta expressão rápida e curta precisam se cuidadosamente regulados, por fatores de transcrição específicos, para serem expressos apenas quando necessário. Eles tendem a ter uma rápida transcrição e tradução. Os seus mRNA's, assim como suas proteínas, tendem a ter uma meia vida curta (são rapidamente degradados), permitindo que exerçam sua função apenas no intervalo de tempo necessário. Já os genes cuja expressão é utilizada para a manutenção básica da célula (housekeeping), precisam ser continuamente expressos e são vagarosamente induzidos. Os seus mRNA's, assim como suas proteínas, possuem uma meia vida longa. A sua transcrição e tradução é geralmente mais lenta que a dos genes de expressão rápida, e seus produtos possuem uma meia-vida mais longa – de forma que um mRNA possa ser traduzido mais vezes antes de ser degradado, por exemplo - podendo variar com as necessidades da célula.

- *“A transcrição, o processamento do pré-mRNA e a tradução são processos intimamente relacionados.” Critique esta afirmativa usando exemplos na sua justificativa.*

Resposta: A afirmativa está correta, estas fases estão relacionadas, sendo que acontecimentos em uma desencadeiam modificações ou induzem a realização das outras fases. Por exemplo, o aparato transcricional possui um papel ativo em recrutar a maquinaria que adiciona o CAP e processa o mRNA através do splicing que promove a alongação da transcrição. Além disso o splicing do pré-mRNA, a adição da cauda poli-A o packaging (empacotamento) do mRNA para a exportação ocorrem enquanto o transcrito está saindo da RNAP II. Se estes processos tiverem sido executados sem erro proteínas do poro nuclear exportarão o mRNA para o citoplasma onde ocorrerá a tradução. Isso prova que todos estes passos estão intimamente relacionados.

GRUPO 2 - Splicing Alternativo

- *Cite dois mecanismos que podem influenciar no aumento do proteoma durante a evolução.*

Resposta: Aumento no número de genes e splicing alternativo

Outras possibilidades de resposta: Elaboração de mecanismos pré-existentes, novos mecanismos, uso de diferentes sítios de iniciação da transcrição, poli-adenilação alternativa, edição do pré-mRNA, modificações pós-transcricionais.

- *O que é o Slipeceossomo?*

Resposta: É um complexo ribonucleoproteico multi-unitário, composto por snRNAs e proteínas (proteínas SR). Está acoplados ao CTD (RNA polII) e é responsável por reconhecer certas seqüências consenso nas divisas entre exon-intron e no interior de cada intron importantes no processo de splice.

GRUPO 3 - Metodologia SAGE

- *Faça uma comparação entre o SAGE e o microarranjo no que se refere ao estudo da expressão gênica.*

Tanto o SAGE quanto o microarranjo são capazes de fornecer uma visão da expressão gênica da célula em um determinado momento. Porém, o método utilizado para esse fim é diferente nos dois métodos, o que reflete em diferenças nos dados obtidos.

O SAGE é capaz de detectar transcritos provenientes de genes desconhecidos, pois a produção da tag é independente do conhecimento de sua seqüência. O microarranjo não consegue detectar isso, pois é necessário o conhecimento prévio do gene para a construção do chip de DNA. Da mesma maneira, o SAGE também consegue detectar mRNAs provenientes de splicing alternativo. Isso pode ocorrer ou não no microarray, dependendo da capacidade do cDNA conseguir se hibridizar com o fragmento do gene presente na placa.

O microarranjo fornece dados que permitem comparar uma condição celular com outra. Assim, ele fornece uma medida relativa da expressão gênica. Já com o SAGE é obtida uma medida absoluta, que são os dados da expressão individual de uma célula (por exemplo, o microarranjo fornece dados do tipo: “o gene X é mais expresso em tecidos normais do que em tecidos cancerosos”. O SAGE fornece informações do tipo: “O gene X é mais abundante na célula do que o gene Y”)

A sensibilidade do SAGE é maior do que a do microarranjo, pois tags de genes raros podem ser detectadas, enquanto que a fluorescência emitida pelo mesmo gene no microarray pode ser muito baixa e, por isso, não detectada.

Quanto a especificidade, ela é maior para o microarranjo, aonde é necessário que haja uma hibridização entre o cDNA e o fragmento do gene. O SAGE é menos específico porque uma tag pode corresponder a mais de um gene.

O SAGE detecta o transcrito como uma seqüência (tag) e a quantidade de tags é usada para quantificar o transcrito. No microarranjo ele é detectado como um sinal de fluorescência e a intensidade desse sinal é utilizada para quantificar a expressão daquele gene. E, finalmente, o SAGE é cerca de 5 vezes mais caro que o microarranjo.

Os dois métodos possuem vantagens e desvantagens. A escolha entre um e outro vai depender do objetivo do estudo e dos recursos disponíveis para tal.

- *Quais as principais utilidades da SAGE, quais são as vantagens e limitações do método?*

SAGE é um método utilizado no estudo do transcriptoma, que possibilita a identificação e quantificação de transcritos do genoma de eucariotos, uma das principais aplicações da SAGE é na comparação da expressão gênica entre estados patológicos ou fisiológicos distintos. O método possui uma boa sensibilidade para transcritos raros e não requer conhecimento prévio dos mesmos, portanto é capaz de detectar tanto transcritos conhecidos quanto desconhecidos, além de ser um dos processos mais baratos. No entanto, o pequeno tamanho da tag limita a especificidade do método, o que dificulta sua utilização na procura por seqüências conhecidas de transcritos com o intuito da identificação de genes. Além disso, quanto menor a abundância do transcrito, menor é a confiabilidade dos resultados, pois existe uma grande probabilidade de ocorrerem erros experimentais, que comprometam a análise dos dados.

GRUPO 4 – P bodies

- *O que são os P bodies e quais suas funções?*

São corpos processadores de mRNA e estão envolvidos na repressão traducional, silenciamento, controle de qualidade e degradação do mRNA.

- *Qual a relação entre P bodies e silenciamento?*

Em muitos casos o miRNA e siRNA, ao invés de serem clivados pela proteína Argonata, são direcionados para a maquinaria de degradação do mRNA – P bodies. A Argonata pode estar associada a enzimas decapping e deadenilases no complexo dos P bodies.

GRUPO 5 – Reprogramação celular

- *Qual é a relação dos complexos protéicos PcG com o processo de transdiferenciação celular?*

Os complexos PcG atuam impedindo a transcrição das regiões do DNA às quais se associam. Dessa forma, uma inibição ou redução da atividade das proteínas componentes desse complexo permite que certas regiões do DNA, não transcritíveis anteriormente, se tornem passíveis de transcrição. Com a expressão de genes que antes não eram expressos, abre-se caminho para que a célula possa assumir novas características e funções, o que é essencial para a ocorrência da transdiferenciação.

- *O complexo PRC2 está presente tanto em plantas como em animais. Porém, PRC2 de células de animais é diferente do de células de plantas. Explique.*

Em animais, há presença tanto do complexo PRC1, quanto do PRC2, sendo que esses complexos policomb agem em conjunto no silenciamento de regiões do DNA, da seguinte forma: PRC2 deposita marcas epigenéticas no DNA, as quais são então reconhecidas pela PRC1 que se liga e age bloqueando a transcrição nas regiões marcadas. Já nas plantas, não há presença do complexo PRC1. Então, o processo de silenciamento gênico ocorre da seguinte forma: PRC2 se liga ao DNA e bloqueia por si própria a transcrição na região à qual se ligou. Em linhas gerais: PRC2 de plantas realiza, sozinho, uma função que, em animais, é desempenhada pelos dois complexos policomb (PRC1 e PRC2) associados.

GRUPO 6 - DNA barcoding

- *DNA barcoding utiliza uma seqüência curta de DNA de uma posição estipulada e padronizada do genoma (ex: região específica de um gene) como uma forma de diagnóstico molecular para identificação de espécies. Existe alguma região gênica mais utilizada? Se existe, dê o nome e posição dessa região, vantagens e desvantagens do seu uso.*

Várias regiões gênicas já foram utilizadas para biosistemática ao nível de espécies, mas um fragmento da extremidade 5' da subunidade 1 do gene mitocondrial citocromo c oxidase (COI), ganhou a nomeação de região de barcode para a maioria dos grupos animais. A COI tem comprimento aproximado de 650 pb na maioria dos grupos e é ladeada por seqüências conservadas, sendo, por isso, relativamente fácil de ser isolada e analisada.

Por se tratar de uma seqüência do genoma mitocondrial, as vantagens da utilização da COI vêm das características do próprio genoma, que são: evolução rápida, alto número de cópias por célula (bom para técnicas moleculares), herança uniparental (não sofre recombinação), dentre outras. No entanto, a utilização de um gene mitocondrial também traz algumas desvantagens, como: não é eficiente na identificação de híbridos, não aponta fluxo gênico levado pelo macho (por se tratar de herança uniparental), pode não evoluir rápido o suficiente para fornecer resolução ao nível de espécie, como nas plantas, dentre outras. Nestes casos, e em outros nos quais a COI não se mostra uma região eficiente de barcode, marcadores alternativos estão sendo procurados.

- *Apesar de não substituir as análises taxonômicas completas, o DNA barcoding é uma ferramenta valiosa para a taxonomia. Explique o porquê.*

DNA barcoding pode facilitar significativamente as análises taxonômicas convencionais, uma vez que organiza espécimes em grupos geneticamente divergentes de uma maneira rápida. Além disso, a análise convencional, que usualmente requer o agrupamento de dados morfológicos e ecológicos, pode variar para diferentes grupos taxonômicos (ex.: identificação taxonômica de pássaros e peixes requer métodos e habilidades), enquanto a análise por meio de barcodes pode ser aplicada de uma maneira mais ou menos padronizada para domínios de vida mais amplos (ex.: todo o táxon animal).

GRUPO 7 – Tradução no núcleo

- *Porque a presença do NMD (nonsense-mediated decay) no núcleo pode ser um indicio da ocorrência de tradução nuclear?*

O NMD é um processo de reconhecimento e degradação de mRNAs com PTC (códon de parada prematuro). Até o momento, a única estrutura conhecida capaz de detectar esses PTCs é o ribossomo, e essa detecção é feita por meio da tradução. Dessa forma, acredita-se que para o NMD acontecer é necessária a ocorrência de tradução. Sendo assim, a presença do NMD no núcleo leva a crer que exista uma certa quantidade de tradução nuclear.

- *Em procariotos, é consenso que a transcrição e a tradução são processos acoplados. Agora, estudos mostram que esse acoplamento também pode ocorrer no núcleo de eucariotos. Um indicio para isso é a colocalização entre fatores de tradução, proteínas ribossômicas, proteínas envolvidas no splicing e subunidades da RNA polimerase II no núcleo, juntamente com a síntese de pequenos peptídeos. Essa colocalização sugere que a síntese, o processamento e a verificação do mRNA se organizam como uma linha de montagem ao longo do domínio c-terminal da RNA Pol II.*

A) Explique as possíveis vantagens do acoplamento da produção, processamento e verificação do mRNA.

B) Tendo em mente a estrutura de uma linha de montagem industrial, indique a seqüência mais plausível para a ocorrência do splicing, síntese do pré-mRNA, formação do cap 5', verificação do mRNA, adição da cauda poli A e destruição dos

transcritos incorretos. Aponte durante qual processo ocorrerá a síntese de polipeptídeos.

A) O acoplamento entre a produção, processamento e verificação do mRNA nos sítios de transcrição aumenta a velocidade das reações, uma vez que a maquinaria necessária para a ocorrência desses processos fica concentrada no mesmo local. Assim, o encontro do mRNA com os fatores de processamento é facilitado e transcritos defeituosos são imediatamente degradados, diminuindo a chance deles não serem detectados e passarem para o citoplasma. Além disso, com o acoplamento é possível interligar a regulação dos três processos, com a possibilidade de pontos alternativos de controle da transcrição.

B) Síntese do pré-mRNA - formação do cap 5' - adição da cauda poli A - splicing - verificação do mRNA - destruição de transcritos incorretos >>> Síntese de polipeptídeos

GRUPO 8 – RNAi

- *Por quê o fenômeno de interferência requer RNA de fita dupla para silenciar um gene?*

Resposta: Porque o RNA dupla fita adota hélice na forma A, com fendas mais profundas e estreitas que a forma B (adotada pelo DNA), impedindo o acesso de proteínas degradativas o que o torna mais estável. Além disso, a DICER é uma enzima RNA específica e a Argonata 2 (AGO2, parte do complexo RISC) requer hélice na forma A.

- *Após a formação do complexo RISC, quais são o 2 tipos de pareamento entre RISC e o RNA alvo?*

Resposta: Pareamento perfeito: ocorre clivagem do mRNA alvo pela AGO2 e liberação dos produtos para novo ciclo enzimático. Geralmente ocorre com siRNAs. Pareamento imperfeito: não ocorre clivagem. O mRNA fica preso ao RISC e há impedimento físico da tradução. Geralmente ocorre com miRNAs.