Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da USP
BIO0307 - Biologia Molecular para o Bacharelado
M6 - Desafios Experimentais – 2017

- 1) Proponha um protocolo de estudo molecular que permita determinar se genes **específicos** dos autossomos de camundongos têm expressão monoalélica ou bialélica. Utilize o PubMed para:
 - a. Descobrir um artigo científico em que essa estratégia tenha sido utilizada. Como vocês fizeram essa busca? Qual foi a contribuição conceitual desse artigo em relação à expressão gênica que ocorre em organismos diploides?
 - b. Identificar um artigo em que foi estudado se genes específicos do cromossomo X humano têm inativação aleatória ou desviada na placenta, com metodologia semelhante. Como foi feita essa busca no Pubmed? Qual foi o resultado encontrado?
- 2) Archaea e bactérias possuem um sistema de defesa que culmina na degradação de material genético exógeno. Este sistema baseia-se na expressão do loco CRISPR (do inglês, *Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats*), que possui blocos de sequências repetitivas em tandem separados por sequências únicas, espaçadoras (do inglês, *spacer*). Explique:
 - a. Como a expressão do loco CRISPR favorece a degradação do material genético exógeno (ex. de bacteriófago) na bactéria?
 - b. Quais as possibilidades de utilização do sistema CRISPR por empresas de biotecnologia para modificar o genoma de eucariotos?
- 3) FOXP1 é um fator de transcrição de mamíferos, cujo transcrito primário sofre *splicing* alternativo de dois éxons (18a e 18b) mutuamente excludentes, produzindo, como consequência, duas isoformas proteicas distintas.
 - a. Explique as diferenças entre as duas isoformas de FOXP1 (FOXP1 e FOXP1-ES) relacionadas à sua produção.
 - b. Apresente um experimento que permita avaliar se a expressão dos éxons 18a e 18b está relacionada com pluripotência celular. Para isso, você deve utilizar células-tronco embrionárias humanas.
- 4) Suponha que você deseja investigar se a metilação anormal do DNA na região promotora de um gene está relacionada à causa de uma doença.
 - a. Explique quais técnicas podem ser usadas para responder a essa questão e como você organizará seu experimento.
 - b. Sua resposta é a mesma se você tiver que investigar alteração da metilação do DNA no promotor de centenas de genes simultaneamente?
- 5) Um prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi concedido em 2007 a Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans e Oliver Smithies por trabalho relacionado ao uso de células-tronco embrionárias.
 - a. Explique exatamente qual é o procedimento que foi premiado e qual sua importância no estudo da função gênica.
 - b. Explique como esse procedimento pode ser utilizado no processo de obtenção de um camundongo “nocaute” em que o gene fique inativado somente em células neuronais.
- 6) (1) Transferência de DNA a uma membrana; (2) Digestão com enzimas de restrição; (3) Hibridação em “Southern-blot” com sonda do gene da insulina; (4) Extração de núcleos de células pancreáticas; (5) Extração de DNA; (6) Análise em gel das amostras de DNA; (7) Digestão com nuclease micrococcal.
 - a. Ordene corretamente os passos experimentais acima, necessários à análise do posicionamento dos nucleossomos na região promotora do gene da insulina.
 - b. Explique quais seriam os resultados esperados do experimento no caso de posicionamento específico dos nucleossomos.
 - c. E no caso de posicionamento aleatório dos mesmos?