

Questões de Biologia Molecular I – Transcrição e tradução.

Discutir em grupos de no máximo 4 alunos. Entregar relatório.

1. A sequência de DNA abaixo será transcrita. A região contida no Box 01 codifica um sítio de ligação ao ribossomo, enquanto as sequências do Box 2 e 3 (negrito) se referem aos íntrons deste gene. Com base nestas informações responda as questões abaixo.

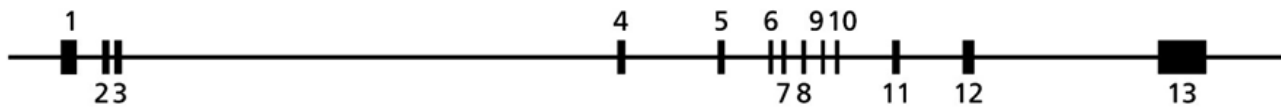
Box 01  Box 02 Box 03

5' - ATAGCCGGCTACATGCGTGGCGCGGTATGCGCTGATAGGGATGATGCCGGCTTGAGCCTGAGACT - 3' - Sense

3' - TATCGGCCGATGTACGCCCCGCGCGCATACGCGACTATCCCTACTACGGCCGAACTCGGACTCTGA - 5' - Antisense

- a) Qual a sequência do RNAm maduro? (0,02)
- b) Qual a sequência de aminoácidos da proteína? (0,02)
- c) Qual será a sequência da proteína se ocorrer uma deleção do 15º par de bases do DNA (seta vermelha) deste gene? E se ocorrer uma inserção de um par A/T logo após esta posição, qual será a sequência da proteína codificada por este gene? Qual mutação será potencialmente mais danosa à função da proteína? (0,0)
- d) De que forma uma mutação no sítio de ligação ao ribossomo pode afetar a expressão do gene? Explique. (0,5)
- e) De que forma uma mutação no intron (Box 2 ou 3) pode alterar a expressão de um gene? (0,05)
2. A proteína (hipotética) sorrissina é encontrada apenas em algumas pessoas alegres. Verifica-se que as pessoas de uma família que vivem de mau humor não sintetizam sorrissina. Analisando algumas pessoas dessa família, você encontra que, em comparação às pessoas alegres, o RNAm que codifica essa proteína em indivíduos mal humorado é 173 bases menor. Caracterizando este gene, você observou que a região deletada é interna no RNAm. Na análise do DNA, você verifica que a diferença entre os alegres e mau humorados é de apenas um nucleotídeo, e essa alteração ainda está dentro de um intron. (0,1)
- A. Elabore uma hipótese para explicar o mecanismo molecular de como uma mutação de um único nucleotídeo pode gerar uma deleção interna do RNA de 173 nucleotídeos?
- B. Assumindo que essa região de 173 nucleotídeos é parte da região codificadora da proteína, qual deve ser a consequência dessa deleção para a proteína sorrissina?
3. O gene da tropomiosina humana apresenta processamento (*splicing*) alternativo para produzir várias moléculas de RNAm em diferentes tecidos (figura 3). Para todas as formas de RNAm, a sequência da proteína é a mesma para o exons 1 e 10. Os exons 2 e 3, assim como os exons 7 e 8, são alternados dependendo da célula. (0,1)

(A) HUMAN α -TROPOMYOSIN GENE



(B) SPLICE VARIANTS

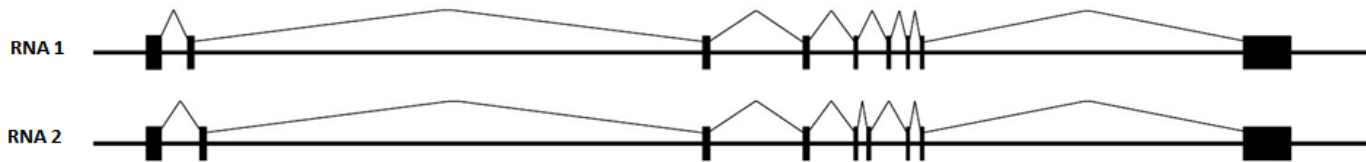


Figura 3: Representação do gene da tropomiosina humana. (A) estrutura do gene, sendo que as regiões maiores representam os introns e as numeradas os exons; (B) esquema alguns dos RNAs mensageiros produzidos, indicando os RNA removidos pelo processamento com a linha mais fina.

- Indique qual a sequência de exons finais na molécula do RNAs 1 e 2. (0,02)
- Que características devem ter os exons 2 e 3, e também os éxons 7 e 8, para que as sequências das proteínas codificadas pelos dois RNAs seja similares no início (exon 1) e final (exon 10)? Por quê? (0,08)

- Quando as RNA polimerases de eucariontes foram inicialmente caracterizadas, 3 picos (picos 1, 2 e 3) de atividade de polimerização eram normalmente observados a partir de extratos celulares fracionados em colunas de cromatografia (figura 4A). Não estava claro se esses picos representavam 3 proteínas distintas, ou 3 formas da mesma RNA polimerase. Experimentos de medida de atividade de polimerase com 1 $\mu\text{g/ml}$ ou 10 $\mu\text{g/ml}$ da substância α -amanitina (obtida a partir do cogumelo venenoso *Amanita phalloides* - figura 4B) tiveram os resultados mostrados na figura 4. Esses resultados indicam que os eucariontes apresentam diferentes RNA polimerases, ou diferentes formas de uma mesma polimerase? Explique sua resposta. (0,1)

(A) COLUMN CHROMATOGRAPHY

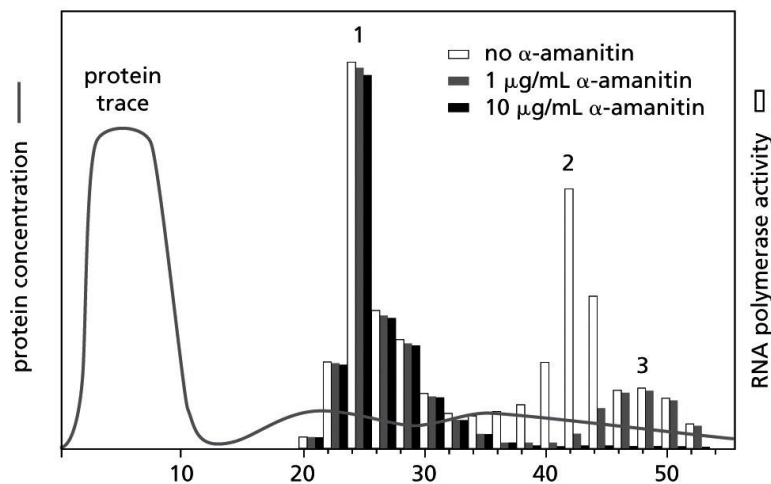


Figure 6-14 MBoc5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

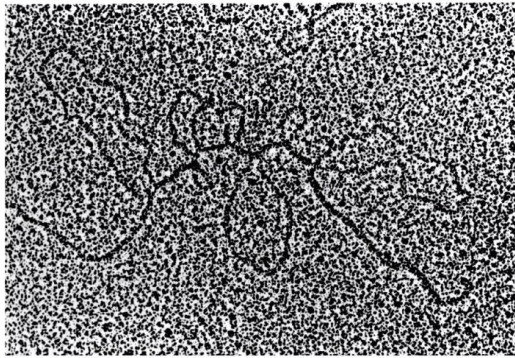
(B) DEADLY MUSHROOMS



Figura 4. Caracterização de atividades de RNA polimerase de célula eucarionte. (A) Após fracionamento em uma coluna de cromatografia, perfil proteico e de atividade de RNA polimerase em diferentes concentrações de amanitina. (B) figura representando o cogumelo de onde é extraída essa substância.

- A estrutura de exons-introns de genes eucariontes foi uma informação inesperada pelos pesquisadores da época. Os dados mais convincentes eram visuais como o representado na figura abaixo, imagem da hibridação de um longo pedaço de DNA do gene da ovoalbumina, com o respectivo RNA mensageiro. Para pesquisadores habituados a diferenciar moléculas duplas e simples fitas, a imagem demonstrava a descontinuidade do gene. Quantos íntrons e quantos éxons este gene possui? (0,04)

(A) ELECTRON MICROGRAPH



(B) INTERPRETATION

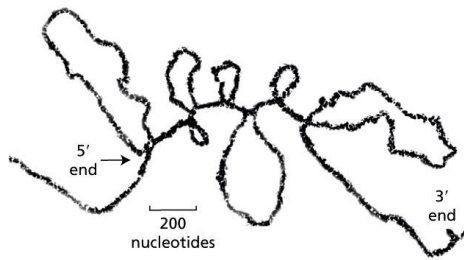


Figure 6-17 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

Híbrido entre o gene da ovoalbumina DNA e RNA mensageiro correspondente. (A) foto de microscópio eletrônico; (B) mesma foto com a eliminação de background.

Esses problemas foram elaborados tendo como base o livro: *Molecular Biology of the Cell, fifth edition. The Problems Book. John Wilson e Tom Hunt.*

6. Indicar a tradução da sequência de RNA abaixo em aminoácidos, nos três quadros de leitura possível (use o código genético apresentado no final desses exercícios). Este quadro de leitura é na verdade a parte interna de uma proteína grande. Qual desses quadros de leitura é provavelmente o correspondente para essa proteína? Por que? (0,05)

5'-AGUCUAGGCACUGA-3'

7. Após o tratamento de bactérias com um agente mutagênico, você seleciona dois mutantes em um determinado gene. Na mesma posição da proteína codificada por este gene, um deles carrega uma alanina e outro carrega metionina, nos dois casos substituindo uma valina na proteína selvagem. Você faz novamente o tratamento desses mutantes com agente mutagênico e obtém dois novos mutantes, agora com treonina (figura 1). (0,06)
- Usando a Tabela do código genético, e assumindo que essas mutações envolvem em cada passo substituição de um único nucleotídeo, deduza os códons de cada um dos quatro mutantes.
 - Em cada caso indique que tipos de mutações foram essas (transição ou transversão)?
 - Seria possível obter uma mutação que gerasse treonina (a partir de valina) em apenas um passo? Por que?

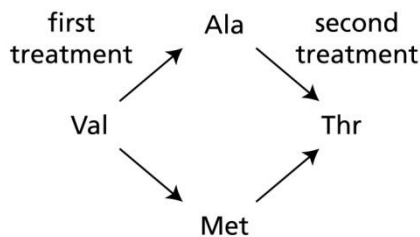


Figure 6-27 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

Figura 1. Geração de duas etapas de mutagênese e a alteração de aminoácido em uma única posição de uma proteína.

8. O código genético foi decifrado em parte por experimentos nos quais polinucleotídeos de sequências repetitivas foram usadas como RNA mensageiros para direcionar a síntese proteica em extratos celulares. No tubo de ensaio, condições artificiais permitem que as proteínas sejam iniciadas em qualquer posição da molécula de RNA, sem necessidade do códon de início (*start codon*), como é necessário na célula. Que tipo de polipeptídeos você esperaria obter se fossem usados os seguintes polinucleotídeos em tais condições? (0,05)
- UUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU...
 - AUAUAUAUAUAUAUAUAUAUA....
 - AUCAUCAUCAUCAUC....

9. Imagine uma mutação que envolva substituição (troca de um por outro nucleotídeo) em um único nucleotídeo de um gene. Em qual posição de um códon (1ª, 2ª ou 3ª base) há mais chances de se obter troca de aminoácido e por que? (0,05)
10. O gene supressor bacteriano *supF* codifica um RNA-transportador (t-RNA) que codifica uma tirosina no códon de parada UAG (âmbar). Isso permite a célula suprimir uma mutação em outros genes, eventualmente revertendo o fenótipo selvagem. (0,1)
- Explique que tipo de mutação é revertido e como pode funcionar esse tipo de supressão genética.
 - Que tipo de mutação ocorre na molécula do t-RNA *supF*?
 - Quais as consequências da presença de um t-RNA *supF* na tradução das proteínas normais da bactéria?
11. Codons de terminação em bactéria são decodificados pelas proteínas RF1 (*release factor 1*, que reconhece UAG e UAA) e RF2 (*release factor 2*, que reconhece UGA e UAA). Quando foi identificada a sequência do gene RF2, a comparação com a sequência de aminoácidos revelou uma surpresa, contida na figura 2. As sequências foram checadas minuciosamente para eliminar possíveis artefatos. (0,1)
- Qual a surpresa?
 - Formule uma hipótese de regulação da síntese de RF2, que possa explicar porque foi evolutivamente selecionado esse tipo de observação.

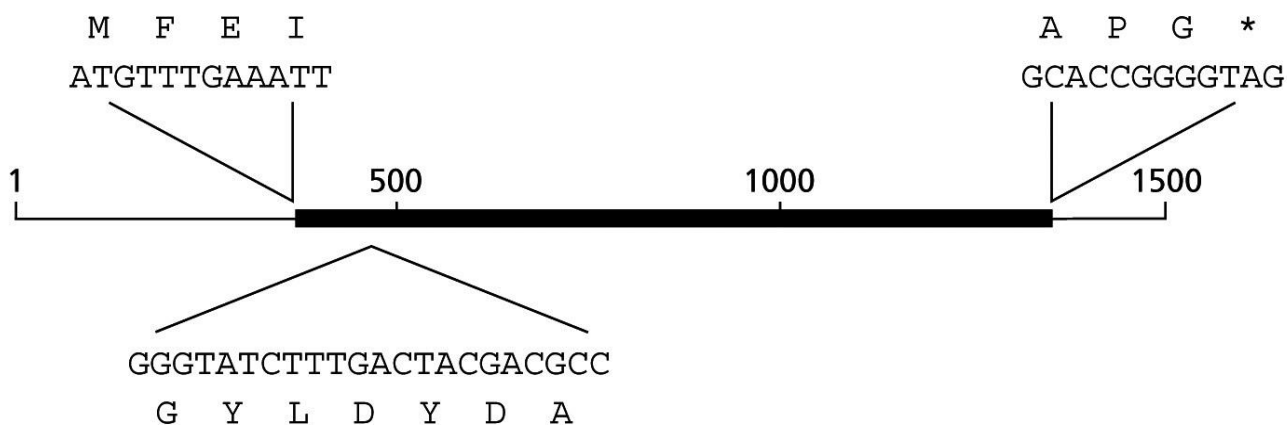


Figure 6-34 MBoC5: The Problems Book (© Garland Science 2008)

Figura 2. Representação esquemática do gene que codifica a proteína RF2. A sequência codificadora é representada com uma linha mais forte, e são mostradas as sequências de início e fim da proteína.

O código genético:

		Second letter				Third letter
First letter		U	C	A	G	
	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	

Amino acid	Three letter code	One letter code
alanine	ala	A
arginine	arg	R
asparagine	asn	N
aspartic acid	asp	D
asparagine or aspartic acid	asx	B
cysteine	cys	C
glutamic acid	glu	E
glutamine	gln	Q
glutamine or glutamic acid	glx	Z
glycine	gly	G
histidine	his	H
isoleucine	ile	I
leucine	leu	L
lysine	lys	K
methionine	met	M
phenylalanine	phe	F
proline	pro	P
serine	ser	S
threonine	thr	T
tryptophan	try	W
tyrosine	tyr	Y
valine	val	V

Esses problemas foram elaborados tendo como base o livro: *Molecular Biology of the Cell*, fifth edition. The Problems Book. John Wilson e Tom Hunt.