

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

QBQ-136 - Biologia Molecular
Medicina Veterinária 2023



DOCENTE RESPONSÁVEL:

Bettina Malnic

MONITORES:

Rafaela Reis Vieira
Natália Emerim Lemos

HORÁRIO DAS AULAS: 4ª - feiras, das 8:00h – 12:00h, sala 616 - Bloco 6 inferior

ORGANIZAÇÃO DA DISCIPLINA:

A disciplina compreende aulas teóricas, períodos para resolução e discussão de exercícios, aula prática, leituras de suporte e uma atividade a ser entregue e apresentada ao final do curso. O curso está estruturado de forma que todas as atividades estarão disponíveis na plataforma e-disciplinas (<https://edisciplinas.usp.br/acessar/>).

Grupos: Os alunos se dividirão em grupos. Os mesmos grupos serão usados para resolução de listas de exercícios, aula prática e realização do trabalho.

Exercícios e leitura de suporte: a cada aula será fornecida uma lista de exercícios que deverá ser resolvida e entregue no prazo de uma semana como atividade *em grupo*. Uma indicação de leitura também será apresentada.

Atividade em grupo: Os grupos deverão realizar a atividade *Bacterial ID Virtual lab* https://media.hhmi.org/biointeractive/vlabs/bacterial_id/index.html e entregar um formulário de questões preenchido, como especificado no cronograma.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO:

A avaliação será feita através das notas obtidas nas **provas (P1 e P2), e atividades realizadas em grupo (AG)** de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Nota final} = \frac{(P1 \times 2) + (P2 \times 4) + (AG \times 1)}{7}$$

Os alunos que não atingirem média final $\geq 5,0$, porém atingirem média $\geq 3,0$ e 75% de frequência poderão realizar a prova de Recuperação, que tem peso 2. Se a média for menor que 3, o aluno está reprovado. A frequência obrigatória mínima às aulas é de 75%.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA:

- 1) Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts e Walter - Molecular Biology of the Cell
- 2) Berg, Tymoczko & Stryer – Bioquímica
- 3) Lehninger, Nelson & Cox - Lehninger Principles of Biochemistry
- 4) Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky & Darnell - Molecular Cell Biology
- 5) Watson, Myers, Caudy & Witkowski - DNA recombinante: Genes e Genomas
- 6) Zaha, Arnaldo – Biologia Molecular Básica

Edições de alguns destes livros podem ser recuperadas de:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

CRONOGRAMA QBQ 136 - 2023

BIOLOGIA MOLECULAR – MEDICINA VETERINÁRIA

09/08	Introdução ao curso. Estrutura e função de ácidos nucleicos. Exercícios I
16/08	Compactação do material genético: Cromatina. Exercícios II
23/08	Replicação de DNA. Exercícios III
30/08	Lesão e reparo de DNA. Exercícios IV
06/09	<i>Semana da Pátria – Não haverá aula</i>
13/09	Transcrição e processamento de RNA. Exercícios V
20/09	Tecnologia do DNA recombinante. Exercícios VI
27/09	PROVA 1
04/10	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Sequenciamento de DNA. Exercícios VII e VIII
11/10	Tradução e código genético. Exercícios IX
18/10	Regulação da expressão gênica em procariotos. Modelo do operon em bactérias. Exercícios X. Entrega da atividade: <i>Bacterial ID Virtual lab.</i>
25/10	Regulação da expressão gênica em eucariotos. Exercícios XI
01/11	Controle epigenético e pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos. RNA interferente e silenciamento gênico. Exercícios XII
08/11	Engenharia genética e animais transgênicos. Edição de genomas - CRISPR-Cas. Exercícios XIII
15/11	<i>Proclamação da República- Não haverá aula.</i>
22/11	Aula Prática: (1) Qual é o seu genótipo? Uma análise usando PCR (2) Plasmídeos: extração e digestão.
29/11	PROVA 2 Entrega do relatório da aula prática até no máximo dia 06/12
20/12	Prova de Recuperação

EXERCÍCIOS I

Estrutura e Função de Ácidos Nucleicos

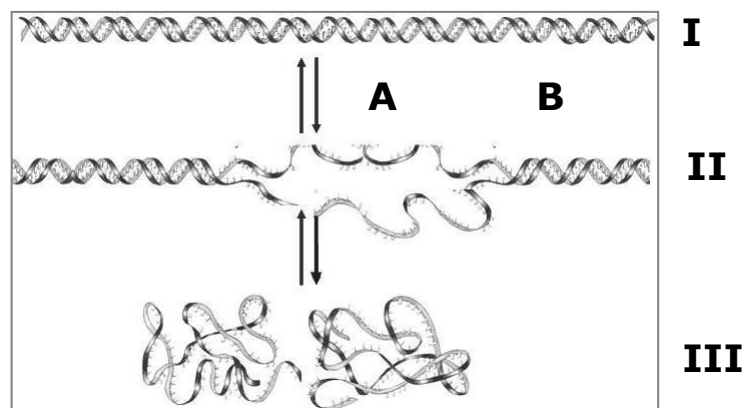
1. Quais as diferenças de composição e estrutura entre RNA e DNA. Como se distingue entre uracila e timina, e entre ribose e desoxirribose?
2. Como é chamada a ligação covalente que une dois nucleotídeos consecutivos nas moléculas de ácidos nucleicos? Esquematize essa ligação.
3. Escreva a seqüência de bases da fita complementar do DNA fita-dupla que apresenta uma cadeia com a seqüência:
(5') ATGCCGTATGCATTGCATTC (3')

Exprima, em porcentagem, a composição de bases do DNA fita-dupla. Que tipos de interações químicas estão envolvidas entre as cadeias de DNA nesta molécula.

4. Uma molécula de ácido nucleico tem a composição de bases abaixo. O que você pode afirmar sobre ela?

$$C = 24,1\% \quad G = 18,5\% \quad T = 24,6\% \quad A = 32,8\%$$

5. Explique por que ácidos nucleicos são desnaturados quando submetidos a alta temperatura ou pH alto? Uma molécula de DNA desnaturada por aquecimento pode ser renaturada? Como?
6. A figura abaixo representa conformações de DNA em diferentes temperaturas (I, II, III). Qual conformação tem absorbância relativa mais alta a 260nm? Qual segmento da molécula tem provavelmente maior conteúdo de guanina e citosina? O aumento do tamanho de segmento **A** em relação ao segmento **B** teria algum efeito sobre T_m na curva de fusão?



7. Combine os organismos listados na coluna da esquerda com a quantidade correta de DNA do seu genoma haplóide na coluna da direita.

<i>E. coli</i> (bactéria)	(1) $1,7 \times 10^8$ pb
<i>S. cerevisiae</i> (levedura)	(2) 4×10^6 pb
<i>D. melanogaster</i> (mosca de fruta)	(3) $3,2 \times 10^9$ pb
<i>H. sapiens</i> (homem)	(4) $1,4 \times 10^7$ pb

8. a) O valor da T_m para o DNA pode ser estimado usando-se a fórmula:

$$T_m = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$$

onde (A+T) é o número de adeninas mais timinas e (G+C) o número de guaninas mais citosinas presentes em uma das fitas. Ordene os seguintes DNA dupla fita da menor para a maior T_m .

(1) A A G T T C T C T G A A T T C A A G A G A C T T	(2) A G T C G T C A A T G C A G T C A G C A G T T A C G T C
(3) G G A C C T C T C A G G C C T G G A G A G T C C	

b) Como varia o T_m com a força iônica da solução?

9. Diferentemente do DNA, o RNA não é estável em soluções alcalinas. Por quê?

EXERCÍCIOS II

Estrutura da cromatina

1. Quais das seguintes afirmações sobre o DNA isolado de um cromossomo eucariótico são corretas?

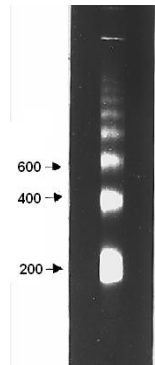
- É resistente à quebra durante a extração por seu grande tamanho.
- É linear e não ramificado
- É um DNA dupla fita único
- Pode ter tamanho superior a 100 Mb

2. Baseando-se nas dimensões de uma molécula dupla fita de DNA calcule o comprimento do DNA de uma célula haplóide humana (sabe-se que uma célula haplóide humana tem $3,2 \times 10^9$ pares de bases em seu DNA).

3. Qual o número total de DNAs dupla fita num gameta haplóide humano? E numa célula somática diplóide?

4. O núcleo de uma célula humana tem $6\mu\text{m}$ de diâmetro e a extensão total do DNA dos seus 46 cromossomos soma 2,2 m. Como é resolvida a discrepância entre estas duas grandezas?

5. Cromatina foi digerida com uma nuclease e o produto foi separado por eletroforese em gel de agarose, gerando o padrão indicado na figura ao lado. A que corresponde cada banda deste gel?



6. Quando cromatina é isolada a partir do núcleo de uma célula eucariótica, duas formas diferentes podem ser observadas: uma forma em colar de contas, onde as contas têm 10 nm de diâmetro, ou uma fibra de 30 nm de diâmetro. Esquematize a estrutura das duas formas, incluindo uma descrição das proteínas envolvidas e como estas proteínas organizam-se umas com as outras e com o DNA.

7. Quais as características bioquímicas das histonas que compõe os nucleossomos?

EXERCÍCIOS III

Replicação de DNA

1. Descreva o experimento de Meselson-Stahl. Qual seria o resultado deste experimento se a replicação do DNA fosse conservativa?

2. Que propriedades do DNA e da DNA polimerase indicam que as duas fitas não podem ser replicadas no mesmo sentido? Como o problema é resolvido durante a replicação? Faça um esquema para explicar.

3. Combine as propriedades ou funções na coluna à direita com a DNA polimerase de bactérias mostrada na coluna da esquerda:

- | | |
|------------------------|---|
| (a) DNA polimerase I | (1) envolvida na replicação |
| (b) DNA polimerase II | (2) requer um iniciador e um molde |
| (c) DNA polimerase III | (3) envolvida no reparo de DNA |
| | (4) sintetiza a maior parte do DNA durante a replicação |
| | (5) remove o iniciador e preenche as lacunas durante a replicação |

4. Qual a função das enzimas abaixo na replicação de DNA em *E.coli*?

Helicase, primase, DNA polimerase III, DNA polimerase I e DNA ligase.

5. Qual a importância das topoisomerases na replicação do DNA?

6. A replicação começa em locais específicos, chamados origens de replicação (*ori*). O cromossomo circular de *E. coli* tem uma única origem de replicação (*oriC*). O que você espera observar em genomas eucarióticos com cromossomos lineares, como o humano?
7. O que são telômeros e como eles são sintetizados? Como a telomerase previne o encurtamento sucessivo das fitas descontínuas (*lagging*) na replicação do DNA?
8. Células que se diferenciaram e que se dividem até um número limitado de vezes não expressam altos níveis de telomerase. Por outro lado, células tumorais apresentam aumento na expressão da telomerase. Justifique esta observação.
9. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia do câncer afeta a replicação do DNA ou as enzimas envolvidas no processo. Por que células tumorais são mais sensíveis a estas drogas?
10. As DNA polimerases apresentam uma alta fidelidade de replicação do DNA. Como isto é possível? Porque a alta frequência de divisão celular aumenta a chance de mutações nos genes?

EXERCÍCIOS IV

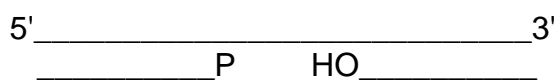
Lesão e Reparo de DNA

1. Cite exemplos de lesões no DNA causadas por agentes químicos, oxidação por espécies reativas de oxigênio e por radiação ultravioleta.
2. Descreva brevemente as três etapas de reparo do DNA lesado por luz UV citando as enzimas envolvidas.
3. Visto que U pareia com A tão bem quanto T pareia com A, por que somente T é encontrado no DNA?
4. O reparo por excisão de base é essencial para reparar bases danificadas por desaminação ou oxidação. Uma das glicosilases envolvidas neste tipo de reparo é a uracil DNA glicosilase, que remove uracilas, resultantes da desaminação de citosinas. Quais as etapas subseqüentes neste mecanismo de reparo após excisão da base?
5. O reparo de pareamento errado remove erros ocorridos na replicação. Não há lesão no DNA ou bases modificadas presentes. Como a maquinaria de reparo distingue a fita de DNA que tem um nucleotídeo não complementar incorporado (fita recém-sintetizada) da fita parental de DNA, cuja sequência deve ser preservada?
6. Defeitos hereditários na maquinaria de reparo de DNA estão relacionados a diversos tipos de câncer. Especule por que a herança de um único alelo defeituoso em gene de reparo aumenta a incidência de câncer em tecidos que se dividem ativamente.

7. Existe um teste simples para detectar se uma substância é mutagênica chamado teste de Ames, em homenagem ao cientista que o criou. Qual o organismo utilizado? Como se detecta o surgimento de mutações? As mutações detectadas ocorrem em um gene específico, ou em qualquer lugar do genoma?

8. Células de mamífero de dois genótipos diferentes podem ser fundidas, na presença do vírus Sendai, para formar células multinucleadas (heterocarions) contendo núcleos de ambos os genótipos. Quando fibroblastos de dois pacientes sofrendo de *Xeroderma pigmentosum* foram fundidos, os heterocarions resultantes não mostraram deficiência em reparo de DNA. Que conclusões podem ser tiradas desta observação? Explique.

9. O fragmento de DNA no esquema abaixo é de fita dupla em ambas as extremidades, porém de fita simples no meio. As extremidades da fita superior estão indicadas.



a) O fosfato (P) indicado na fita inferior está na extremidade 5' ou 3' do fragmento ao qual ele pertence? (Indique no esquema).

b) Como você esperaria que a lacuna fosse preenchida pelos processos de reparo do DNA "in vivo"?

c) Quantos fragmentos você esperaria encontrar na fita inferior se o experimento (síntese de DNA) fosse realizado "in vitro", na presença de todos os desoxirribonucleotídeos-trifosfato e DNA polimerase?

10. Quais as atividades enzimáticas que são comuns a todas as vias de reparo (exceto reparo direto)?

EXERCÍCIOS V

Transcrição e processamento de RNA

1. Uma pequena cadeia de RNA sintetizado *in vitro* tem a seguinte seqüência:

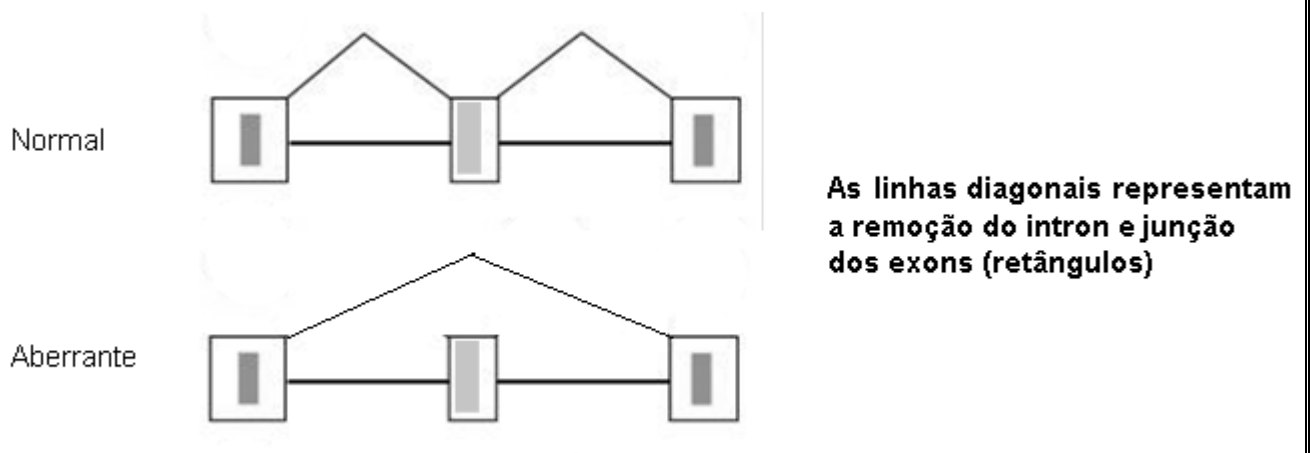


a) Coloque os grupos fosfato e um asterisco naqueles que serão radioativos quando a transcrição for feita na presença de [γ ^{32}P]-ATP

b) Faça o mesmo para [α ^{32}P]-UTP

2. Quais as principais características das seqüências de promotores procarióticos?

3. Descreva a composição de subunidades da RNA polimerase de *E. coli*, atribuindo funções às subunidades.
4. As DNA polimerases necessitam de um iniciador, ao qual se liga um novo nucleotídeo para o crescimento da cadeia polinucleotídica. É necessário um iniciador para a ação da RNA polimerase? Que subunidades da RNA polimerase bacteriana são necessárias para a iniciação da transcrição a partir de um promotor? Explique como uma mutação poderia dar origem a uma *E. coli* resistente ao antibiótico rifampicina.
5. Aponte as principais funções associadas as RNA polimerases eucarióticas.
6. Em que consiste o terminal 5' cap do mRNA e qual o seu papel? Qual a característica do terminal 3' encontrado na maioria dos mRNAs de eucariotos e como eles são formados?
7. Genes de eucariotos são geralmente constituídos de introns e exons.
 a) Estas seqüências são tanto transcritas como traduzidas?
 b) A remoção dos íntrons (*splicing*) tem que ser um processo extremamente preciso. Por quê?
 c) Como o spliceossomo reconhece o sítio de *splicing* 5' e o ponto de ramificação?
8. Suponha que o DNA humano é clivado em fragmentos do tamanho aproximado de um mRNA humano maduro e que então são preparados híbridos RNA-DNA. O mesmo procedimento é repetido com *E. coli*. Quando os híbridos RNA-DNA de cada espécie são examinados ao microscópio eletrônico, qual deles mostra o maior grau de hibridização? Explique.
9. Explique como ocorre o processo de *splicing*. Que características na sequência do pré-mRNA transcrito definem introns e exons?
10. A troca de G por A em uma junção intron-exon em um alelo do gene da beta-globina humana leva a ocorrência de *splicing* aberrante. Indique no esquema a seguir onde ocorreu a troca. Quais as possíveis conseqüências deste defeito genético?



EXERCÍCIOS VI

Tecnologia do DNA recombinante/Bibliotecas de genes e de cDNA

1. Quando uma molécula de DNA de um organismo diferente entra em certas bactérias, o DNA estranho é frequentemente hidrolisado. Explique as bases enzimáticas deste fenômeno. Explique como o DNA estranho pode às vezes escapar desta hidrólise. Por que o DNA da própria bactéria não sofre hidrólise?

2. Quais das seqüências abaixo são possíveis sítios de reconhecimento de uma enzima de restrição? Por quê?

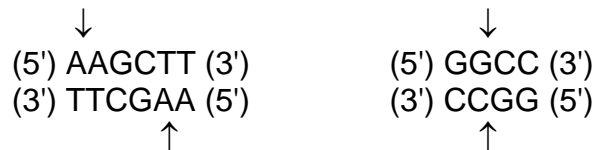
(a) 5'-AGTC-3'
3'-TCAG-5'

(b) 5'-ATCG-3'
3'-TAGC-5'

(c) 5'-ACCT-3'
3'-TGGA-5'

(d) 5'-ACGT-3'
3'-TGCA-5'

3. As enzimas de restrição *Hind* III e *Hae* III, que reconhecem e clivam respectivamente as seqüências de DNA como indicado pelas setas a seguir,



foram utilizadas separadamente para clivar a molécula do DNA dupla fita circular abaixo:

.... AAGCTTTCAGCAGGCCTA
.... TTCGAAAGTCGTCCGGAT

Após a clivagem a solução foi aquecida para inativar a enzima de restrição e a solução foi esfriada lentamente após a adição ou não de NaOH 0,1M, para tornar a solução alcalina. Em que condições o DNA assim tratado apresentou-se circular quando observado ao microscópio eletrônico?

4. Um fragmento de DNA de 8kb é clivado, separadamente, com duas enzimas de restrição diferentes produzindo os fragmentos abaixo:

*Eco*RI

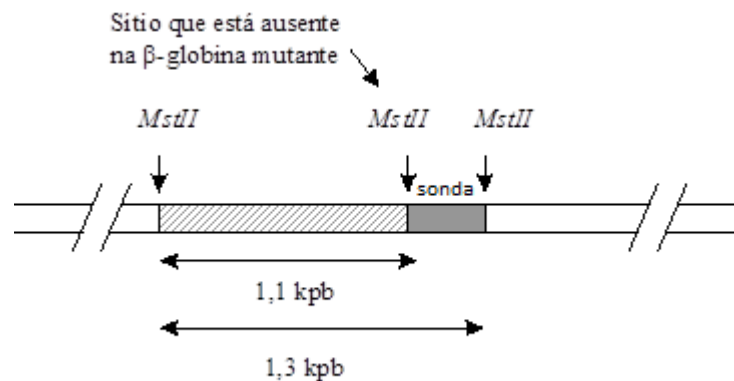
3kb 5kb
|-----|-----|

*Bam*HI

7kb 1kb
|-----|-----|

A dupla digestão do mesmo fragmento (com as duas enzimas simultaneamente) produz fragmentos dos seguintes tamanhos: 1kb, 2kb e 5 kb. Desenhe o mapa de restrição deste fragmento de DNA.

5. A anemia falciforme está associada a existência de uma mutação pontual de A→T, no gene da β -globina que provoca a troca do aminoácido Glu por Val na proteína. Esta mutação elimina um sítio reconhecido pela enzima de restrição *MstII*. O desenho abaixo representa um esquema dos genes selvagem e mutante. Planeje um teste utilizando a técnica de "Southern blot" para o diagnóstico pré-natal desta doença. Faça o esquema do resultado esperado considerando um feto normal e de um portador da doença cujos pais são heterozigóticos.



6. Quais as enzimas são necessárias para clonagem de um fragmento de DNA em um vetor plasmidial? Como você poderia verificar se o fragmento de DNA foi corretamente inserido no vetor após um experimento de clonagem?

7. Como podemos construir uma biblioteca genômica a partir de DNA cromossomal purificado?

8. Qual a diferença entre uma biblioteca genômica e uma biblioteca de cDNA?

9. Qual das sentenças abaixo não é verdadeira?

- Um clone de cDNA não contém introns.
- Bibliotecas genômicas preparadas a partir de dois tecidos diferentes do mesmo indivíduo contêm coleções iguais de DNAs recombinantes.
- Bibliotecas de cDNA preparadas a partir de RNA isolado de dois tecidos diferentes do mesmo indivíduo sempre conterão a mesma coleção de moléculas de DNA recombinantes.
- Um clone de DNA recombinante isolado de uma biblioteca genômica pode conter sequências que correspondem a introns e exons.
- Um RNA produzido numa bactéria por um vetor de expressão contendo um gene eucariótico pode ser traduzido na proteína eucariótica correspondente pela maquinaria de tradução da bactéria.

10. Explique como a presença de íntrons em genes eucarióticos complica a produção de produtos protéicos que eles codificam quando a expressão é feita em bactéria. Como se pode resolver este problema?

11. O antígeno que é utilizado na vacina recombinante contra a Hepatite B é uma glicoproteína. Como esta proteína recombinante pode ser obtida, considerando que bactérias são incapazes de glicosilar proteínas?

EXERCÍCIOS VII

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

1. A técnica de PCR (*polymerase chain reaction* ou reação da polimerase em cadeia) é utilizada para obter grandes quantidades de DNA a partir de amostras contendo quantidades ínfimas de DNA.

a) Descreva os passos envolvidos nesta técnica utilizando a seqüência abaixo:

5' ——— GACCTGTGGAAGC ————— CATACGGGATTG ——— 3'

b) Que tipo de DNA polimerase é normalmente utilizado?

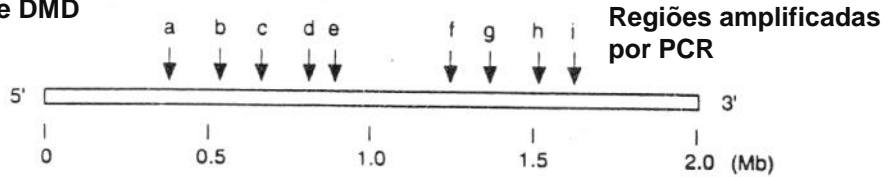
c) Para que um experimento de PCR seja bem-sucedido é necessário que os primers utilizados apresentem Tms aproximadamente iguais. Por quê?

2. Após a realização da PCR os fragmentos de DNA obtidos podem ser analisados de que maneira?

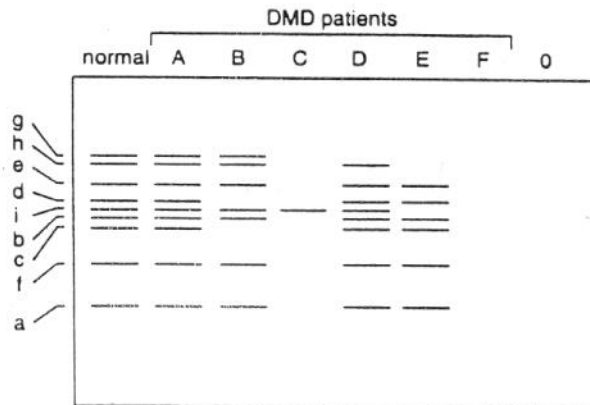
3. Exemplifique aplicações da técnica de PCR.

4. A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma das doenças genéticas mais comuns. O gene da DMD localiza-se no cromossomo X, possui mais de 2×10^6 pares de base e contem pelo menos 70 exons. 60% dos casos são devidos à ocorrência de deleções grandes concentradas em duas regiões do gene. 1/3 dos novos casos são devidos a novas mutações no gene. A técnica de PCR- multiplex é um método rápido e eficiente no diagnóstico da DMD e pode detectar aproximadamente 80% de todas as deleções já conhecidas. Nesta técnica são utilizados múltiplos pares de primers que podem amplificar, em uma reação, 9 segmentos (de tamanhos diferentes) do gene nas regiões onde as deleções ocorrem mais frequentemente. Um exemplo de análise por PCR-multiplex é apresentado abaixo. Descreva as deleções, se houverem, em cada um dos seis pacientes de DMD analisados. Que controle adicional você sugere para confirmar o diagnóstico do paciente F? As setas apontam os nove sítios amplificados pela PCR. Normal equivale a um indivíduo do sexo masculino não portador da DMD e Q é um controle negativo onde não foi adicionado DNA à mistura de reação.

(A) Gene DMD



(B) Análise por PCR-



Gel corado para visualização dos fragmentos amplificados

5. O que são VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e qual sua utilidade na determinação da impressão digital de DNA humano?

6. Você está usando PCR para amplificar um fragmento de DNA de 300 pb, uma porção do gene X, a partir de DNA genômico humano isolado de amostras de sangue de pacientes. As instruções para este procedimento indicam que você deve adicionar as reações A e B, cujos conteúdos estão indicados abaixo, separadamente para cada amostra de paciente que você for analisar.

Ingredientes	Reação A	Reação B
10x tampão de PCR (Tris, pH 7.0, KCl, MgCl ₂ ,)	5 µL	5 µL
H ₂ O	37.8µL	38.8µL
dNTPs	3 µL	3 µL
Taq DNA polimerase	0.2 µL	0.2 µL
Primers	3 µL	3 µl
Gene X previamente isolado	1 µl	nada

a) Qual o motivo da reação A?

b) Após a amplificação por PCR, uma alíquota de cada reação é analisada através de eletroforese em gel de agarose. As bandas observadas no gel de três amostras de pacientes distintas estão descritas abaixo. Descreva o que estes resultados indicam.

Amostra 1: Ambas as reações A e B apresentam a banda de 300 pb.

Amostra 2: A reação A tem a banda de 300 bp; a reação B não tem nenhuma banda.

Amostra 3: Nenhuma das reações tem banda.

c) No experimento acima não existe um controle negativo. Descreva como deveria ser realizado um controle negativo para estas reações.

EXERCÍCIOS VIII

Sequenciamento de DNA e análise de genomas

1. O método de Sanger de sequenciamento de DNA está baseado na síntese enzimática de DNA *in vitro*. Como funciona e quais são os reagentes necessários? Desenhe a estrutura dos didesoxirribonucleotídeos (ddNTP) utilizados na síntese do DNA neste método e aponte a diferença com os dNTPs. Qual a importância de se utilizar os dNTPs no método de Sanger?

2. A figura ao lado mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida de um DNA que foi sequenciado pelo método que utiliza ddNTPs.

a) Este gel tem resolução para discriminar fragmentos de DNA que tem qual diferença de tamanho (em número de nucleotídeos)?

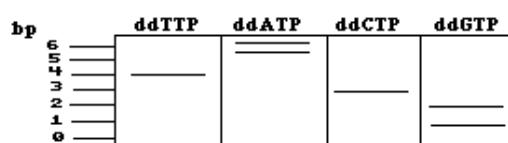
b) Qual é a seqüência do DNA recém sintetizado?

a) 5' GGCTAA 3'

b) 3' GGCTAA 5'

c) 5' CCGATT 3'

d) 3' CCGATT 5'



3. No sequenciamento que utiliza o método de dideoxynucleotídeos indicar a(s) alternativa(s) correta(s):

- a) a seqüência lida no gel é complementar e antiparalela à fita molde na reação,
- b) a seqüência é lida no sentido 5' a 3' indo dos fragmentos maiores aos menores no gel de seqüência,
- c) as novas fitas sintetizadas são iniciadas a partir de um mesmo ponto, isto é, do primer.
- d) uma alta concentração de ddNTPs é utilizada para que haja uma alta probabilidade de que cada cadeia seja terminada em todas as posições possíveis.

4. Sequenciamento automatizado de Sanger: Considerando o seguinte DNA molde hibridizado ao primer:

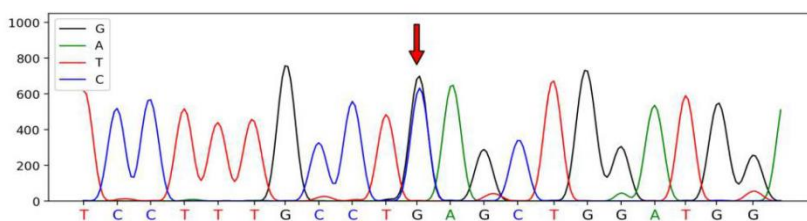
5' –TCGGCATGCAGT

3' –AGCCGTACGTCAGATGGCATCGGTTAGCGAGATCC.....5'

Se cada ddNTP utilizado na reação de sequenciamento está ligado a um corante com fluorescência de cor diferente (ddA -vermelho; ddC - amarelo; ddG - verde; ddT - azul), qual seria a cor dos quatro primeiros fragmentos de sequenciamento detectados pela máquina de sequenciamento automático?

5. Os indivíduos apresentam pequenas diferenças em sua seqüência genômica. As diferenças (polimorfismos de uma base, SNP) ocorrem aproximadamente a cada 1000 pares de base (pb). Já existe tecnologia para identificação (mapeamento) dos SNP em genes específicos e os diferentes SNP bem como seus efeitos estão sendo progressivamente catalogados. Especule sobre a vantagem da identificação de polimorfismos humanos na prática médica.

6. O eletroferograma abaixo mostra o resultado do sequenciamento automatizado do gene SSRT1 de uma ovelha, onde foi identificada a presença de um SNP (polimorfismo de único nucleotídeo, indicado pela seta). Explique porque existem dois picos superpostos nesta posição.



7. Compare genoma, transcrito e proteoma quanto sua variabilidade entre tecidos diferentes.

8. Você gostaria de analisar os níveis de expressão de um determinado gene em biópsias de tecido normal e de tecido tumoral. Que metodologias você poderia utilizar? Por outro lado, se você quiser analisar simultaneamente os níveis de expressão de milhares de genes em ambos os tecidos, qual seria a metodologia mais adequada? Explique.

9. O transcriptoma não reflete integralmente o proteoma de uma célula. Discuta esta afirmação.

EXERCÍCIOS IX

Síntese de Proteínas: Tradução

1. Num sistema de síntese de proteínas *in vitro*, que permita o início e término da síntese em qualquer seqüência de RNA, que peptídeo seria produzido pelo poli-ribonucleotídeo 5'-UUUGUUUUUGUU-3'? Indique qual o aminoácido N-terminal e o C-terminal do polipeptídeo obtido.

2 Baseando-se na lista de códons e amino ácidos abaixo, quais das seguintes afirmações são corretas?

AGU = serina	AGC = serina
AAU = asparagina	AAC = asparagina
AUG = metionina	AUA = isoleucina

- (a) o código genético é degenerado
- (b) a alteração de um único nucleotídeo no DNA que dirige a síntese destes códons poderia levar à substituição de uma serina por uma asparagina no polipeptídeo.
- (c) a alteração de um único nucleotídeo no DNA que dirige a síntese destes códons necessariamente levaria à substituição de um aminoácido no polipeptídeo codificado.
- (d) um tRNA com o anticódon ACU se ligaria a um ribossomo na presença de um destes códons.

3. Uma globina de 146 aminoácidos sofreu uma mutação no códon correspondente ao sexto aminoácido da cadeia. A análise do DNA indicou uma mudança de (5')TTC(3') para (5')TAC(3') na fita molde. Pergunta-se:

- (a) A mutação provocou a troca de um aminoácido por outro? Em caso afirmativo, qual é este aminoácido?
- (b) Quais as implicações para a estrutura da proteína?
- (c) Qual seria o resultado se a mesma troca ocorresse na base do lado (5') deste códon no DNA?

4. Assumindo que cada nucleotídeo na coluna da esquerda está na primeira posição de um anticódon, com qual(is) nucleotídeo(s) na coluna da direita ele vai parear durante uma interação códon-anticódon, se cada um dos nucleotídeos da direita estiver na terceira posição (3') de um códon?

anticódon	códon
(a) Adenosina-P	(1) Adenosina-P
(b) Citidina-P	(2) Citidina-P
(c) Guanosina-P	(3) Guanosina-P
(d) Inosina-P	(4) Uridina-P

5. De acordo com o princípio de oscilação (*wobble*) no pareamento de bases, qual o número mínimo de tRNAs necessário para decodificar os seis códons de leucina - UUA, UUG, CUU, CUC, CUA e CUG? Explique.

6. Mutações de ponto (pontuais) em sequências codificadoras podem ou não resultar em substituição de aminoácidos na proteína codificada. Quais as conseqüências das substituições listadas abaixo no códon 142 da alfa-globina humana? Como você classificaria estas mutações?

	Códon 142
normal	UAA
mutada	CAA
mutada	AAA
mutada	GAA
mutada	UCA
mutada	UAG

7. O códon AUG funciona tanto para iniciar uma cadeia polipeptídica quanto para dirigir a incorporação de uma metionina em posições internas de uma proteína. Quais os mecanismos de seleção do códon AUG para a iniciação da tradução em bactérias? E em eucariotos?

8. Considere a seguinte seqüência de um fragmento de DNA:

5' CTGATAAGGGATTAAATTATGTGTCAATCACGAATGCTAATCGCTTAACACTTC 3'

- Assumindo que esta seqüência corresponde a seqüência da fita codificadora, qual seria a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo produzido quando um mRNA transcrito deste gene for traduzido? Considere a primeira base como o início da transcrição.
- Identifique as 3 fases (quadros) de leitura em uma eventual tradução da molécula de mRNA transcrita a partir deste fragmento de DNA.

9. Dada a semelhança entre valina e isoleucina e a maior concentração de Val em relação a Ile (5:1) em *E. coli*, os cálculos indicam que a isoleucil-tRNA sintetase deveria incorporar às proteínas, erroneamente, valina em lugar de isoleucina a cada 40 reações. Entretanto, o erro acontece apenas 1 vez em cada 3000 reações. Por quê?

10. Em um experimento verificou-se que Cys-tRNA^{Cys} pode ser convertido a Ala-tRNA^{Cys} e usado num sistema *in vitro* de síntese de proteínas.

- Se o Ala-tRNA^{Cys} for marcado com ¹⁴C no aminoácido, a alanina marcada seria incorporada na proteína sintetizada no lugar de outros resíduos Ala? Explique.
- O que o experimento indica sobre a importância da precisão da reação da aminoacil-tRNA sintetase em relação ao processo global da síntese protéica?

EXERCÍCIOS X

Regulação da expressão gênica em procariotos

1. Esquematize o operon lac indicando os seus componentes e suas funções. Defina expressão gênica constitutiva e expressão gênica induzida.
2. Numa cultura de *E.coli* em um meio contendo tanto lactose quanto glicose, qual dos açúcares é metabolizado preferencialmente? Qual é o mecanismo que permite esta seletividade? O que acontece quando a glicose se esgota durante o crescimento da bactéria?
3. Para o cultivo de *E.coli* utilizaram-se meios contendo além dos sais necessários, os componentes:

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| a) lactose | d) glicose + cAMP |
| b) lactose + glicose | e) lactose + glicose + cAMP |
| c) glicose | |

Analise a produção de β - galactosidase em cada caso, justificando a resposta segundo o modelo de Jacob e Monod.

4. Qual o efeito da deleção do gene regulador do operon lac? Haveria outro tipo de mutação resultando no mesmo efeito?
5. Por que o triptofano é chamado de co-repressor na regulação do operon das enzimas biossintéticas deste aminoácido? Qual o efeito provável da deleção do gene regulador *trp R*?
6. Por que o mecanismo de atenuação da transcrição do operon do *trp* não funciona em células humanas?
7. O que é X-gal e como podemos utilizá-lo para monitorar a expressão de β -galactosidase em bactérias?
8. O que é o IPTG e como atua na regulação da expressão do operon lac?

EXERCÍCIOS XI

Regulação da expressão gênica em eucariotos

1. Compare a expressão gênica em bactérias e eucariotos quanto a:
 - a) acoplamento da transcrição e da tradução.

- b) número de genes representados no transcrito primário.
- c) número de proteínas resultantes da tradução do mRNA.
- d) proporção de seqüências codificadoras no DNA.
- e) organização de genes em operons.

2. Quais os níveis de controle que podem atuar na expressão gênica em eucariotos?

3. Quais as principais características das seqüências de promotores de genes eucarióticos transcritos pela RNA pol II? Qual a função dos fatores de transcrição e dos *enhancers* (amplificadores ou intensificadores)?

4. Quais os dois tipos de elementos em *cis* que regulam a expressão de um gene eucariótico?

5. Quais são os dois domínios existentes num fator de transcrição necessários à sua função? Qual a função de cada um deles?

6. Considerando como os hormônios atuam:

a) Se os hormônios podem se difundir livremente pelo organismo, porque apenas algumas células são responsivas a um hormônio em particular?

b) Como difere a resposta de uma célula a um hormônio peptídico da resposta de uma célula a um hormônio esteróide? Desenhe um esquema explicando cada caso.

7. Cromatina que é ativa transcricionalmente (eucromatina) tem estrutura dispersa, enquanto cromatina que é inativa (heterocromatina) é compacta. Quando núcleos de células de galinha produzindo globina foram tratados brevemente com DNase I (Desoxirribonuclease I), os genes de globina de adultos foram seletivamente destruídos, mas os genes para globina embrionária e ovalbumina permaneceram intactos. Quando os núcleos de células de oviduto foram tratadas com DNase I, os genes de ovalbumina foram destruídos. Explique estes resultados.

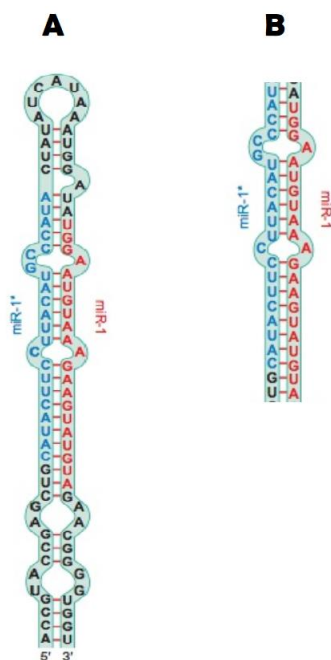
8. Por que a acetilação de histonas pode levar a uma estrutura de DNA mais aberta?

9. Caseína é a proteína mais abundante do leite. É produzida em células epiteliais do tecido mamário em resposta a hormônios, incluindo o hormônio polipeptídico prolactina. Tecido mamário em cultura incubado na ausência de prolactina contém cerca de 300 moléculas de mRNA de caseína por célula, enquanto células incubadas na presença de prolactina contém cerca de 30.000 moléculas de mRNA de caseína. No entanto o núcleo isolado de células de tecido mamário em cultura sintetiza somente cerca de 3 vezes mais mRNA de caseína na presença de prolactina que na ausência de prolactina. Proponha uma explicação para estes resultados?

EXERCÍCIOS XII

Controle epigenético e pós-transcricional da expressão gênica em eucariotos. Silenciamento de genes por RNA interferente

1. Quais efeitos têm a metilação/desmetilação de bases do DNA (particularmente nas regiões promotoras, ilhas de CpG) na transcrição de genes?
2. O que são modificações covalentes de histonas e como isso afeta a expressão de genes eucarióticos?
3. Quando uma célula se divide, o padrão de metilação do seu DNA pode ser herdado. Explique os mecanismos moleculares envolvidos.
4. O que é epigenoma? Explique como o método de sequenciamento do DNA com bissulfato de sódio pode ser utilizado para determinar o epigenoma de um determinado tecido.
5. Discuta a utilização de RNA interferente como método para silenciamento da expressão gênica como alternativa ao nocaute de genes.
6. Um experimento foi realizado em *C. elegans* para descrever o mecanismo de interferência de RNA. Para tal estudo foram geradas duas cepas, denominadas de **Drosha+/Dicer+** (cepa normal), e **Drosha-/Dicer-** (cepa que não produz as enzimas Drosha e Dicer). Ambas as cepas de *C. elegans* são transgênicas e expressam uma actina fusionada a GFP, que fluoresce em verde quando excitada a 395 nm, como visualizado em microscopia confocal. Dois tipos de moléculas de RNA (A e B, figura abaixo) foram usadas no teste, sendo a região em vermelho complementar a um trecho do mRNA da supracitada actina-GFP.



Os RNAs A e B foram inoculados, separadamente, em ambos os organismos. Propor e explicar os resultados dos quatro experimentos, com relação à visualização de actina-GFP.

Cepas	RNAs	
	A	B
Drosha+/Dicer+		
Drosha-/Dicer-		

EXERCÍCIOS XIII

Engenharia genética e animais transgênicos. Edição de genomas -CRISPR-Cas.

1. O gene completo (contendo todos os exons e íntrons) do hormônio de crescimento de ratos pode ser expresso em camundongos sob o controle de um promotor indutível por Cd^{2+} . Como podem ser obtidos tais camundongos transgênicos? Quais as suas características? Como você explica o fato de o gene do rato ser expresso perfeitamente em camundongos?
2. Alguns anos atrás, cientistas europeus realizaram a clonagem de uma ovelha (Dolly), a partir de células de uma ovelha adulta. Compare este tipo de experiência com a obtenção de um animal transgênico.
3. O que são células tronco embrionárias?
4. Em que mecanismo molecular se baseia o processo de nocaute de genes em camundongos?
5. Células-tronco pluripotente induzidas (IPSCs) são pluripotentes assim como as células tronco embrionárias, mas são derivadas de células somáticas. Explique como são obtidas.
6. Como você faria para determinar o período e local de expressão de um gene durante o desenvolvimento *in vivo*, utilizando a GFP?
7. Bactérias como a *Streptococcus thermophilus* são utilizadas para fazer iogurtes e queijos. Em 2007, cientistas da Danisco, uma empresa de ingredientes alimentares sediada em Copenhague, expuseram a bactéria a um fago e selecionaram bactérias que apresentavam maior defesa a infecção pelo fago. Explique porque isto aconteceu.
8. A proteína Cas9 associada a CRISPR pode ser usada como ferramenta molecular para se fazer edições em genomas.

O que significa CRISPR por extenso?
 - a) Qual o papel da Cas9 na edição de genomas?
 - b) Em uma célula, o que acontece com um gene que foi cortado pela Cas9?
9. Suponha que você queira editar um gene X utilizando CRISPR/Cas. Quais deverão ser as características da sequência alvo a ser utilizada?
10. Uma das limitações da técnica de CRISPR/Cas é a possibilidade de que sejam também alvejados os assim chamados “off target”. O que significa isto?

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

	DNA	RNA
Força iônica baixa ("salting in") alta ("salting out")	Solubiliza Precipita	Solubiliza Precipita
Meio ácido 0,5N (brando) à frio	Precipita Despurina	Precipita Despurina
Meio alcalino brando (0,3N KOH; 37°C; 18h)	ss: estável ds: desnatura	Hidrolisa
Solvente orgânico (constante dielétrica < que da H ₂ O) ex.: etanol, isopropanol	Precipita	Precipita
Agentes desnaturantes quebram ligações de H ex.: formamida, uréia	ss: estável ds: desnatura	1ária: estável 2ária: destruída
Luz UV (260 nm)	ss: absorve mais ds: absorve menos	absorve
Calor	ss: estável ds: desnatura (T _m)	Estrutura primária: estável Estrutura secundária: destruída

ss: fita simples

ds: fita dupla

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

AUG é parte do sinal de iniciação da tradução e também é o códon para as metioninas internas à cadeia.