**Questões de Biologia Molecular da Célula – aula 3**

**Sugerimos que essas questões sejam realizadas com discussões a distância entre grupos de até 4 alunos. Entregar relatório pelo grupo.**

1. (4-99) O método gráfico de comparação de sequência de nucleotídeos (*diagram plot*) dá uma ideia visual da relação entre sequências. Na figura 1, são ilustradas as comparações do gene humano da beta-globina com o cDNA humano do gene da beta-globina (figura 1A), ou com o gene da beta-globina de camundongo (figura 1B). Esse diagrama é feito por comparação de blocos de sequências, no caso blocos de 11 nucleotídeos a cada momento. Se 9 ou mais nucleotídeos são coincidentes, aparece um ponto no diagrama, no local onde é feita a comparação. Como consequência regiões onde a similaridade de sequência é encontrada aparece como linhas diagonais.

|  |  |
| --- | --- |
| Macintosh HD:Users:carlosmenck:Desktop:Screen Shot 2013-08-16 at 3.57.06 AM.png | Macintosh HD:Users:carlosmenck:Desktop:Screen Shot 2013-08-16 at 3.57.21 AM.png |

**Figura 1.** Comparação das sequencias indicadas em *diagram plot.*

1. Da comparação do cDNA com o gene humano (figura 1A), deduza as posições dos exons e introns do gene da beta-globulina.
2. Pela análise da figura 1B, os exons dos genes humano e de camundongo são homólogos? Identifique e explique discrepâncias.
3. Há regiões fora dos exons que são conservadas entre as duas espécies? Identifique essas regiões de explique porque devem estar preservadas ao longo da evolução.
4. Há diferenças no tamanho dos introns? Qual a razão para sua resposta?
5. (4-101) Sequências Alu estão presentes em 6 sítios nos introns dos genes da alfa-fetoproteina e albumina humanos (genes adjacentes no cromossomo). O par de genes homólogos em ratos não contém sequências Alu. A divergência entre homens e ratos é estimada em 85 milhões de anos. A presença dessas sequências Alu nos genes humanos devido a uma invasão recente destas, ou isso significa que elas foram removidas do genoma de ratos?

Para responder a essa interessante questão você sequenciou as regiões flanqueadoras desses elementos Alu, mostrado na figura 2.

1. no processo de integração de transposons (incluindo elementos Alu) é criada uma duplicação de vários nucleotídeos dos dois lados da inserção. Identifique na figura as duplicações a esquerda e a direita, e sublinhe nucleotídeos alterados por mutação.
2. A taxa de substituição de nucleotídeos em introns é estimada em 3x10-3 por milhão de anos. Assumindo essa taxa de mutações para as sequências flanqueadoras de Alu, calcule há quanto tempo essas sequencias foram inseridas nesses genes (calcule a partir de todas as sequencias juntas, supondo inserções simultâneas).
3. Por que você usou apenas essas sequências flanqueadoras e não sequências dos introns ou as sequências dos próprios Alu?
4. Afinal: a invasão de sequências Alu nesses genes é recente (após a divergência de homens e ratos), ou essas sequências foram removidas do genoma de rato?

|  |  |
| --- | --- |
| Macintosh HD:Users:carlosmenck:Desktop:figure_04_38.jpg | Figura 2. *Alinhamento de sequencias flanqueadoras de elementos Alu, como descrito na questão 2.*  |

1. (6-109) Seu orientador propõe um experimento para evolução de uma molécula de RNA com atividade replicase *in vitro*, através da amplificação e seleção de moléculas funcionais a partir de moléculas de RNA com sequencias randômicas. O esquema é apresentado nas figuras 3 e 4.
2. Como mostra a figura 3, a atividade sendo selecionada pela ligação do oligonucleotídeo tag ao RNA catalítico. Qual a analogia desse tipo de reação e a atividade de RNA replicase?
3. Por que o esquema de seleção (figura 4) pressupõe que o RNA tag esteja emparelhado com a molécula de RNA catalítica?
4. Por que no início da seleção é necessária a presença de regiões conservadas em cada extremidade da molécula catalítica? Por que há uma região variável no meio da molécula catalítica? Qual o papel de cada uma dessas regiões no esquema de seleção?
5. Como a molécula RNA catalítica é selecionada a partir do pool e especificamente amplificada?
6. Por que é necessário repetir o ciclo de seleção e amplificação? Por que não purificar apenas as ribozimas após o primeiro ciclo?



*Figura 3. Esquema representado a reação de uma ribozima com atividade RNA replicase, para seleção* in vitro.



*Figura 4. Um ciclo de seleção para enriquecimento de moléculas de ribozimas com atividades RNA replicase.*

1. (7-113) Em humanos duas formas de apolipoproteína B (apoB) são encontradas no plasma do sangue. ApoB48, com peso molecular de aproximadamente 48 kdaltons, é sintetizada no intestino e é um componente chave dos quilomicrons, as partículas lipoproteicas responsáveis pela distribuição de triglicerídeos para o tecido adiposo, onde são armazenados. ApoB100, com 100 kdaltons, é sintetizada no fígado para a formação de partículas menores (e menor densidade) usada na distribuição de triglicerídeos a serem usados para gasto energético. Experimentos clássicos identificaram uma relação surpreendente entre essas duas proteínas.

Sequências de cDNA clonado a partir desses dois tecidos revelaram uma diferença simples e única: cDNAs de células do intestino têm um T, gerando um códon de parada, enquanto o fígado tem, no mesmo local, um C, gerando um códon glutamina (figura 5). O DNA genômico dessas duas células também foi isolado (por PCR) e sequenciado, tendo sido identificado unicamente a sequência com o C no local.

1. a partir desses dados, você acredita que essas proteínas são codificadas por dois genes diferentes?
2. Ou essas proteínas podem ser originadas a partir de uma única proteína, que é clivada diferencialmente por proteases desses dois tecidos?
3. Explique o que deve ocorrer para a síntese dessas duas proteínas.



*Figura 5. Esquema representando as sequências dos mRNAs para as proteínas ApoB100 (intestino) e ApoB48 (fígado).*

*Questões baseadas do livro Molecular Biology of the Cell, The problems book.Garlands Science, 2008.*