

Expressão génica

4.1 Transcrição

4.1.1 Aspectos gerais da transcrição

Verdadeiro/Falso

1. A RNA polimerase é uma proteína de ligação ao DNA. V
2. A replicação e a transcrição têm início em regiões que formam bolhas na estrutura do DNA, e são realizadas por acção de grandes complexos moleculares formados por multi-subunidades. V
3. Na dupla cadeia de DNA, a orientação do promotor determina o sentido de transcrição dos genes. V
4. As RNA polimerases têm actividade de revisão de provas. F
5. A direcção de transcrição de um gene no sentido 5' – 3' ou 3' – 5' depende da cadeia de DNA onde se localiza. F

Escolha múltipla

1. Quando a RNA polimerase adiciona nucleótidos à molécula de RNA em síntese verifica-se que: a) os nucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dUTP, a serem incorporados, vão ser hidrolisados com libertação de fosfato inorgânico; b) os nucleótidos ATP, CTP, GTP e UTP, a serem incorporados, vão ser hidrolisados dando origem respectivamente a ADP, CDP, GDP e UDP; c) os nucleótidos ADP, CDP, GDP e UDP, a serem incorporados, vão ser hidrolisados dando origem respectivamente a AMP, CMP, GMP e UMP; d) os nucleótidos ATP, CTP, GTP e UTP, a serem incorporados, vão ser hidrolisados libertando uma molécula de pirofosfato por nucleótido; e) a única molécula que tem de ser hidrolisada é o ATP. d
2. Na transcrição: a) a RNA polimerase pode iniciar a síntese sem o *primer* iniciador; b) a RNA polimerase tem uma taxa de erro superior à da DNA polimerase; c) o RNA nascente, à medida que a síntese progride, vai-se dissociando completamente do DNA molde; d) as diferentes RNA polimerases, bacteriana, viral e animal, reconhecem as mesmas sequências de promotores; e) as RNA polimerases requerem elementos específicos para a terminação do transcrito. a, b, c, e
3. O desenrolamento da dupla hélice durante a transcrição é função da(s): a) RNA polimerase; b) proteínas SSB; c) topoisomerase; d) DNA helicase; e) primase. c, d
4. Um promotor *leaky* significa que: a) a transcrição é induzida; b) ocorre um baixo nível de transcrição na ausência de um sinal indutor da transcrição ou na presença de um repressor; c) um gene se expressa em resposta a um sinal repressível; d) a RNA polimerase pode mudar da forma activa para inactiva ; e) um transcrito incompleto é ocasionalmente sintetizado. b
5. Qual das seguintes características é comum à replicação e à transcrição de DNA? a) adição de nucleótidos à extremidade 5' da cadeia em síntese; b) formação de uma ligação açúcar-fosfato entre a extremidade 3' hidroxilo e a extremidade 5'P; c) incorporação de desoxirribonucleótidos na sequência em crescimento; d) as polimerases de RNA e de DNA requerem *primers* para a iniciação das suas actividades; e) não existe qualquer característica comum. b
6. Mutações no promotor podem conduzir a: a) um novo fenótipo; b) uma RNA polimerase mutante; c) um decréscimo de afinidade para a RNA polimerase; d) um aumento de afinidade para a RNA polimerase; e) uma transcrição desregulada. a, c, d, e

Questões básicas

1. Quais as particularidades da síntese de RNA pela RNA polimerase?
A síntese de RNA ocorre no sentido 5' – 3', não necessitando de uma extremidade 3'-OH livre para o seu início. Ainda que pontualmente estejam descritos promotores activos na forma de DNA de cadeia simples, o molde de DNA é maioritariamente de cadeia dupla, mas neste caso terá de estar desnaturado no local de início da transcrição.
2. Suponha que uma molécula de DNA de cadeia dupla sofre dois cortes em cada uma das cadeias, invertendo a região promotora de um gene. Espera que neste caso o promotor seja capaz de recrutar o complexo de transcrição? Se for o caso, o que aconteceria de errado com o transcrito do gene?
Sim, em princípio o complexo de transcrição continuará a ser recrutado. Contudo, o gene alvo desse promotor deixaria de ser transcrito e seria transcrita a sequência da cadeia complementar, em sentido oposto ao do transcrito original.
3. Dois genes, *A* e *B*, em que o gene *A* se encontra a montante do gene *B*, localizam-se na mesma cadeia codificante e apresentam uma sequência codificante sobreponível. Relativamente a mutações que

ocorrem nestes genes, indique quais são as consequências para a grelha de leitura do gene *B*, quando a grelha de leitura do gene *A* sofre:

- uma mutação *missense*
- uma mutação *nonsense*
- uma mutação *frameshift*

a) Uma mutação *missense* no gene *A* pode originar uma mutação *missense*, silenciosa, ou *nonsense* no gene *B*, quando as grelhas de leitura não coincidem. Caso as grelhas de leitura coincidam ocorrerá unicamente uma mutação *missense*; b) A mesma lógica da alínea a) é aplicada neste caso; c) Uma mutação *frameshift* no gene *A* será sempre uma mutação *frameshift* no gene *B*.

- Um fragmento de DNA de 3 kb contém 2 genes (gene *A* com 1,5 kb; gene *B* com 1 kb) que são transcritos em direcções opostas. Represente-os indicando: as extremidades 5' e 3' do fragmento de DNA, a cadeia molde e a cadeia codificante para cada gene, os locais de início da transcrição e os respectivos transcritos.

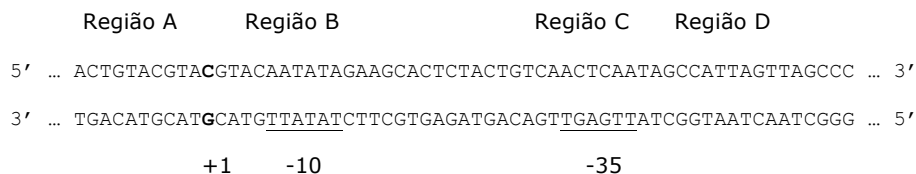
4.1.2 Transcrição em procariotas

Verdadeiro/Falso

- Na dupla cadeia de DNA, o sentido de transcrição dos genes é determinado pela orientação do RBS (*Ribosome Binding Site*). F
- Em procariotas, os activadores são proteínas que se ligam geralmente próximo do promotor e interagem com as RNA polimerases, promovendo o reconhecimento e ligação à região promotora, assim como a activação da transcrição. V
- A transcrição de determinado gene procariótico depende unicamente da subunidade sigma disponível na célula. F
- Sigma 70 é a principal subunidade σ , responsável pelo início da transcrição da maior parte dos genes em *E. coli*. V
- A terminação da tradução em procariotas pode ser dependente da proteína Rho. F

Escolha múltipla

- Considere a figura abaixo representada em que as regiões A, B, C e D abrangem ambas as cadeias.



- Qual a região da sequência de DNA que mais provavelmente será transcrita em mRNA? a) Região A; b) Região B; c) Região C; d) Região D; e) todas as regiões. a
 - O início da sequência do transcrito será: a) 5' UACGUAC 3'; b) 5' GUACGUA 3'; c) 5' CAUGCAU 3'; d) 5' TACGTAC 3'; e) 5' AUGCAUG 3'. b
 - As regiões que, no seu conjunto, constituem o promotor bacteriano são: a) Região A e B; b); Região A e C; c) Região B e C d) Região C e D; e) Região A e D. c
- O que é exclusivo da expressão génica em procariotas? a) sequências promotoras; b) transcrição e tradução acopladas; c) poliadenilação a 3' do mRNA; d) mRNA policistrónico; e) polissomas. R. b, d

Questões básicas

- Descreva como é que a estrutura do promotor afecta a expressão génica em *E. coli*.

R. A estrutura do promotor afecta a expressão génica em *E. coli* na medida em que se trata da região do DNA que irá ser reconhecida pela RNA polimerase (mais especificamente pela subunidade sigma desta enzima) para que se inicie a transcrição. Cada subunidade sigma (ex. sigma 70, sigma 54, sigma 32), ligar-se-á a diferentes promotores. Por outro lado, dependendo da sequência de reconhecimento, cada subunidade terá mais ou menos afinidade para estabelecer a ligação ao DNA transcrevendo com maior ou menor eficiência os diferentes genes.

- Como termina a transcrição em *E. coli*?

R. Quando a RNA polimerase atinge a sequência de terminação da transcrição, quer a enzima quer a molécula de RNA dissociam-se do DNA. Conhecem-se dois mecanismos de terminação da transcrição: os que dependem da sequência do molde de DNA que poderá gerar estruturas secundárias no mRNA (*stem-loop*) e os que dependem também da presença de uma proteína terminadora (a proteína Rho).

3. A produção de um mRNA policitrónico em procariotas pode funcionar como um mecanismo de regulação génica coordenado. Em que tipo de situações ou grupos de genes é comum esta regulação coordenada?

R. As enzimas que são sintetizadas a partir de um mRNA policitrónico estão com frequência funcionalmente relacionadas sendo, por exemplo, necessárias para uma via metabólica comum. Trata-se de um processo económico, mediante o qual a célula regula a síntese destas proteínas de um modo coordenado utilizando sinais únicos em que a quantidade apropriada de cada uma das proteínas é sintetizada de acordo com as necessidades da célula.

3. Exemplificando, descreva como é que o uso de subunidades sigma alternativas permite à bactéria alterar o seu padrão de expressão génica.

R. Em *E. coli*, as subunidades sigma permitem transcrever diferentes conjuntos de genes como é o caso de $\sigma 70$ que é responsável pela transcrição da maioria dos genes. Contudo, na presença de azoto, a subunidade $\sigma 54$ é activada e transcreve genes envolvidos na assimilação e fixação do azoto. As subunidades sigma permitem também, por exemplo, em condições de escassez de nutrientes promover a esporulação de *B. subtilis*: a activação de duas subunidades sigma diferentes (sigma E e sigma K) e a acção de dois activadores (SpoIID e Ger, que actuam em conjunto com as duas subunidades sigma, respectivamente) alteram o padrão de expressão génica conduzindo à produção do esporo e à lise da célula vegetativa.

4. Um investigador utilizou um processo de mutagénesis dirigida em células de *E. coli* tendo gerado a seguinte mutação:

DNA original	5' ... TTGACA	<u>15 a 17 pb</u>	TATAAT ... 3'
DNA mutante	5' ... TATAAT	<u>15 a 17 pb</u>	TTGACA ... 3'

a) O que representa esta sequência?

b) Qual acha que será o efeito desta mutação? Explique.

R. a) A sequência representa o promotor.

b) O gene, cuja transcrição dependia do promotor representado, deixará de ser transcrito na estirpe mutante, pois ao estarem trocadas as sequências reconhecidas pela RNA polimerase esta deixará de, estoiquiometricamente, as reconhecer.

4.1.3 Transcrição em eucariotas

Verdadeiro/Falso

1. Em eucariotas, enquanto a RNA polimerase está a sintetizar um transcrito a partir de uma molécula de DNA molde, a tradução já se iniciou na extremidade 5' do referido transcrito. F
2. Os promotores dos procariotas e dos eucariotas apresentam as mesmas sequências conservadas. F
3. A transcrição em eucariotas requer um complexo que é globalmente formado por factores gerais de transcrição (GTF — *General Transcription Factors*). V
4. Em eucariotas, enquanto a RNA polimerase está a sintetizar um transcrito a partir de uma molécula de DNA molde, pode estar a ocorrer o *capping* e o *splicing* a 5' do transcrito. V
5. Os exões e intrões distinguem-se pelo facto de os exões serem geralmente menores do que os intrões e estes terem dimensões muito variáveis. V
6. O processamento do pré-mRNA ocorre no citoplasma. F
7. Os intrões *self-splicing* são considerados ribozimas. V
8. À semelhança da telomerase os snRNPs (*small nuclear RiboNucleoProtein*) são ribonucleoproteínas. V
9. Em eucariotas, a RNA polimerase I transcreve genes diferentes dos da RNA polimerase III. V
10. A RNA polimerase II é responsável pela transcrição dos genes que codificam proteínas bem como dos genes que codificam alguns dos snRNAs como o U1, U2, e U3 envolvidos no *splicing* do mRNA em eucariotas. V
11. Em eucariotas, a RNA polimerase I é responsável pela produção do transcrito que será processado dando origem aos rRNAs 28S, 18S e 5,8S. V

12. A terminação da transcrição dos genes nucleares em eucariotas requer sempre poliadenilação. F

13. A proteína Rho é responsável pela terminação da transcrição em eucariotas. F

Escolha múltipla

1. A sequência indicada a negrito (em que o ponteadado corresponde a qualquer sequência de nucleótidos de extensão variável) é transcrita, mas não está presente no RNA maduro porque provavelmente corresponde a: a) uma origem de replicação eucariótica; b) uma sequência telomérica; c) um exão; d) um intrão; e) um promotor. d

5' ... CAUCUGGU.....**A.....UCGUAGCCC** ...

2. Em eucariotas, a enzima responsável pela transcrição da maioria dos genes codificantes de proteínas é a: a) RNA polimerase I; b) RNA polimerase II; c) RNA polimerase III; d) subunidade sigma 70; e) transcriptase reversa. b

3. Os intrões dos transcritos primários eucarióticos: a) são ligados para formar o mRNA; b) são altamente conservados no que se refere à sua sequência nucleotídica; c) variam consideravelmente em tamanho e número entre os diferentes genes; d) podem funcionar como exões; e) podem conter sequências codificantes de miRNAs. c, d, e

4. As proteínas que se ligam à TATA *box* na região promotora fazem parte do grupo de proteínas de: a) co-reguladores; b) co-activadores; c) repressores transcricionais; d) activadores transcricionais; e) factores gerais transcricionais. e

5. A sequência consenso AAUAAA, nos eucariotas, corresponde a: a) sequência de corte localizada na região 5' não traduzida (5'-UTR) do mRNA, reconhecida por endorribonucleases; b) início da tradução; c) início da transcrição; d) sequência de reconhecimento para o *splicing* dos intrões; e) sequência de reconhecimento para a formação da cauda poli-A. e

6. A cauda poli-A: a) aumenta a estabilidade dos transcritos; b) permite o reconhecimento do transcrito pela maquinaria de *splicing*; c) dirige o mRNA para o citoplasma; d) dirige o mRNA para o nucléolo; e) está envolvida no controlo do início da tradução. a, e

7. A(s) sequência(s) de controlo do DNA (*DNA control elements*) não associada(s) à região do promotor dos genes eucarióticos, transcritos pela maquinaria da RNA polimerase II são: a) BRE (*TFIIB Recognition Element*); b) DPE (*Downstream Promoter Element*); c) TATA box; d) Inr (*Initiator*); e) *enhancer*. E

8. Que interacções são importantes para a função do spliceossoma? a) interacções proteína-RNA; b) interacções proteína-DNA; c) interacções proteína-proteína; d) emparelhamento de bases RNA-RNA; e) emparelhamento de bases DNA-DNA. a, c, d

9. Relativamente ao CTD (*C-Terminal Domain*) da RNA polimerase II: a) a sua fosforilação não varia durante a transcrição; b) a sua fosforilação é importante para o *capping* do transcrito; c) é importante para o início da actividade polimerásica da RNAP II; d) uma alteração na sua conformação, causada pela fosforilação, pode servir para recrutar factores de processamento 3' do mRNA; e) é exclusivo da RNA polimerase II. b, c, d, e

10. A melhor descrição de um *enhancer* é: a) elemento do DNA que contém a TATA-box; b) factor de transcrição que promove a expressão de genes específicos; c) local de ligação da RNA polimerase; d) sequência particular de DNA à qual se ligam activadores transcricionais promovendo a expressão de genes específicos; e) proteína que se liga à RNA polimerase e que favorece a velocidade de transcrição. d

Questões básicas

1. O que é um transcrito primário? Como é que o transcrito primário dos eucariotas difere do dos procariotas?

R. O transcrito primário corresponde à molécula de RNA que é directamente transcrita a partir do molde de DNA e que ainda não sofreu qualquer processamento. A designação de transcrito primário ou pré-mRNA utiliza-se essencialmente no caso dos eucariotas por oposição a transcrito maduro ou secundário, o mRNA. Refere-se assim, às moléculas de RNA que ainda não foram sujeitas aos três tipos de processamento típicos dos mRNAs eucarióticos: *capping* da extremidade 5', isto é, a modificação da extremidade 5' por adição de uma guanosina metilada que estabelece uma ligação química pouco usual 5' - 5'; *splicing* ou remoção dos intrões; poliadenilação da extremidade 3', isto é, adição de uma cauda de adeninas que não necessitam de molde de DNA para a sua polimerização e que

estão envolvidas na terminação da transcrição (e posteriormente na regulação da tradução). Como nos procariotas não ocorre este processamento do transcrito primário, não há necessidade de se associar a designação "primário" ao produto da transcrição.

2. Existe alguma proteína nos eucariotas com uma função análoga à do factor sigma identificado nos procariotas?

R. A principal função da subunidade sigma é a de reconhecer a sequência promotora (ex. -10 e -35), posicionando correctamente a holoenzima para se iniciar a transcrição. Nos eucariotas, embora a RNA polimerase II também não tenha a capacidade de reconhecer a sequência promotora por si só, existe um conjunto de proteínas designadas de factores gerais de transcrição, que se ligam antes da RNA polimerase, à região promotora, e que não fazem parte desta enzima (ao contrário do que acontece com o factor sigma que é uma subunidade da RNA polimerase bacteriana), mas que participam no reconhecimento do promotor e recrutamento da RNA polimerase II.

3. Clonou um gene de levedura, incluindo o seu próprio promotor, em *E. coli* e verifica que o mRNA correspondente tem quase o dobro do comprimento do mRNA isolado de levedura. Explique qual a possível razão desta observação.

R. Há duas possíveis razões para que o mRNA seja mais longo do que o esperado. A primeira deve-se ao facto de os genes eucarióticos possuírem intrões e a bactéria não possuir a maquinaria de *splicing* necessária à remoção dos intrões. Em segundo lugar, os sinais de terminação da transcrição em leveduras (eucariota) e em *E. coli* (procariota) diferem, e como tal, os sinais responsáveis pela terminação da transcrição do gene de levedura não são reconhecidos em *E. coli*.

4. Explique por que razão alguns dos antibióticos utilizados em humanos têm como alvo as RNA polimerases bacterianas?

R. A RNA polimerase é uma enzima crítica na medida em que assegura funções essenciais à vida das células. A RNA polimerase bacteriana é estruturalmente diferente da RNA polimerase humana. Logo, uma droga que iniba a actividade da RNA polimerase bacteriana, impedirá as bactérias de se multiplicarem, não tendo praticamente qualquer efeito na RNA polimerase humana.

5. Assuma que um gene eucariótico contém dois exões e um intrão. Represente o respectivo DNA, pré-mRNA e mRNA, identificando em cada uma das moléculas, se tal se justificar, o seguinte:

- codão de fim da tradução
- região do promotor
- sequência de consenso AAUAAA
- início da transcrição (+1)
- região 3' não traduzida (3'-UTR)
- intrões
- exões
- fim da transcrição
- região 5' não traduzida (5'-UTR)
- codão de início da tradução
- polaridade das moléculas
- *enhancer*
- cauda poli-A
- *cap 5'*

6. Como é que, globalmente a omissão de i., ii. e iii. afectaria o pré-mRNA em eucariotas?

- i. sequência de consenso AAUAAA
- ii. *cap 5'*
- iii. cauda poli-A

i) A sequência de consenso AAUAAA impediria a ligação do factor de especificidade de clivagem e poliadenilação (CPSF), logo não haveria poliadenilação, que por seu lado afecta a estabilidade e a tradução do mRNA; ii) O *cap 5'* eliminaria o *splicing* do intrão mais próximo da extremidade 5'. Também afectaria a estabilidade do pré-mRNA e a sua capacidade de ser traduzido; iii) Não haveria interacção da cauda poli-A com o *cap 5'* nem a manutenção da estabilidade do mensageiro, o que provocaria a sua degradação rápida pelas nucleases do citoplasma.

4.2 Síntese, processamento e função das diferentes classes de RNA. Código genético

Verdadeiro/Falso

1. O código genético é universal. F

2. Algumas moléculas de pré-rRNA também contêm moléculas de tRNA. V
3. Os genes que codificam tRNAs têm codões de iniciação da tradução. F
4. Os snoRNAs estão envolvidos no processamento dos rRNAs 45S eucarióticos. V
5. Os snRNAs estão envolvidos no processamento dos rRNAs em procariotas. F
6. Nos ribossomas bacterianos estão presentes três tipos diferentes de moléculas de rRNA. V
7. A 1ª base do codão (base 5') tem maleabilidade de emparelhamento. F
8. Na maioria dos organismos, os pré-tRNAs são processados podendo ocorrer a remoção de pequenos intrões. V
9. No anticodão (5' – 3'), a base a 5' tem maleabilidade de emparelhamento. V
10. A ligação entre um tRNA e o seu aminoácido específico é uma ligação covalente de elevada energia. V
11. O fenómeno de *wobble* envolve a base localizada a 5' no anticodão. V
12. O RNA *editing* pode ser mediado por *guide* RNAs ou por desaminases específicas (ex. ADAR – *Adenosine Deaminase Acting on RNA*). V
13. A semi-vida dos mRNAs procarióticos é geralmente curta. V
14. Uma das consequências da acção dos miRNAs (micro RNAs), *in vivo*, é a repressão da tradução. V

Escolha múltipla

1. O tRNA: a) é uma molécula que incorpora um aminoácido específico na cadeia polipeptídica em crescimento quando reconhece um grupo específico de 3 bases; b) contém 3 bases específicas designadas de codão; c) contém 3 bases específicas designadas de anticodão; d) as bases que o compõem sofrem modificações químicas pós-transcricionais; e) terá de ser aminoacilado para se tornar funcional. a, c, d, e
2. Relativamente aos snoRNAs: a) estão envolvidos no processamento dos rRNAs 45S eucarióticos; b) ligam-se a proteínas formando complexos designados snoRNPs; c) algumas sequências que codificam os snoRNAs encontram-se nos intrões de genes que codificam proteínas ribossómicas; d) estão envolvidos no *splicing* dos mRNAs primários nos eucariotas; e) são específicos das células eucarióticas. a, b, c, e
3. O que se encontra no nucléolo? a) genes que codificam rRNAs; b) rRNAs; c) snoRNAs; d) complexos rRNA–proteínas; e) snRNAs. a, b, c, d
4. Em relação às aminoacil-tRNA sintetases: a) são responsáveis pela activação dos aminoácidos; b) na célula, existem aproximadamente 61 diferentes enzimas (tantas quanto o número de codões codificantes); c) na célula, existem aproximadamente 20 diferentes enzimas (tantas quanto o número de aminoácidos); d) reconhecem o substrato unicamente através do contacto entre a enzima e o braço do anticodão; e) são responsáveis pela ligação dos aminoácidos aos respectivos tRNAs. c, e
5. O fenómeno de *wobble*: a) é a capacidade de um anticodão reconhecer mais do que um codão; b) refere-se à 3ª base do codão (5' – 3'); c) refere-se à base 3' do anticodão; d) conduz, na grande maioria das vezes a mutações; e) só existe em determinadas espécies de organismos. a, b
6. O código genético é degenerado porque: a) está relacionado com o fenómeno de *wobble*; b) não é universal para todos os organismos; c) alguns aminoácidos têm mais do que um codão; d) as mutações silenciosas são toleradas; e) os codões *stop* podem ser reconhecidos por moléculas de tRNA com anticodões correspondentes. c
7. Relativamente ao *splicing* das moléculas de pré-mRNA: a) o spliceossoma está presente no núcleo e em organitos; b) ocorre em procariotas; c) pode ser autocatalítico; d) envolve a remoção de exões; e) existem diferentes mecanismos de remoção de intrões. c, e
8. O nucléolo é: a) uma região do cromossoma; b) o local onde ocorre o processamento das moléculas de rRNA; c) composto por rRNA, proteínas ribossomais e subunidades dos ribossomas; d) uma estrutura comum a organismos eucarióticos e procarióticos; e) um organito celular delimitado por uma membrana lipoproteica. b, c
9. Acerca das ribozimas e das funções a estas associadas: a) são compostas por moléculas de RNA; b) são moléculas de tRNA activadas; c) são responsáveis pela remoção de exões no processamento do

pré-mRNA pelo spliceossoma; d) catalisam a síntese de ribossomas; e) são responsáveis pela ligação peptídica do polipéptido em síntese. a, e

10. O *splicing* alternativo é um processo que: a) é altamente regulado; b) pode ocorrer devido a mutações no *branch point*; c) tem um mecanismo de modificação do RNA semelhante ao RNA *editing*; d) pode depender do tipo de célula onde o gene está a ser expresso; e) pode estar na origem de locais de poliadenilação alternativos. a, b, d, e
11. O mecanismo de NMD (*Nonsense Mediated Decay*): a) não envolve a degradação do mRNA; b) ocorre em transcritos que possuem um codão *stop* a jusante do EJC (*Exon-exon Junction Complex*); c) é activado quando após o primeiro evento de tradução se detecta um EJC; d) ocorre no mRNA; e) é evitado nos transcritos normais porque todos os EJCs se localizam a montante do codão *stop* que foram removidos pelo ribossoma. d, e

Questões básicas

1. O que são as aminoacil-tRNA sintetases e que tipo de reacções catalisam? Aproximadamente, quantos tipos diferentes destas enzimas estão presentes na célula? Como é que as sintetases reconhecem o seu tRNA?
R. As aminoacil-tRNA sintetases são as enzimas responsáveis pela correcta selecção e ligação de determinado aminoácido ao respectivo tRNA. Existem cerca de 20 aminoacil-tRNA sintetases. Estas enzimas reconhecem o tRNA pelo seu anticodão e por outras bases da sequência do tRNA processado.
2. Que processo molecular permite assegurar que as moléculas de rRNA 23S, 16S e 5S sejam produzidas nas proporções exactas e necessárias para a síntese dos ribossomas?
R. O processo molecular envolvido na produção equitativa de moléculas de rRNA relaciona-se com o facto de os rRNAs pertencerem a um único transcrito precursor que é posteriormente processado. Desta forma assegura-se igual quantidade de moléculas dos diferentes tipos de rRNA. Em procariotas o transcrito precursor tem cerca de 30 S e dá origem aos rRNAs 23S, 16S e 5S; nos eucariotas tem cerca de 45S e dá origem a rRNAs 28S, 18S e 5,8S. O rRNA 5S dos eucariotas é transcrito independentemente, formando uma família génica simples.
3. O que são ribozimas e a que tipos de reacções bioquímicas estão, geralmente, associadas?
R. As ribozimas são moléculas de RNA com uma função catalítica. Dois exemplos de reacções bioquímicas são: auto-excisão de intrões e estabelecimento da ligação peptídica na cadeia polipeptídica. Neste último caso, a actividade peptidil-transferase é desempenhada pela subunidade maior do ribossoma (50S procariótica e 60S eucariótica). Quer o rRNA quer as proteínas da subunidade em questão estão envolvidas nesta actividade, mas a reacção catalítica é uma propriedade do rRNA da subunidade 50S (23S nos procariotas e 28S nos eucariotas).
4. Considere os cinco tipos gerais de moléculas de RNA envolvidos na expressão génica de células eucarióticas: tRNA, rRNA, mRNA, snRNA e miRNA. Quais não estão envolvidos na expressão génica das células procarióticas, e porquê?
R. Os snRNAs e os miRNAs não estão envolvidos na expressão génica dos procariotas. A função dos snRNAs está relacionada com o *splicing* de mRNA, um processo que não ocorre em procariotas. Os miRNAs (21 a 23 nucleótidos) são produtos processados a partir de transcritos mais longos (60 a 120 nucleótidos em geral), muito abundantes nas células e cujos genes têm sido conservados na evolução. Estão envolvidos na regulação da expressão génica quer conduzindo à degradação de mRNAs específicos quer bloqueando a tradução de diferentes transcritos.
5. Quais as características essenciais do código genético?
O código genético é degenerado, não é universal, contém 64 codões, dos quais 61 codificam aminoácidos e três correspondem a codões *stop*.
6. Indique alguns sistemas genéticos que não usem o código genético padrão (*standard*).
R. A maioria dos exemplos referem-se a DNA mitocondrial. Assim, no DNA humano o codão UGA codifica Trp em vez de corresponder a um codão *stop*; AUA codifica metionina em vez de Ile; AGA corresponde a um codão *stop* em vez de codificar Arg. Em leveduras assim como em *Trypanosoma*, o codão UGA também codifica Trp em vez de corresponder a um codão *stop*. Em plantas, o codão CGG codifica Trp em vez de Arg. Relativamente ao DNA nuclear existem dois exemplos de protozoários, *Tetrahynema* e *Paramecium*, em que o codão UAA codifica Gln, em vez de corresponder a um codão *stop*. Acresce que, em *Paramecium*, o codão UAG também codifica Gln. Já em bactérias tem-se o exemplo do *Mycoplasma capricolum* em que o codão UGA codifica Trp em vez de corresponder a um codão *stop*.

4.3 Tradução em procariotas e eucariotas

Verdadeiro/Falso

1. A extremidade amínica (NH₂) do polipéptido corresponde à extremidade 3' do mRNA. F

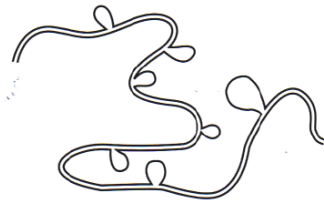
2. Em procariotas, as ligações peptídicas resultam da actividade enzimática do rRNA 23S contido na subunidade ribossómica 50S. V
3. Nos procariotas, o início de uma nova cadeia polipeptídica, requer a ligação do f-Met-tRNA ao local A do ribossoma. V
4. Quer em organismos unicelulares quer em organismos multicelulares, a quantidade e tipo de proteína presente nos núcleos das células diplóides nunca é alterada. F

Escolha múltipla

1. Durante a síntese proteica, os novos aminoácidos são adicionados: a) à extremidade amina da cadeia polipeptídica em síntese; b) à extremidade carboxilo da cadeia polipeptídica em síntese; c) a um tRNA que se encontre no local A do ribossoma; d) directamente ao local E do ribossoma; e) ao ribossoma após estabelecerem a ligação com a cadeia polipeptídica em síntese. b
2. Relativamente à maquinaria de tradução: a) um único mRNA pode ser simultaneamente traduzido por vários ribossomas; b) o mRNA policistrónico só contém um local de ligação ao ribossoma; c) o tRNA libertado do ribossoma é degradado; d) a terminação da tradução requer a intervenção de factores de libertação (RF – *Releasing Factors*); e) em eucariotas, no início da tradução, o complexo de pré-iniciação que se encontra ligado ao mRNA, pára o *scanning* e posiciona o Met-tRNA^{Met} iniciador neste local. a, d, e
3. Nos eucariotas, a tradução: a) inicia-se no primeiro conjunto de três nucleótidos a jusante do *cap* metil-guanosina; b) inicia-se com a remoção do *cap* 5'; c) necessita de uma sequência Kozak; d) inicia-se geralmente no primeiro codão AUG a jusante do *cap* metil-guanosina; e) envolve a interacção entre determinadas proteínas da cauda poli-A e do *cap* 5'. d, e
4. Quando a maquinaria da tradução eucariótica encontra um codão *stop*: a) o *cap* 5' é removido, destabilizando a maquinaria da tradução e esta termina; b) desencadeia a adição da cauda poli-A à extremidade 3' do RNA; c) são recrutados tRNAs especializados cujos anticodões apresentam complementaridade com o codão *stop*; d) a tradução termina porque são recrutados factores de terminação para o codão *stop*; e) este codão é reconhecido pelo respectivo anticodão de uma molécula de tRNA que não está ligada a um aminoácido. d
5. Quantas cadeias polipeptídicas podem ser formadas, simultaneamente, por um dado ribossoma? a) uma; b) aproximadamente 12; c) até 30; d) em número variável, dependendo do comprimento do mRNA; e) em número variável, dependendo do organismo. a
6. Que afirmação(ões) se aplica(m) aos eucariotas? a) os ribossomas são maiores do que os dos procariotas; b) todos os pré-mRNAs especificam uma única proteína; c) não existem locais específicos de ligação ao ribossoma comparáveis às sequências SD (*Shine-Dalgarno*) dos procariotas; d) a metionina, e não a N-formilmetionina, inicia todas as cadeias nascentes de polipéptidos. a, c, d

Questões básicas

1. A seguinte sequência nucleotídica corresponde a parte da sequência codificante do exão de um gene:
5'-TGACGTATGCTTGACCTCCAAGCAATCGAT-3'
Assumindo o código genético *standard*, qual é a correcta sequência aminoacídica correspondente a esta fracção de exão?
R. Atendendo a que a tradução se pode dar em qualquer das três grelhas abertas de leitura, existem três hipóteses de sequências aminoacídicas:
Primeira grelha- 5'-**TGA** CGT ATG CTT GAC CTC CAA GCA ATC GAT-3'
Segunda grelha - 5'-T GAC GTA TGC TTG ACC TCC AAG CAA TCG AT-3'
Terceira grelha- 5'-TG ACG TAT GCT **TGA** CCT CCA AGC AAT CGA T-3'
Acresce que, no interior dos exões não é suposto existirem codões de terminação da tradução. Ora duas das possíveis grelhas abertas de leitura possuem codões *stop* (a negrito). Logo, a sequência aminoacídica correta será a correspondente à tradução da segunda grelha de leitura, isto é: N V C L T S K Q S M
2. Considere o heterodúplíce observado em microscopia electrónica, resultante da hibridação de um mRNA, isolado de um organismo eucariótico, com o correspondente fragmento de DNA.



- a) Qual é a cadeia de mRNA?
 b) Quantos intrões possui o gene em causa?

R. a) É a cadeia que não apresenta estruturas secundárias; b) O gene possui 7 intrões.

3. Um fragmento de DNA de 6 kb contém 3 genes: gene A com 1,5 kb; gene B com 1 kb e gene C com 2 kb, fazendo estes dois parte de um operão. O gene A é transcrito na direcção oposta à dos genes dos transcritos de B e C. Por último, os genes A e B sobrepõem-se em cerca de 350 pb nas suas extremidades 5'.

a) Represente com a ajuda de linhas e setas os 3 genes, utilizando todos os dados fornecidos e não se esquecendo de indicar a polaridade das cadeias de DNA.

b) Se ocorrer uma mutação pontual que gere uma mutação *nonsense* no gene A, na região de sobreposição com o gene B, quais as consequências para o gene B? E para o gene A?

R. b) O efeito no gene B vai depender do nucleótido do codão que foi mutado e dos nucleótidos que circundam o nucleótido mutado, podendo gerar-se também uma mutação *nonsense*, ou *missense* com troca de aminoácidos, ou silenciosa. O gene A gerará uma proteína truncada.

4.4 Regulação da expressão génica

4.4.1 Regulação da expressão génica em procariontes

Verdadeiro/Falso

1. Alguns genes são auto-regulados, o que significa que o produto proteico do próprio gene regula a sua própria transcrição. V
2. A expressão génica constante e independente de regulação *on/off* designa-se de expressão génica constitutiva. V
3. A existência de factores sigma (σ), como componentes da RNA polimerase de *E. coli*, permite uma regulação a nível da tradução. F
4. Nas vias anabólicas, a regulação da expressão dos genes que codificam produtos envolvidos nestas vias é, predominantemente, repressível. V
5. Nas vias catabólicas, a regulação da expressão dos genes que codificam produtos envolvidos nestas vias é, predominantemente, induzível. V
6. Um operão resulta no controlo coordenado dos genes nele incluídos porque todos os genes partilham os mesmos sinais ou sequências de início e fim da tradução. F
7. Uma mutação que impeça que a proteína activadora de catabolito (CAP – *Catabolite Activator Protein*) ou CRP (*cAMP Receptor Protein*) se ligue à região do promotor, no operão *lac*, conduzirá a elevados níveis de transcrição deste operão. F
8. O complexo cAMP-CAP é o regulador positivo (activador) do operão *lac*. V
9. A ausência no meio de cultura, de pelo menos um dos quatro aminoácidos encontrados no início do péptido líder, poderá causar atenuação da transcrição do operão do triptofano, mesmo quando o aminoácido está em quantidade limitante. V
10. Em procariontes e eucariotes, os *riboswitches* são regiões do mRNA que adquirem uma estrutura secundária ou terciária e que, por ligação de um ligando, podem alterar a sua conformação levando à activação ou inactivação da transcrição ou da tradução. V

Escolha múltipla

1. Qual dos mecanismos de regulação da expressão génica se aplica aos genes *housekeeping*? a) controlo induzível; b) regulação negativa; c) controlo positivo; d) controlo repressível; e) expressão constitutiva. e
2. O repressor activo é formado pela combinação de um co-repressor e de um: a) operador; b) apo-repressor; c) promotor; d) *enhancer*; e) atenuador. b

3. Mutações na região do promotor (P^+): a) são recessivas; b) são *cis*-dominantes; c) não podem ser complementadas com um P^+ ; d) causam expressão constitutiva do gene estrutural; e) são *cis*-recessivas. b, c
4. Um mutante constitutivo produz continuamente uma proteína que na estirpe selvagem é induzível. No mutante i^- do operão *lac*, a proteína que não se produz é: a) o repressor; b) o operador; c) a β -galactosidase; d) a permease; e) a transacetilase. a
5. Considere o operão *lac*. Quais as estirpes incapazes de crescer em meio de cultura cuja fonte de carbono é a lactose? a) estirpe *lacO^c*; b) estirpe *lacI^S*; c) estirpe com mutação no promotor (P^+); d) estirpe *lacI⁻*; e) estirpe *lacZ⁻*. b, c, e
6. Quais das seguintes afirmações caracterizam o cAMP? a) é um nucleótido; b) é sintetizado a partir de ATP; c) liga-se ao CRP; d) liga-se à RNA polimerase; e) liga-se ao repressor *lac*. a, b, c
7. A expressão do operão *lac* em *E. coli* é regulada por: a) produto do gene *lacI*; b) cAMP-CAP; c) metilação do operador; d) *splicing* alternativo do RNA policistrónico; e) mecanismo de atenuação. a, b
8. Em *E. coli*, o produto do gene regulador *lacI* é uma: a) DNA metilase; b) proteína repressora; c) proteína receptora do cAMP; d) proteína activadora da transcrição; e) β -galactosidase. b
9. O regulador positivo do operão *lac* é: a) a glucose; b) o produto do gene *lacI*; c) o indutor; d) o complexo cAMP-CAP; e) a lactose. d
10. A sequência nucleotídica da região do atenuador: a) é um potencial local de terminação da transcrição; b) desencadeia a degradação dos transcritos de RNA (que contêm sequências idênticas); c) é o local do início da transcrição; d) é o local de ligação do complexo cAMP-CAP; e) regula a transcrição do operão do *trp*. a, e
11. No operão *trp*, um único gene estrutural, *trpR*, codifica uma proteína reguladora inactiva denominada: a) co-repressor; b) holo-repressor; c) apo-repressor; d) co-activador; e) atenuador. c
12. A região líder do operão biossintético do triptofano codifica RNA que pode funcionar relativamente ao operão como: a) co-repressor; b) holo-repressor; c) apo-repressor; d) co-activador; e) atenuador. e
13. A atenuação do operão *trp* pode ocorrer: a) se o triptofano e todos os outros aminoácidos estiverem presentes em excesso; b) se a síntese do péptido líder não for iniciada; c) se o péptido líder estiver completo; d) se não estiverem presentes nem metionina nem N-formilmetionina; e) em todas as situações anteriores. e
14. O que poderá acontecer ao operão biossintético do triptofano se a região líder e o gene *trpR*, que codifica a proteína reguladora, forem removidos? a) vai ser expresso constitutivamente; b) vai ser totalmente atenuado; c) não vai ser transcrito; d) vai ser inibido pelo co-repressor; e) vai impedir a tradução dos genes envolvidos na biossíntese do triptofano. a
15. Em *E. coli*, a atenuação do operão *trp* deve-se essencialmente: a) a rearranjos programados de DNA; b) à produção de um mRNA policistrónico; c) ao rápido *turnover* do mRNA; d) ao acoplamento da transcrição e da tradução; e) à rápida capacidade de síntese de aminoácidos. d
16. Em *E. coli*, o co-repressor da biossíntese do triptofano é o: a) tRNA^{Trp}; b) triptofano; c) produto do gene *trpR*; d) atenuador; e) cAMP. b

Questões básicas

1. O que é a regulação negativa da transcrição e que tipos existem? Dê um exemplo para cada caso.
R. A regulação negativa da transcrição pressupõe a presença de um repressor que ao ligar-se a um operador altera o estado transcrional em curso. Existem dois tipos de regulação transcrional negativa: a induzível (ex. a regulação da expressão dos genes do operão *lac*) e a repressível (ex. a regulação dos genes do operão da arginina, triptofano etc).
2. A expressão de genes de alguns operões está sob o controlo de um repressor. Contudo, a acção do repressor desencadeia resultados transcrionais contraditórios. Explique a que se deve esta divergência.
R. Os operões sob o controlo transcrional de um repressor podem ser bloqueados ou activados na sua expressão, consoante se trate de um controlo repressível (*On-Off*) ou de um controlo induzível (*Off-On*), respectivamente. No primeiro caso, a transcrição está sempre a ocorrer até à síntese do co-repressor que se liga ao apo-repressor (de síntese constitutiva), formando o repressor activo, que por sua vez vai bloquear a transcrição do operão através da sua ligação ao operador. No segundo caso, a transcrição não ocorre devido à acção constante do repressor (cuja

síntese é constitutiva) e à ausência de um indutor; quando este está presente, liga-se ao repressor impedindo-o de exercer a sua acção sobre o operador.

- 3.** Como é que um operão assegura a expressão coordenada dos genes nele incluídos? É comum encontrar operões nos eucariotas?

R. Um operão permite a regulação coordenada da actividade génica porque todos os genes do operão partilham o mesmo promotor, estando sob o mesmo controlo transcricional. Os genes de um operão originam, geralmente, um grupo de enzimas com funções relacionadas que são assim traduzidas a partir de uma mesma mensagem, denominada policistronica.

- 4.** O que entende por *codon usage*?

R. Recordando que o código genético é degenerado, o *codon usage* refere-se aos codões mais frequentemente presentes nas regiões codificantes dos diferentes organismos, sendo por isso uma especificidade de cada organismo. A prevalência destes codões poderá ter sido evolutivamente seleccionada e em geral depende da disponibilidade dos tRNAs com o respectivo anticodão.

- 5.** O operão permite um tipo de regulação coordenada de genes que codificam enzimas com funções relacionadas, cuja síntese ocorre a partir de mRNAs policistronicos. Todas estas proteínas serão sintetizadas na mesma quantidade? Explique.

R. Geralmente as proteínas cujos genes pertencem a um mesmo operão não são sintetizadas exactamente na mesma quantidade pois há toda uma série de factores e mecanismos que podem condicionar a sua produção, como por exemplo: 1 – o acoplamento entre a transcrição e a tradução nos procariotas permite que a tradução se inicie imediatamente após a síntese do mRNA, tendo assim o primeiro gene transcrito mais hipóteses de ter mais inícios de tradução; 2 – o facto de cada gene possuir o seu próprio RBS para o qual o RNA ribossomal 16S da subunidade menor do ribossoma poderá apresentar uma maior ou menor afinidade, reflectindo-se em diferentes eficiências de início da tradução; 3 – a existência de diferentes codões em cada gene que, dependendo da concordância com o *codon usage* do hospedeiro, poderão ser mais ou menos eficientemente traduzidos; 4 – a presença de elementos de instabilidade no mRNA, que conduzem à sua degradação, podem afectar diferencialmente a tradução dos genes, ainda que todos os genes pertençam ao mesmo transcrito.

- 6.** Em muitos casos, os operadores estão na proximidade dos promotores que controlam, enquanto que os locais de ligação dos activadores estão mais distantes. Como explica esta diferença?

R. Os operadores estão geralmente próximos dos promotores para que a ligação da RNA polimerase ao promotor seja impedida após a ligação do respectivo repressor. Os locais de ligação dos activadores podem situar-se numa região mais distante porque o activador activa a transcrição por interacção com a RNA polimerase, o que pode ocorrer por dobra da molécula de DNA.

- 7.** O gene que codifica o repressor de um operão bacteriano deverá localizar-se próximo dos genes estruturais? Explique.

R. Não necessariamente, porque o repressor é uma proteína difusível cujo gene se poderá localizar noutro local do genoma e após expressão o seu produto dirigir-se para o local onde exerce a sua função. O repressor do triptofano é um exemplo ilustrativo, pois o gene que o codifica encontra-se bastante afastado do local dos genes estruturais onde actua.

- 8.** Um mutante constitutivo produz continuamente uma proteína que na estirpe selvagem é induzível. Dê exemplos e caracterize geneticamente as alterações que na molécula de DNA podem levar ao desenvolvimento de mutantes constitutivos.

R. Se a regulação da síntese de uma proteína é induzível, significa que em condições normais a sua síntese poderá estar reprimida pela acção de um repressor. Logo, se se mutagenizar o operador, i.e., a região onde se liga o repressor, gera-se um mutante constitutivo. Por outro lado, se se mutagenizar o gene que codifica o próprio repressor, de forma a que este deixe de ter capacidade de se ligar ao operador, também ocorre uma expressão constitutiva.

- 9.** Diversas vias metabólicas são reguladas por um mecanismo de inibição por *feedback*, no qual a síntese da primeira enzima é inibida devido à interacção com o produto final da via quando este existe em concentração suficiente. Por que razão uma via metabólica requer geralmente a inibição da síntese da primeira enzima, e não da última enzima?

R. A inibição da última enzima permitiria a acumulação de intermediários sem qualquer utilidade (ou que poderiam ser nocivos). Assim, o bloqueio da síntese da primeira enzima impedirá a produção destes intermediários.

- 10.** Dois genes de *E. coli*, *A* e *B*, encontram-se muito próximos um do outro, mas não formam um operão. Isolou-se um mutante de deleção em que a actividade quer do gene *A* quer do gene *B* foi eliminada. Nem a proteína *A* nem a proteína *B* são encontradas neste mutante, mas uma nova proteína é isolada,

na qual os 30 primeiros aminoácidos da região N-terminal são idênticos aos do produto do gene B e os 30 aminoácidos da região C-terminal são idênticos aos do produto do gene A.

a) Relativamente à orientação 5'-3' da cadeia de DNA não transcrita, qual é a ordem dos genes, AB ou BA?

b) Ainda que não tenha dados suficientes sobre a extensão da deleção em cada um dos genes, como interpreta o aparecimento de uma nova proteína que respeita a sequência parcial de aminoácidos das proteínas A e B?

c) Serão as proteínas A e B sintetizadas na mesma quantidade na estirpe selvagem? Justifique.

d) Compare a produção relativa das proteínas A e B na estirpe selvagem, com a da proteína híbrida na estirpe mutante.

R. a) A ordem dos genes é BA; b) Em cada um dos genes as deleções afetaram um número múltiplo de 3 relativamente à região codificante, pois mantiveram-se os 30 aminoácidos na segunda metade C-terminal (com origem na proteína A); c) As proteínas A e B provavelmente não serão sintetizadas na mesma quantidade porque têm regulações transcricionais e traducionais independentes; d) A proteína híbrida poderá ter uma expressão idêntica à da proteína B (pois mantém o início de transcrição e de tradução do gene B). Contudo, se o *codon usage* do gene A for muito diferente do gene B, assim como os sinais que conduzem à degradação do mRNA, a produção da proteína híbrida irá diferir da proteína B.

- 11.** Deleta uma curta sequência de DNA de 30 pb, região A, localizada a montante do início da transcrição de um gene X, e observa um aumento de 5 vezes relativamente à produção da proteína correspondente. Deleta também uma curta sequência de DNA, região B, 40 pb a montante de A, e observa ainda um aumento de 7 vezes relativamente à expressão do gene. Remove ambas as regiões e verifica um aumento de 60 vezes da proteína X. Como interpreta estes resultados?

R. Existem duas possíveis explicações: 1 – A região A e a região B poderão corresponder a dois locais de ligação de um repressor, que actuam sinergisticamente. Cada um, independentemente, conduz a um aumento de síntese de proteína, mas em conjunto, a quantidade de proteína produzida é muito superior à soma das partes. Para confirmar esta hipótese ter-se-ia de sequenciar as referidas regiões e verificar se possuem alguma sequência consenso correspondente ao local de ligação do repressor; 2 – O local de ligação do operador poderá ser muito extenso, abrangendo as regiões A e B, e as deleções parciais terem um efeito menos acentuado do que a deleção total.

- 12.** O que é o RNA *antisense*? Como controla a expressão génica? Dê um exemplo.

R. O RNA *antisense* refere-se a sequências complementares de outras sequências de DNA ou RNA. Nas células bacterianas estas moléculas podem ligar-se à região 5'-UTR, impedindo a ligação do ribossoma e, conseqüentemente, a tradução.

- 13.** Os mRNAs são degradados enzimaticamente mais depressa do que os rRNAs ou os tRNAs. Porquê?

- 14.** Quando a glucose está presente, numa estirpe de *E. coli*, a concentração de cAMP é alta ou baixa? Uma estirpe com uma mutação que torna a adenil ciclase inactiva, ou com uma mutação no gene *crp*, pode sintetizar a β -galactosidase? A ligação de cAMP-CAP ao DNA afecta a ligação do repressor?

R. A concentração de cAMP é baixa na presença de glucose. Não pode sintetizar β -galactosidase em ambas as situações, pois as duas mutações são fenotipicamente *lac*⁻. A ligação de cAMP-CAP não interfere com a ligação do repressor porque os locais de ligação ao DNA são distintos e não se sobrepõem.

- 15.** Porque é que o operão *lac* de *E. coli* não é induzível na presença de glucose?

R. Porque na presença de glucose as células bacterianas têm níveis muito baixos de cAMP. Sem cAMP, não se forma o complexo cAMP-CAP, e a transcrição não é ativada logo, não ocorre a síntese das proteínas Lac. A falta de indução ocorre mesmo na presença de lactose. Este sistema assegura o consumo das fontes de carbono primárias antes da célula gastar energia na síntese de novas enzimas que utilizam fontes de carbono secundárias.

- 16.** A ausência do repressor *lac* é suficiente para que se dê o início da transcrição do operão *lac*?

R. Não. A transcrição do operão *lac* requer, para além da ausência do repressor, a presença do complexo cAMP-CAP.

- 17.** Quais os possíveis genótipos de um mutante que manifesta uma incapacidade de utilizar simultaneamente diversas fontes de carbono, mas cujas operações responsáveis pelo metabolismo de cada um desses açúcares não apresenta qualquer mutação?

R. O mutante tem claramente uma deficiência no sistema geral de regulação do metabolismo dos açúcares, sendo o mais provável o sistema regulador dependente de cAMP. Assim, são várias as mutações possíveis, desde uma mutação no gene *crp*, que o torna inactivo ou no gene da adenil ciclase que impede que se sintetize o cAMP.

- 18.** Uma estirpe mutante de *E. coli* produz constitutivamente as enzimas β -galactosidase e permease, isto é, na presença ou ausência de lactose.

a) Quais os dois possíveis genótipos desta estirpe?

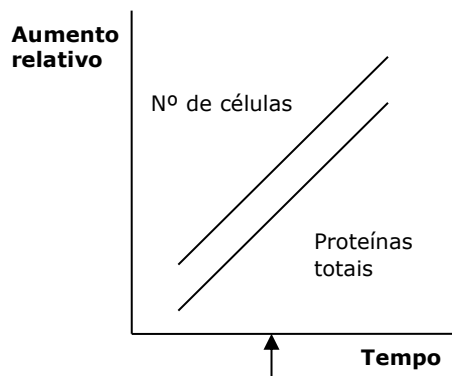
- b) Um outro mutante produz constitutivamente β -galactosidase não activa e permease se houver lactose no meio. Qual é o genótipo deste mutante?
- c) Criou-se um diplóide parcial dos mutantes referidos em a) e em b). Na ausência de lactose, nenhuma das enzimas é sintetizada; na presença de lactose, ambas as enzimas são sintetizadas. Qual é o genótipo do mutante referido em a)?

R. a) Os dois possíveis genótipos são $lacI^-$, $lacO^c$. b) O segundo mutante terá de ser $lacZ^-$ porque não produz β -galactosidase, sendo a síntese da permease induzida pela lactose e com o sistema repressor/operador a funcionar normalmente. c) Como o diplóide parcial revela uma regulação negativa induzível, o operador no operão com o gene funcional $lacZ$ (estirpe em a)) tem de ser selvagem. Logo, o mutante da alínea a) terá de ser $lacI^-$.

19. Represente num esquema as características, abaixo indicadas, referentes ao operão *lac*:

- codão de iniciação da tradução
- região do operador
- orientação das cadeias
- gene *lacZ*
- local de ligação CAP-cAMP
- região Shine-Dalgarno (SD) ou local de ligação do ribossoma (RBS)
- gene *lacY*
- início da transcrição
- gene *lacI*
- sequências consenso -10 e -35
- gene *lacA*
- terminação da transcrição
- terminação da tradução

20. Uma cultura de células de *E. coli*, a meio da fase logarítmica de crescimento, é suplementada com mais nutrientes, em particular uma fonte de carbono.



a) Represente com uma linha tracejada o que observa em relação à síntese de β -galactosidase, e com uma linha contínua o número de células totais, se adicionar lactose no momento assinalado com uma seta.

b) Represente com uma linha tracejada o que observa em relação à síntese de β -galactosidase, e com uma linha contínua o número de células totais, se se adicionar lactose e, simultaneamente, glucose.

21. Se propagar *E. coli* em cada um dos seguintes meios, em quais esperaria que ocorresse transcrição do operão *lac*?

- i. Meio LB suplementado com glucose
- ii. Meio LB suplementado com glucose e lactose (apenas após o esgotamento da glucose)
- iii. Meio LB suplementado com lactose
- iv. Meio mínimo

R. i. Não há transcrição do operão *lac*; ii. Há transcrição do operão *lac* apenas após o esgotamento da glucose; iii. Há transcrição do operão *lac*; iv. Não há propagação da estirpe.

22. Nos diplóides parciais abaixo discriminados, indique se a expressão *lacZ* é constitutiva ou induzível (F' indica o plasmídeo F).

- i. $F' I^- O^+ Z^- / I^+ O^+ Z^+$
- ii. $F' I^- O^+ Z^- / I^- O^- Z^+$
- iii. $F' I^- O^+ Z^- / I^+ O^- Z^+$

R. A expressão *lacZ* é: i) induzível; ii) constitutiva; iii) constitutiva;

- 23.** Suponha que *E. coli* de genótipo $I^- Z^+ Y^+$ é propagada num meio contendo lactose como única fonte de carbono. Junta-se glucose. Quais das seguintes situações se verificará?
- Nenhum efeito
 - A lactose deixa de ser utilizada pela célula
 - Deixa de se produzir mRNA *lac*
 - O repressor ligar-se-á ao operador

R. A alínea a) não é de considerar na medida em que quando se juntar glucose vai ocorrer repressão catabólica. De acordo com este efeito, a lactose deixa de ser utilizada pela célula (alínea b está por isso correcta) e consequentemente deixa de se produzir mRNA *lac* (alínea c também correcta). Por último, como a estirpe é $lacI^-$, significa que não há qualquer repressor para se ligar ao operador.

- 24.** Suponha que lhe são fornecidos os seguintes merodiplóides (diplóides parciais, referentes ao operão *lac*).

- $I^- P^+ O^+ Z^- Y^+ A^+ / F' I^+ P^- O^c Z^+ Y^- A^-$
- $I^s P^- O^+ Z^+ Y^- A^- / F' I^+ P^+ O^c Z^- Y^+ A^+$

- Represente numa tabela, se prevê ou não a transcrição do operão *lac* e a síntese de β -galactosidase, permease e transacetilase activas, em cada um dos merodiplóides, na presença e ausência de lactose.
- Explique porque é que *E. coli* His^- é um organismo auxotrófico e *E. coli* Lac^- não o é.

R.a)

i. $I^- P^+ O^+ Z^- Y^+ A^+ / F' I^+ P^- O^c Z^+ Y^- A^-$				
	Transcrição	β -galactosidase	Permease	Transacetilase
Ausência lactose	-	-	-	-
Presença lactose	√	-	√	√

- A estirpe *E. coli* His^- é auxotrófica porque não tendo capacidade para sintetizar a histidina devido à mutação num dos genes envolvidos na sua via biossintética, não consegue crescer em meio mínimo que contém unicamente sais e uma fonte de carbono. Já a estirpe *E. coli* Lac^- , consegue crescer em meio mínimo pois tem capacidade de sintetizar todos os compostos orgânicos (aminoácidos) necessários ao seu crescimento.

4.5 Regulação da expressão génica em eucariotas

Verdadeiro/Falso

- Regiões do DNA mais acetiladas são mais sensíveis à digestão (clivagem) com a DNase I. V
- Muitas proteínas activadoras da transcrição possuem *helix-turn-helix* motivos de ligação ao DNA que se designam de *zinc fingers* porque a estrutura enrolada incorpora um íão zinco. V

Escolha múltipla

- Em relação à acetilação/desacetilação das histonas, quais dos seguintes acontecimentos acompanham o início da transcrição em eucariotas? a) as desacetilases ligam-se a sequências metiladas e anulam a carga positiva das lisinas, de forma a que ocorre a compactação da cromatina; b) as sequências não metiladas, geralmente, previnem a acetilação; c) as sequências metiladas, geralmente, recrutam HATs; d) as acetilases anulam a carga positiva das lisinas, podendo ocorrer a descondensação da cromatina. B d
- Na globalidade dos organismos, as razões moleculares para que algumas sequências codifiquem para mais do que uma proteína, são: a) cadeias codificantes complementares; b) *splicing* alternativo; c) codões de iniciação ou de terminação alternativos; d) sobreposição de genes adjacentes em que parte da mesma sequência é lida em grelhas de leitura diferentes; e) promotores alternativos. B, c, d e
- Em eucariotas, a metilação das bases nitrogenadas do DNA, pode ter o(s) seguinte(s) efeito(s): a) altera a sequência do DNA de modo que os codões alteram-se gerando outros codões; b) o DNA modificado é selectivamente degradado; c) ocorre remodelação da cromatina, conduzindo à transcrição dos genes próximos; d) altera-se o estado bioquímico do DNA e como tal o seu estado funcional. d
- Tanto quanto se sabe, o RNAi *in vivo* actua: a) na degradação do DNA; b) na degradação do RNA; c) na repressão traducional; d) como guia para a metilação do DNA; e) como guia para o início da transcrição em eucariotas. b, c, d
- Onde se localizam os elementos de instabilidade (estabilidade VER) do mRNA das células eucarióticas? a) *cap* 5'; b) poli-A 3'; c) 5'-UTR; d) 3'-UTR; e) em determinadas sequências da região codificante do mRNA. a, b, c, d, e

Questões básicas

1. Que alterações sofre a estrutura da cromatina e qual o papel destas alterações na regulação da expressão génica?

R. As alterações da cromatina podem reprimir ou estimular a expressão génica. Os genes mais transcritos localizam-se, geralmente, em zonas mais sensíveis à DNaseI, sugerindo que a estrutura da cromatina está mais aberta. A acetilação das histonas pela acetiltransferase destabiliza a estrutura dos nucleossomas e aumenta a transcrição (e a hipersensibilidade à DNaseI). A reacção reversa, efectuada pelas desacetilases, estabiliza de novo a estrutura dos nucleossomas. Existem ainda os CRC (Complexos Reguladores da Cromatina), proteínas reguladoras, e também factores de transcrição, que alteram a conformação da cromatina sem acetilação. Os CRC aumentam o início da transcrição porque aumentam a acessibilidade dos factores de transcrição ao promotor.

2. Em eucariotas uma única molécula efectora pode regular a síntese de diferentes proteínas que são codificadas por moléculas de mRNAs distintas. Esta regulação pode ocorrer a diferentes níveis no processo de expressão génica. Considere as seguintes situações e indique em que passo da expressão génica, ocorre a regulação.

- Quando não se observa RNA citoplasmático nem RNA nuclear
- Quando se observa RNA nuclear, mas não citoplasmático
- Quando se observa RNA citoplasmático e nuclear, mas nenhum deles se encontra associado a polissomas.

R. a) Transcrição; b) Procesamento do RNA; c) Tradução

3. Compare a regulação génica a nível da transcrição, em bactérias e em eucariotas. Indique com **S** as semelhanças, com **B** as características bacterianas, com **E** as características de células eucarióticas e com **N** a ausência de relação com a regulação transcricional.

- expressão coordenada através de elementos de resposta E
- processo regulado por activadores e repressores S
- necessidade de um *primer* de RNA N
- envolve cascatas de regulação em que produtos génicos ativam outra série de genes S
- necessidade de sequências estimuladoras (*enhancers*) E
- interacção entre o *cap* a 5' e a cauda poli-A a 3' E
- dependente da estrutura da cromatina E
- necessidade de factores gerais de transcrição, para além da RNA polimerase, para o início da transcrição E
- expressão coordenada através de operões B

4. Considerando o sentido da expressão génica, coloque por ordem os níveis de controlo que se observam na regulação da expressão génica em eucariotas:

- Processamento do mRNA
- Transcrição
- Remodelação da cromatina ou estrutura do DNA
- Estabilidade do mRNA
- Modificação de proteínas
- Regulação a nível da tradução

R. iii, ii, i, iv, vi, v

5. Qual o papel da estabilidade do RNA na regulação da expressão génica? Que regiões controlam a estabilidade do RNA nas células eucarióticas?

R. *cap* 5', poli-A 3', 5' UTR, 3' UTR e regiões codificantes no mRNA.

4.5 Modificações co- pós-traducionais, tráfego e localização das proteínas

Verdadeiro/Falso

- O enrolamento das proteínas refere-se ao processo complexo pelo qual as cadeias polipeptídicas atingem uma estrutura tridimensional estável através de interações químicas entre aminoácidos próximos e interações entre aminoácidos distantes em diferentes partes da molécula. V
- O processo de enrolamento das proteínas é facilitado por uma classe de proteínas conhecidas como chaperões. V
- Mutações que alteram a um único aminoácido envolvido nas modificações químicas pós-traducionais de determinada proteína, podem conduzir à síntese de uma proteína selvagem com uma diferente localização celular (mutante condicional). V