

# 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.
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.
3. Na dupla cadeia de DNA, a orientação do promotor determina o sentido de transcrição dos genes.
4. As RNA polimerases têm actividade de revisão de provas.
5. A direcção de transcrição de um gene no sentido 5' – 3' ou 3' – 5' depende da cadeia de DNA onde se localiza.

#### 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.
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.
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.
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.
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.
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.

#### Questões básicas

1. Quais as particularidades da síntese de RNA pela RNA polimerase?
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?
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:
  - a) uma mutação *missense*
  - b) uma mutação *nonsense*
  - c) uma mutação *frameshift*

4. 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 procariontes

##### Verdadeiro/Falso

1. Na dupla cadeia de DNA, o sentido de transcrição dos genes é determinado pela orientação do RBS (*Ribosome Binding Site*).
2. Em procariontes, 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.
3. A transcrição de determinado gene procarionte depende unicamente da subunidade sigma disponível na célula.
4. Sigma 70 é a principal subunidade  $\sigma$ , responsável pelo início da transcrição da maior parte dos genes em *E. coli*.
5. A terminação da tradução em procariontes pode ser dependente da proteína Rho.

##### Escolha múltipla

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

Região A	Região B	Região C	Região D
5' ... ACTGTACGTACGTACAATATAGAAGCACTCTACTGTCAACTCAATAGCCATTAGTTAGCCC ... 3'			
3' ... TGACATGCATGCATGTTATATCTTCGTGAGATGACAGTTGAGTTATCGGTAATCAATCGGG ... 5'			
	+1    -10	-35	

- a) 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.
  - b) 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'.
  - c) 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.
2. O que é exclusivo da expressão génica em procariontes? a) sequências promotoras; b) transcrição e tradução acopladas; c) poliadenilação a 3' do mRNA; d) mRNA policistrónico; e) polissomas.

##### Questões básicas

1. Descreva como é que a estrutura do promotor afecta a expressão génica em *E. coli*.
2. Como termina a transcrição em *E. coli*?
3. A produção de um mRNA policistrónico em procariontes pode funcionar como um mecanismo de regulação génica coordenado. Em que tipo de situações ou grupos de genes é comum esta regulação coordenada?
4. Exemplificando, descreva como é que o uso de subunidades sigma alternativas permite à bactéria alterar o seu padrão de expressão génica.
5. Um investigador utilizou um processo de mutagénese 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.

#### 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.
2. Os promotores dos procariotas e dos eucariotas apresentam as mesmas sequências conservadas.
3. A transcrição em eucariotas requer um complexo que é globalmente formado por factores gerais de transcrição (GTF — *General Transcription Factors*).
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.
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.
6. O processamento do pré-mRNA ocorre no citoplasma.
7. Os intrões *self-splicing* são considerados ribozimas.
8. À semelhança da telomerase os snRNPs (*small nuclear RiboNucleoProtein*) são ribonucleoproteínas.
9. Em eucariotas, a RNA polimerase I transcreve genes diferentes dos da RNA polimerase III.
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.
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.
12. A terminação da transcrição dos genes nucleares em eucariotas requer sempre poliadenilação.
13. A proteína Rho é responsável pela terminação da transcrição em eucariotas.

## **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.

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.
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.
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.
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.
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.
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*.

8. Que interações são importantes para a função do spliceossoma? a) interações proteína-RNA; b) interações proteína-DNA; c) interações proteína-proteína; d) emparelhamento de bases RNA-RNA; e) emparelhamento de bases DNA-DNA.
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.
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 transcripcionais promovendo a expressão de genes específicos; e) proteína que se liga à RNA polimerase e que favorece a velocidade de transcrição.

### **Questões básicas**

1. O que é um transcrito primário? Como é que o transcrito primário dos eucariotas difere do dos procariotas?
2. Existe alguma proteína nos eucariotas com uma função análoga à do factor sigma identificado nos procariotas?
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.
4. Explique por que razão alguns dos antibióticos utilizados em humanos têm como alvo as RNA polimerases bacterianas?
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

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

### **Verdadeiro/Falso**

1. O código genético é universal.
2. Algumas moléculas de pré-rRNA também contêm moléculas de tRNA.
3. Os genes que codificam tRNAs têm codões de iniciação da tradução.
4. Os snoRNAs estão envolvidos no processamento dos rRNAs 45S eucarióticos.
5. Os snRNAs estão envolvidos no processamento dos rRNAs em procariotas.

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

### **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.
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.
3. O que se encontra no nucléolo? a) genes que codificam rRNAs; b) rRNAs; c) snoRNAs; d) complexos rRNA–proteínas; e) snRNAs.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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.

### **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?
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?
3. O que são ribozimas e a que tipos de reacções bioquímicas estão, geralmente, associadas?
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?
5. Quais as características essenciais do código genético?
6. Indique alguns sistemas genéticos que não usem o código genético padrão (*standard*).

### ***4.3 Tradução em procariotas e eucariotas***

#### **Verdadeiro/Falso**

1. A extremidade amínica (NH<sub>2</sub>) do polipéptido corresponde à extremidade 3' do mRNA.
2. Em procariotas, as ligações peptídicas resultam da actividade enzimática do rRNA 23S contido na subunidade ribossómica 50S.
3. Nos procariotas, o início de uma nova cadeia polipeptídica, requer a ligação do f-Met-tRNA ao local A do ribossoma.
4. Quer em organismos unicelulares quer em organismos multicelulares, a quantidade e tipo de proteína presente nos núcleos das células diplóides nunca é alterada.

#### **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.
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<sup>Met</sup> iniciador neste local.
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'.
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.
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.

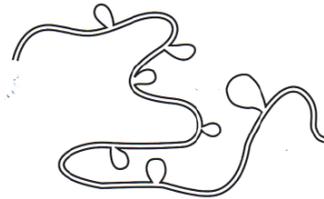
6. Que afirmação(ões) se aplica(m) aos eucariotas? a) os ribossomas são maiores do que os dos procariontes; b) todos os pré-mRNAs especificam uma única proteína; c) não existem locais específicos de ligação ao ribossoma comparáveis às sequências SD (*Shine-Dalgarno*) dos procariontes; d) a metionina, e não a N-formilmetionina, inicia todas as cadeias nascentes de polipéptidos.

### **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?

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?

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?

## **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.
2. A expressão génica constante e independente de regulação *on/off* designa-se de expressão génica constitutiva.
3. A existência de factores sigma ( $\sigma$ ), como componentes da RNA polimerase de *E. coli*, permite uma regulação a nível da tradução.
4. Nas vias anabólicas, a regulação da expressão dos genes que codificam produtos envolvidos nestas vias é, predominantemente, repressível.
5. Nas vias catabólicas, a regulação da expressão dos genes que codificam produtos envolvidos nestas vias é, predominantemente, induzível.
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.
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.
8. O complexo cAMP-CAP é o regulador positivo (activador) do operão *lac*.
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.

10. Em procariotas e eucariotas, 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.

### **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.
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.
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.
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  $\beta$ -galactosidase; d) a permease; e) a transacetilase.
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<sup>c</sup>*; b) estirpe *lacI<sup>S</sup>*; c) estirpe com mutação no promotor ( $P^-$ ); d) estirpe *lacI^-*; e) estirpe *lacZ^-*.
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*.
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)  $\beta$ -galactosidase.
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.
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*.
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.
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.
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.
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.
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.
16. Em *E. coli*, o co-repressor da biossíntese do triptofano é o: a) tRNA<sup>Trp</sup>; b) triptofano; c) produto do gene *trpR*; d) atenuador; e) cAMP.

### **Questões básicas**

1. O que é a regulação negativa da transcrição e que tipos existem? Dê um exemplo para cada caso.

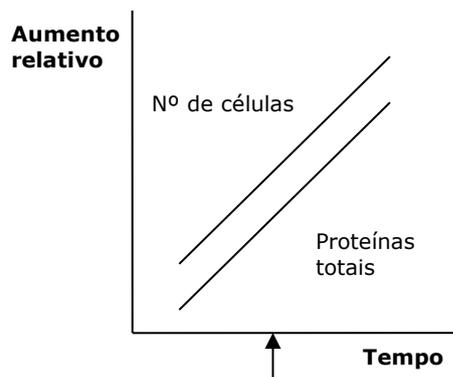
2. A expressão de genes de alguns operões está sob o controlo de um repressor. Contudo, a acção do repressor desencadeia resultados transcricionais contraditórios. Explique a que se deve esta divergência.
3. Como é que um operão assegura a expressão coordenada dos genes nele incluídos? É comum encontrar operões nos eucariotas?
4. O que entende por *codon usage*?
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.
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?
7. O gene que codifica o repressor de um operão bacteriano deverá localizar-se próximo dos genes estruturais? Explique.
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.
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?
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.
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?
12. O que é o RNA *antisense*? Como controla a expressão génica? Dê um exemplo.
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  $\beta$ -galactosidase? A ligação de cAMP-CAP ao DNA afecta a ligação do repressor?
15. Porque é que o operão *lac* de *E. coli* não é induzível na presença de glucose?
16. A ausência do repressor *lac* é suficiente para que se dê o início da transcrição do operão *lac*?
17. Quais os possíveis genótipos de um mutante que manifesta uma incapacidade de utilizar simultaneamente diversas fontes de carbono, mas cujos operões responsáveis pelo metabolismo de cada um desses açúcares não apresenta qualquer mutação?
18. Uma estirpe mutante de *E. coli* produz constitutivamente as enzimas  $\beta$ -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  $\beta$ -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)?

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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

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.  $F' I^- O^+ Z^- / I^+ O^- Z^+$

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?

- a) Nenhum efeito
- b) A lactose deixa de ser utilizada pela célula
- c) Deixa de se produzir mRNA *lac*
- d) O repressor ligar-se-á ao operador

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

- i. I<sup>-</sup> P<sup>+</sup> O<sup>+</sup> Z<sup>-</sup> Y<sup>+</sup> A<sup>+</sup> / F' I<sup>+</sup> P<sup>-</sup> O<sup>c</sup> Z<sup>+</sup> Y<sup>-</sup> A<sup>-</sup>
- ii. I<sup>s</sup> P<sup>-</sup> O<sup>+</sup> Z<sup>+</sup> Y<sup>-</sup> A<sup>-</sup> / F' I<sup>+</sup> P<sup>+</sup> O<sup>c</sup> Z<sup>-</sup> Y<sup>+</sup> A<sup>+</sup>

- 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.
- b) Explique porque é que *E. coli* His<sup>-</sup> é um organismo auxotrófico e *E. coli* Lac<sup>-</sup> não o é.

#### 4.5 Regulação da expressão génica em eucariotas

##### Verdadeiro/Falso

1. Regiões do DNA mais acetiladas são mais sensíveis à digestão (clivagem) com a DNase I.
2. 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.

##### Escolha múltipla

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

##### Questões básicas

1. Que alterações sofre a estrutura da cromatina e qual o papel destas alterações na regulação da expressão génica?
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.
  - a) Quando não se observa RNA citoplasmático nem RNA nuclear
  - b) Quando se observa RNA nuclear, mas não citoplasmático
  - c) Quando se observa RNA citoplasmático e nuclear, mas nenhum deles se encontra associado a polissomas.
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
  - processo regulado por activadores e repressores
  - necessidade de um *primer* de RNA
  - envolve cascatas de regulação em que produtos génicos ativam outra série de genes
  - necessidade de sequências estimuladoras (*enhancers*)

- interacção entre o *cap* a 5' e a cauda poli-A a 3'
  - dependente da estrutura da cromatina
  - necessidade de factores gerais de transcrição, para além da RNA polimerase, para o início da transcrição
  - expressão coordenada através de operações
4. Considerando o sentido da expressão génica, coloque por ordem os níveis de controlo que se observam na regulação da expressão génica em eucariotas:
- i. Processamento do mRNA
  - ii. Transcrição
  - iii. Remodelação da cromatina ou estrutura do DNA
  - iv. Estabilidade do mRNA
  - v. Modificação de proteínas
  - vi. Regulação a nível da tradução
5. Qual o papel da estabilidade do RNA na regulação da expressão génica? Que regiões controlam estabilidade do RNA nas células eucarióticas?

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

##### **Verdadeiro/Falso**

1. 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.
2. O processo de enrolamento das proteínas é facilitado por uma classe de proteínas conhecidas como chaperões.
3. 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).