



SELEÇÃO 2018

Gabarito da prova escrita

1- A eletroforese bidimensional é uma ferramenta importantíssima em investigações bioquímicas. Ela combina duas formas diferentes de separação de proteínas: a focalização isoeletrica e a eletroforese do tipo SDS-PAGE. Em cada uma de suas etapas as proteínas são separadas por diferentes características. Explique que tipo de separação acontece em cada etapa. Em que situação um pesquisador deve lançar mão dessa técnica? Quais são as limitações nesse tipo de experimento?

Os fundamentos da eletroforese bidimensional foram introduzidos em 1975. A técnica resulta da combinação da focalização isoeletrica e da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. As proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico pela focalização isoeletrica, na primeira dimensão e, na segunda dimensão, as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares.

A SDS-PAGE, eletroforese unidimensional, consiste em um método para a separação de polipeptídios de acordo com os seus pesos moleculares. A técnica é realizada em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS). No entanto, os métodos unidimensionais de separação podem separar um número relativamente pequeno de proteínas (geralmente menos de 50). A eletroforese bidimensional apresenta uma maior capacidade para separar misturas complexas. Ao combinar dois processos distintos de separação pode ser usada para separar mais de 1000 proteínas num único gel (Anderson & Anderson, 1996, Galdos, 2009).

Apesar de ser amplamente utilizada, este método apresenta problemas de reprodutibilidade, uma vez que é incapaz de detectar proteínas em baixa abundância, ou altamente hidrofóbicas. Também apresenta baixa sensibilidade na identificação de proteínas com valores de pH muito baixo ($\text{pH} < 3$) ou muito alto ($\text{pH} < 10$) e massas moleculares muito pequenas ($M_r < 10$ kD) ou muito grande ($M_r > 150$ kD) (Baltimore, 2001; Alaoui-Jamali & Xu, 2006).

2- Sobre experimentos de proteômica, considere as duas afirmativas abaixo:

a) A cada novo experimento realizado torna-se virtualmente mais fácil a identificação de proteínas com os dados obtidos através de espectrometria de massas.

b) Estudos de proteômica são intimamente ligados à estudos de genômica, e, portanto, é muito mais fácil identificar proteínas de organismos com genoma conhecido do que organismos com genoma desconhecido.

Agora analise as duas afirmativas, diga se concorda ou discorda com elas e as discuta.

As duas afirmativas são verdadeiras. A afirmativa número 1 é correta porque, como etapa final na realização de um proteoma, os dados de espectrometria de massas devem ser comparados com banco de dados de proteínas. Cada novo experimento realizado aumenta o conteúdo desses bancos de dados, permitindo que as comparações subsequentes sejam feitas contra um número maior e mais diversos de proteínas. Teoricamente, isso facilita a identificação a cada novo experimento.

A afirmativa número dois também é correta. Idealmente, os valores das massas obtidos na espectrometria de massas são comparados com bases de dados de digestões virtuais do proteoma teórico do organismo analisado. Se este organismo já possui um genoma conhecido, todas as ORFs (open reading frames) já estão mapeadas, e os programas que fazem a comparação "sabem o que esperar" do conjunto de proteínas.

Nos casos em que o genoma dos organismos ainda não foi estudado, no entanto, comparam-se os dados da espectrometria de massas com as digestões virtuais de proteomas derivados de genomas conhecidos procedentes de espécies estreitamente relacionadas (as mais próximas possíveis). Apesar de ser a melhor solução para casos assim, esse procedimento traz incertezas na hora de determinar algumas proteínas, uma vez que existe variação no conjunto previsto de proteínas entre diferentes organismos.

3 - Quais são as estratégias que o sistema imune inato utiliza para identificar patógenos e danos celulares?

O sistema imune inato utiliza receptores de reconhecimento de padrão associados à célula, presentes no plasma, em membranas endossomais e no citosol, para reconhecer estruturas chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são compartilhadas por microrganismos, não estão presentes nas células de mamíferos e são frequentemente essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, limitando, assim, a capacidade dos microrganismos de evadir à detecção com mutação ou perda da expressão destas moléculas. Além disso, esses receptores reconhecem moléculas produzidas pelo hospedeiro, mas cuja expressão ou localização indicam dano celular; eles são denominados padrões de moleculares associados ao dano (DAMPs). Os receptores de



reconhecimento de padrão molecular de patógenos (PRRs) estão expressos na superfície de fagócitos (primariamente macrófagos e neutrófilos), células dendríticas, células epiteliais que formam a interface da barreira entre o corpo e o meio ambiente externo e muitos outros tipos de células que ocupam tecidos e órgãos. São também encontrados em vesículas fagocíticas e no citosol de vários tipos celulares. Como exemplo os receptores do tipo TLR, receptor formil peptídeo, receptor de manose, receptor *scavenger*, receptores do tipo NOD, receptores do tipo RIG, receptores de lectina do tipo C e sensores citosólicos de DNA. Os TLRs, presentes na da célula e nos endossomas, são as famílias de receptores de reconhecimento de padrão mais importantes, reconhecendo uma grande variedade de ligantes, incluindo componentes da parede celular bacteriana e ácidos nucleicos microbianos. Os receptores de reconhecimento de padrão citosólicos existem para reconhecer moléculas microbianas. Esses receptores abrangem receptores do tipo RIG (RLRs), que reconhecem RNA viral, sensores de DNA citosólico (CDSs) e receptores do tipo NOD (NLRs), que reconhecem constituintes da parede celular bacteriana e também detectam cristais intracelulares, espécies reativas de oxigênio e vários outros indicadores de infecção ou lesão celular. Quando esses receptores de reconhecimento de padrão associados a célula se ligam aos PAMPs e DAMPs, ativam vias de transdução de sinal que promovem as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células nas quais eles são expressos. Além disso, existem muitas proteínas presentes no sangue e nos fluidos extracelulares que reconhecem PAMPs: proteína C reativa, proteína ligante a manose, proteínas surfactantes SP-A e SP-D, ficolina e várias proteínas do sistema Complemento. Essas moléculas solúveis são responsáveis por facilitar a saída dos microrganismos do sangue e fluidos extracelulares mediante aumento de captação pelos fagócitos ou por ativação de mecanismos extracelulares de morte.

4 - Como os diferentes componentes da imunidade inata funcionam para combater diferentes tipos de microrganismos?

O sistema imune inato fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos. Os mecanismos da imunidade inata existem antes da exposição aos microrganismos. Os componentes celulares do sistema imune inato incluem barreiras epiteliais, leucócitos, neutrófilos, macrófagos, células NK, linfócitos com receptores de antígeno invariáveis e mastócitos. Os receptores de reconhecimento de padrão, incluindo TLRs e RLRs, sinalizam para ativar os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, que estimulam a expressão de genes que codificam muitas moléculas necessárias para as respostas inflamatórias, incluindo citocinas inflamatórias (p. ex., TNF e IL-1), quimiocinas (p. ex., CCL2 e CXCL8) e moléculas de adesão endotelial (p. ex., E-selectina), e os fatores de transcrição IRF3 e IRF7 que estimulam a expressão dos genes antivirais interferon tipo I, que promovendo a produção de interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), que são importantes para as respostas imunes inatas antivirais. Os receptores citosólicos são receptores do tipo NOD, receptores do tipo RIG e sensores citosólicos de DNA. Esses receptores citosólicos, similares aos TLRs, são ligados às vias de transdução de sinal que promovem inflamação ou produção de interferon tipo I. Os receptores do tipo NOD (NLRs) recrutam outras proteínas para formar complexos de sinalização chamados de inflamassomas, que geram formas ativas das citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 que promovem inflamação. Várias citocinas produzidas principalmente pelos macrófagos ativados medeiam a inflamação. TNF e IL-1 ativam células endoteliais, estimulam a produção de quimiocina e aumentam a produção de neutrófilos pela medula óssea. IL-1 e TNF induzem a produção de IL-6, e todas as três citocinas medeiam efeitos sistêmicos, incluindo febre e síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado. IL-12 e IL-18 estimulam a produção da citocina ativadora de macrófago IFN- γ pelas células NK e células T. Neutrófilos e macrófagos fagocitam microrganismos e os matam através da produção de ROS, óxido nítrico e enzimas nos fagolisossomas. Os macrófagos também produzem citocinas que estimulam a inflamação e promovem o remodelamento tecidual nos locais de infecção. As moléculas de reconhecimento de padrão solúveis e efetoras são encontradas no plasma, incluindo as pentraxinas (p. ex., CRP), colectinas (p. ex., MBL) e ficolinas. Essas moléculas se ligam aos ligantes microbianos e aumentam a eliminação por mecanismos dependentes e independentes do Complemento. Nas respostas imunes inatas, o Complemento é ativado principalmente de maneira espontânea nas superfícies da célula microbiana e por lectina ligante de manose para iniciar as vias alternativa e da lectina, respectivamente. Assim, a ativação do Complemento promove o recrutamento de fagócitos para o local de infecção, opsonização e, em alguns casos, promove a morte direta dos microrganismos (por lise). A lectina ligante de manose (MBL), é um receptor de reconhecimento de padrão que se liga a carboidratos, como manose e fucose terminais encontradas em microrganismos, que ativa o Complemento. Além disto, as pentraxinas PC-R, SAP e PTX3 ativam o Complemento por meio de ligação ao C1q e iniciam a via clássica. Os receptores *scavenger* compreendem uma coleção de proteínas da superfície celular, estrutural e funcionalmente diversas, que foram originalmente agrupadas com base na característica comum de mediar a captação de lipoproteínas oxidadas para as células. São expressos nos macrófagos que medeiam a fagocitose de microrganismos. O receptor-1 formil peptídeo expresso em leucócitos, reconhece peptídeos bacterianos contendo resíduos de *N*-formilmetionil e estimula o movimento das células, desta forma atuando como quimiotraentes para leucócitos portadores de atividade fagocítica. Os receptores do tipo RIG (RLRs) são sensores citosólicos do RNA viral que respondem aos ácidos nucleicos virais induzindo a produção de interferons tipo I antivirais. Na ligação do RNA viral, os RLRs iniciam os eventos de sinalização que levam à fosforilação e ativação de IRF3 e IRF7, bem como NF- κ B, e esses fatores de transcrição induzem a produção de interferon tipo I. Os sensores citosólicos de DNA (CDSs) são moléculas que detectam o DNA citosólico e ativam vias



de sinalização que iniciam as respostas antimicrobianas, incluindo produção de interferon tipo I e autofagia. Na imunidade inata, a autofagia é um mecanismo de distribuição de microrganismos citosólicos para o lisossoma, onde eles são mortos pelas enzimas proteolíticas. As superfícies das barreiras epiteliais formam barreiras físicas entre os microrganismos no meio ambiente externo e o tecido do hospedeiro (muco), e as células epiteliais produzem agentes químicos antimicrobianos que impedem a entrada dos microrganismos. As células epiteliais, bem como alguns leucócitos produzem peptídios que têm propriedades antimicrobianas (defensinas e catalecidina). A barreira epitelial contém certos tipos de linfócitos, incluindo linfócitos T intraepiteliais, que reconhecem e respondem aos microrganismos comumente encontrados. Fagócitos- células que têm funções fagocíticas especializadas, principalmente macrófagos e neutrófilos, são a primeira linha de defesa contra microrganismos que rompem as barreiras epiteliais. As células natural killer (NK), as primeiras e mais bem descritas células linfóides inatas (ILCs), que desempenham importantes papéis nas respostas imunes inatas principalmente contra vírus intracelulares e bactérias. As funções efetoras das células NK são matar as células infectadas e produzir IFN- γ , que ativam macrófagos para destruir microrganismos fagocitados. Os mastócitos estão presentes na pele e no epitélio mucoso e secretam rapidamente citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos em resposta às infecções e outros estímulos.

5 - As células possuem múltiplas vias de reparo do DNA, usando diferentes enzimas que atuam em diferentes tipos de lesões. Cite e explique as principais vias de reparo de DNA.

As duas vias diferem na maneira pela qual a lesão é removida do DNA. A primeira via é chamada de reparo por excisão de bases e envolve uma bateria de enzimas denominadas *DNA-glicosilases* que pode catalisar as lesões por remoções hidrolíticas. A etapa chave consiste na projeção do nucleotídeo alterado para fora da hélice.

A segunda via de reparo é chamada de reparo por excisão de nucleotídeos. Ela pode corrigir alterações volumosas na estrutura da dupla-hélice de DNA. Uma vez encontrada a lesão volumosa, a *DNA-helicase* remove o oligonucleotídeo de fita simples contendo a lesão. O intervalo é corrigido pela *DNA-polimerase* e *DNA-ligase*.

6 - Quais são os princípios básicos para que a recombinação ocorra? Em qual outro processo, fundamental para a passagem do código genético, a recombinação é requisitada?

A recombinação homóloga resulta na transferência de informação genética entre dois segmentos de DNA de dupla-hélice com *sequências nucleotídicas semelhantes*. Tal processo é essencial para o reparo correto, livre de erros, de cromossomos danificados em todas as células. A recombinação é fundamental para o entrecruzamento de cromossomos que ocorre na *meiose*.

7 - As células são responsivas a múltiplos estímulos. Elas são capazes de monitorar seu meio interno e externo, processar a informação adquirida e responder de forma adequada e altamente específica. Citocinas são uma classe importante de moléculas sinalizadoras. Nesse contexto, explique a ativação da via de NF κ B mediada por TNF- α .

O ligante TNF- α , se liga à porção extracelular do receptor de TNF- α , e deflagra o rearranjo das caudas citosólicas do receptor, o que recruta inúmeras proteínas sinalizadoras intracelulares, resultando na ativação da proteína-cinase IKK, que fosforila e ativa I κ B, o inibidor citosólico do NF κ B. IKK é um heterotrímero formado por duas subunidades cinase (IKK α e IKK β) e uma subunidade reguladora chamada de NEMO. A IKK β fosforila duas serinas de I κ B, marcando-a para ubiquitinação e degradação proteossomal. Assim, o NF κ B livre transloca para o núcleo onde, em colaboração com proteínas coativadoras, estimula a transcrição de seus genes-alvo.

8 - As moléculas sinalizadoras podem ser de diferentes naturezas. O neurotransmissor acetilcolina, por exemplo, pode atuar promovendo o relaxamento da musculatura lisa da parede de vasos sanguíneos, mediado pelo óxido nítrico. Explique esse mecanismo celular.

Acetilcolina ativa o receptor muscarínico de acetilcolina (GPCR) expresso na superfície da célula endotelial. O receptor ativado, ativa uma proteína G (Gq) que desencadeia a síntese de IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) e a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático. O aumento dos níveis de Ca²⁺ ativa a enzima NO sintase (NOS) que desamina o aminoácido arginina, convertendo-o em óxido nítrico (NO). O NO se difunde rapidamente pela membrana da célula endotelial para a membrana da célula muscular lisa adjacente, onde vai se ligar ao sítio ativo da enzima guanililciclase, estimulando a síntese de GMP cíclico, que leva ao relaxamento muscular e, com isso, a dilatação dos vasos sanguíneos.

9 - O que é o código de histonas? Inclua em sua resposta uma descrição da cromatina e seus papéis na regulação da expressão gênica, incluindo mecanismos e definições.

Na sua forma mais básica a transcrição ocorre a partir de uma região promotora e sequências adicionais (próximas ou não), às que vários tipos de proteínas e complexos se ligam para iniciar a transcrição de forma



adequada em resposta a sinais celulares e-ou extracelulares. Porém, as sequências regulatórias ocorrem no contexto estrutural formado pelo enovelamento do DNA nos nucleossomos (compostos por um tetrameo de H3-H4, dois dímeros de H2A-H2B, e o DNA nele empacotado), e dos próprios nucleossomos sobre si mesmos formando o filamento de 30 nm. Há vários mecanismos para viabilizar a transcrição nesse contexto topológico complexo. Um deles é a formação de estados diferentes de cromatina. Por exemplo, regiões de eucromatina que concentram genes “ativáveis” são menos compactas, e regiões de heterocromatina que são transcricionalmente silenciosas apresentam cromatina altamente condensada (e coincidem em grande parte com telômeros e centrômeros). Há dezenas de tipos de modificações de histonas, sendo os mais estudados a acetilação e a metilação, que em geral tem papéis de ativação e repressão, respectivamente. As caudas das histonas apresentam carga altamente positiva, conferindo alta afinidade ao DNA que tem carga negativa. A acetilação neutraliza as cargas positivas, diminuindo a afinidade pelo DNA e relaxando a estrutura das regiões promotoras, o que facilita a transcrição. Os níveis de transcrição de um gene ou região podem ser correlacionados com os níveis de acetilação das histonas. A metilação, ao contrário, resulta em estruturas mais compactas e inertes. Os padrões de modificações das caudas das histonas conferem informação sobre a organização-composição do transcritoma de uma célula. Dessa forma, o código de histonas se refere às diferentes modificações covalentes que ocorrem nas caudas das histonas e que modulam (positiva- ou negativamente) os níveis de transcrição ao afetarem a estrutura da cromatina próximo a promotores e sequências pertinentes à regulação da transcrição. A ligação de acetiladores pode ser propiciada/recrutada por complexos proteicos (acentuassomos). Uma vez as regiões estão mais abertas por acetiladores (como GCN5), complexos remodeladores de cromatina (como SWI-SNF) podem reposicionar o nucleossomo de forma a liberar a ligação de proteínas essenciais para o início da transcrição, como CBP (coativadora) e TBP (Tata binding protein). As ilhas de CpG são regiões com baixos níveis de metilação de citosina, e comumente coincidem com regiões promotoras. Como a metilação de citosina está correlacionada com cromatina inerte, sua ausência indica uma configuração que facilita, ou que é mais compatível, com a transcrição.

10 - Seu gene favorito (SGF) codifica uma proteína, a SPF, que você suspeita seja um ativador transcricional. SPF tem 4 domínios. Pensando nisso, que experimento você faria para gerar dados que apoiem ou refutem sua suspeita? Para o experimento, você pode achar útil usar:

- o gene da proteína fluorescente verde (GFP) sob controle do promotor X;
- domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X;

Proponha o experimento e discuta como os resultados permitem concluir que SGF codifica ou não um ativador transcricional, incluindo informações sobre mecanismo de ativação da transcrição.



Os ativadores transcricionais apresentam domínios de ativação que trazem para o promotor uma série de proteínas que permitem o início da transcrição. O domínio de ativação dos ativadores pode recrutar para o promotor a TBP, permitindo a interação com o complexo TFIID e RNA polimerase II. A ação do domínio de ativação também pode ocorrer mediante interação com um complexo mediador, que interage com a RNA polimerase II e a recruta ao promotor. Os ativadores transcricionais comumente apresentam organização modular: cada domínio pode exercer sua função de forma independente dos demais. Assim, se um dos domínios da SPF é um domínio de ativação, a fusão deste com um domínio de ligação a DNA que liga ao promotor X gerará uma fusão que ativa o gene *gfp* e resulta em acumulação de GFP, que será proporcional aos níveis de transcrição. Dessa forma, a detecção de GFP será um indicador que SPF é um ativador transcricional. O experimento para testar a hipótese envolve a construção de pelo menos 4 híbridos (ver abaixo) e verificação dos níveis de GFP que acumulam. Se a proteína for ativadora da transcrição, a fusão 5 resultará em acumulação de GFP. Além dessa, se o domínio de ativação for o domínio 1, a



PPGBMC

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR



fusão com ele também resultará na acumulação de GFP. Seria esperado que as fusões 2, 3 e 4 não resultassem em acumulação de GFP.

Fusão 1. DLDAPX (domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X) **com o domínio 1**

Fusão 2. DLDAPX (domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X) **com o domínio 2**

Fusão 3. DLDAPX (domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X) **com o domínio 3**

Fusão 4. DLDAPX (domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X) **com o domínio 4**

Fusão 5. DLDAPX (domínio de ligação a DNA de ativador do promotor X) **com a proteína SPF**