

Clonagem de um gene: replicação do gene 100% num outro organismo

A porção de DNA presente nos organelos (mitocôndrias e cloroplastos) é muito inferior ao tamanho do genoma do organismo

Genoma dos seres vivos

- **Património genético principal - cromossomal:** hereditário

- **Património genético extra-cromossomal:** não segue as regras da hereditariedade

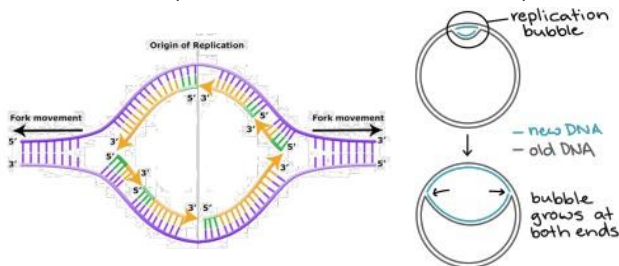
- **Lineares:** contem 1 gene que codifica 1 proteína (ex.: variação de cor do milho na mesma espiga)

- **Circulares:** plasmídeos,...

PATRIMÓNIO GENÉTICO EXTRA-CROMOSSOMAL

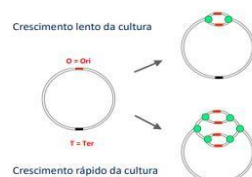
- **Lineares:** 1 centrómero, 2 telómeros e várias origens de replicação; contêm grandes partes de junk DNA

- **Circulares** (cccDNA – *Covalently Closed Circular DNA*): genoma principal dos procariontes, 1 centrómero, 1 única origem de replicação, sem junkDNA, tridimensional (tensões mecânicas da molécula)



Em **células eucariontes** a replicação é muito rápida devido às muitas origens de replicação de DNA.

Nos **procariontes** (cccDNA) só existe uma origem de replicação. Se ocorrer a replicação de uma molécula com uma bolha de replicação, a cultura vai crescer lentamente. Se, dentro de uma bolha, haver várias bolhas, a cultura cresce rapidamente.



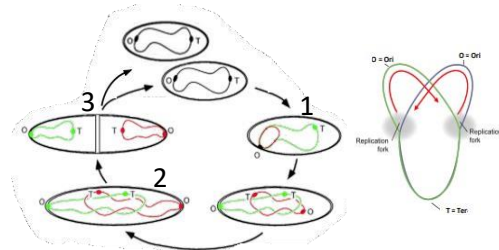
Replicação de cccDNA

1. O cromossoma liga-se à membrana da

célula através de um complexo proteico adaptador

2. Ligação da 2ª cadeia de DNA à membrana da célula através de um complexo proteico adaptador idêntico

3. Separação entre a membrana das células “filhas” da mitose e as duas cadeias de DNA por desagregação do complexo proteico



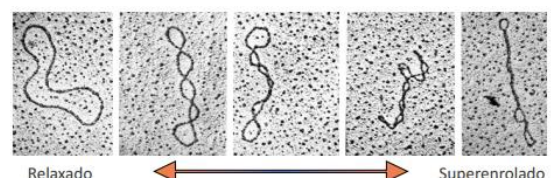
ESTRUTURA DO CROMOSSOMA BACTERIANO

O estado relaxado ou enrolado da molécula é regulado pelas **topoisomerases**, enzimas catalisadoras da alteração da topologia dos cromossomas

- **Underwinded – superenrolado negativamente:** conformação que resulta do estado de energia mínimo. Este enrolamento é crítico para a transcrição e a produção de proteínas e para a replicação. Menor energia mecânica

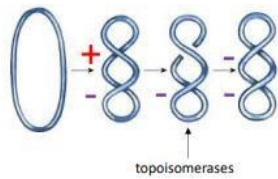
- **Overwinded – superenrolamento positivo:** compactação maior da molécula de DNA. Verifica-se quando a molécula de DNA dobra sobre si mesma

A molécula de DNA prevê as **tensões** acumuladas no Término, por isso, de forma a manter a sua integridade, em **T**, esta **enrola-se sobre si mesma**. Quanto maior a bolha de replicação então maior é a força de torção.



1. A molécula de DNA dobra sobre si mesma
2. A topoisomerase corta o DNA nesse local

3. A enzima volta a unir o DNA pelo outro lado. Este passa a estar enrolado de forma **irreversível** (espontaneamente). Obtém-se assim o enrolamento negativo (no sentido contrário ao enrolamento da hélice de DNA).



O desenrolamento do DNA pode ser feito por nós

desfeitos por topoisomerase, ou pelo relaxamento favorável termodinamicamente.

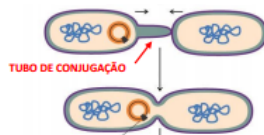


PLASMÍDEOS

Contêm genes específicos que conferem vantagem evolutiva (resistência aos antibióticos, genes necessários para a transferência horizontal de genes).

O 1º elemento genético extra-cromossomal conhecido foi o Fator F, que promove a produção de uma proteína que confere **fenótipo diferente** à bactéria.

A replicação destes elementos é independente do restante organismo - **transmissão genética horizontal**, onde ocorre a transmissão deste elemento, através do tubo de conjugação formado entre uma célula dadora (F+) e uma célula



recetora (F-) Num **biofilme** há células vivas, mortas (servem para alimentar as restantes) e danificadas (muito permeáveis, permitindo a entrada de qualquer coisa, inclusive plasmídeos)

TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A. A célula passa a ser cancerígena

B. Transformação com DNA heterólogo (não lhe pertence)

1. Antes de iniciar o processo, prepara-se as células competentes.

1. Rompimento da parede celular através de choques térmicos, introdução de substâncias químicas, ...

2. Inserção de plasmídeos heterólogos

3. Colocação das bactérias num meio rico para que as células recuperem a membrana/parede

4. Multiplificação das células com o novo plasmídeo

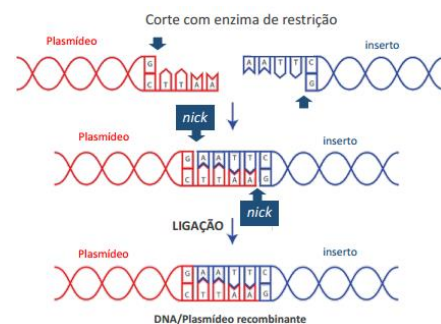
5. Plaqueamento em meio seletivo que contém características que só permitem a sobrevivência de bactérias que expressem os genes do plasmídeo inserido

TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

1. As enzimas/ endonucleases de restrição, cortam as sequências polinucleotídicas em locais específicos. Obtemos o inserto – parte do DNA que pretendemos clonar. Com a mesma enzima de restrição, abrimos o plasmídeo, que funciona como um vetor.

Políndromas: local do DNA que é lido da mesma forma de um lado para o outro. Utilizamos enzimas de restrição diferentes em cada extremidade e só assim é que o inserto será corretamente inserido no plasmídeo, e não “ao contrário”, permitindo a sua correta transcrição.

2. A **ligase repara os nicks**, unindo o plasmídeo ao inserto. É possível que nem todos os plasmídeos incorporem o inserto.



Polylinker: sequência, que contém vários pontos de clivagem por enzimas, construída artificialmente e inserida num local estratégico do plasmídeo para que seja um local de abertura fácil.

2. Inserção do plasmídeo na célula recetora: transformação. Seleção dos clones que contém o plasmídeo com o inserto, através de replicação. Se inserirmos o inserto num local onde estava um gene de resistência a um antibiótico X, podemos seleccionar as células através da falta de resistência ao antibiótico X – **replica plating**.

VISUALIZAÇÃO DO DNA - ELETROFORESE

1. Preparação do gel de agarose com fossos.
2. Colocação do gel na tina de eletroforese e cobrir com solução tampão
3. Colocar a escada de DNA num fosso e as amostras nos restantes
4. Fechar a tina e aplicar voltagem durante um certo período de tempo. O DNA percorrerá o gel em direção ao polo positivo.

Os fragmentos mais leves migram mais rapidamente

- A migração dos fragmentos de **DNA linear** é **linear**.
- A migração dos fragmentos de **DNA circular (cccDNA)** **não é linear**: pode migrar linearmente se a molécula for linearizada, no entanto, se tal não suceder a sua forma relaxada ou enrolada vai influenciar a velocidade a que esta migra no gel.

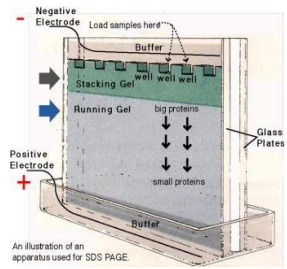
Quando a molécula está **superenrolada** migra muito mais **rapidamente** do que se estiver relaxada ou linearizada.



Agentes intercalantes: intercalam-se entre os pares de base alterando a sua mobilidade. A sua utilização desfaz os enrolamentos do cccDNA colocando a molécula num estado relaxado, tornando o seu **peso molecular mais fidedigno**. A utilização destes agentes deve, no entanto, ser cuidadosa pois quantidades exageradas podem ter resultados opostos aos pretendidos.

VISUALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS - SDS-PAGE

Método de eletroforese que separa as proteínas por massas moleculares. A utilização do detergente aniónico **Dodecil sulfato de sódio (SDS)** permite



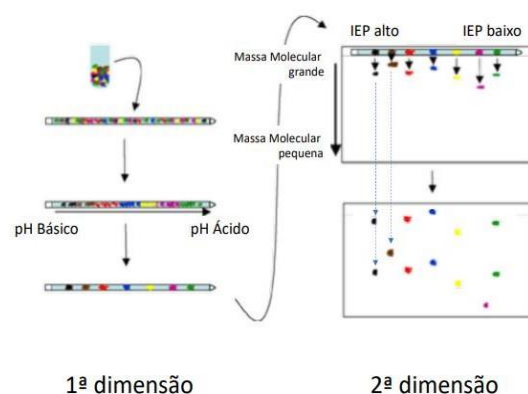
linearizar as proteínas e inserir carga negativa, eliminando a influência da carga na migração, fazendo com que dependa apenas dos seus tamanhos. Por vezes é utilizado outro agente desnaturante: mercaptoetanol.

É utilizado **gel de poliacrilamida (hidrogel)**, muito mais fino do que o gel de agarose.

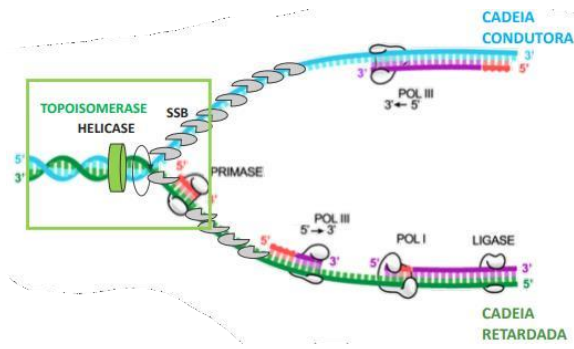
- O *stacking gel*, mais concentrado, encontra-se em cima do *running gel*, menos concentrado. A única conexão entre as câmaras onde está o tampão é através do gel - permite que o gradiente de voltagem seja preciso e reproduzível. O tampão é essencial para manter a hidratação do gel, que por ser muito fino seca facilmente.
- O gel, muito fino, precisa de arrefecimento, o que é favorecido pela posição vertical (muitas vezes correm-se estes geis em ambiente refrigerado). É colocada solução tampão nas duas câmaras próximas do gel. As amostras são colocadas nos poços e, quando é aplicada a voltagem, migram na vertical.

ELETROFORESE DE PROTEÍNAS 2D

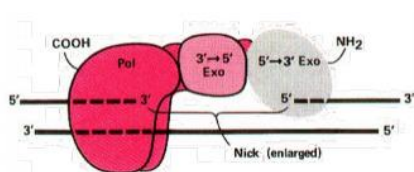
Separação por Ponto Isoelétrico (IEP) - a separação é feita de acordo com o seu pH: as proteínas migram até atingirem o ponto isoelétrico, o seja, até ficarem neutralizadas.



Replicação de DNA



- **Primers de RNA (10-30pb):** sintetizados pela primase que é movida pelo *clamp*, têm orientação 5' - 3'
- **Replissoma:** conjunto de proteínas envolvidas na replicação
- **Primase:** Polimerase de RNA que usa DNA como molde, sintetiza primers
- **Topoisomerase - helicase:** desenrolam o DNA
- **Ligase:** Liga covalentemente terminais 3' e 5'
- **SSB:** protege o ssDNA em cadeia simples, mantendo-o dessa forma
- **DNA POL I:** Polimerase de DNA que usa DNA como molde, atividade exonucleotídica (arranca os primers de RNA e substitui-os por DNA). Reconhece a lesão, recua tirando nucleótidos e avança repondo-os, permanentemente (a ligase fecha a cadeia). Atua como reparadora de *nicks* de DNA quando a célula não está em reprodução. Durante a replicação constrói os fragmentos de Okazaki.



- **DNA POL III:** Polimerase de DNA que usa DNA como molde, indutiva (expressa só quando começa a replicação)

PCR – POLYMERASE CHAIN REACTION

Usa a replicação de DNA para ampliar uma amostra.

1. Desnaturalização: o aumento da temperatura separa as cadeias de DNA

2. Anelamento: diminuição da temperatura para permitir a formação dos primers (DNA ou RNA). Não se pode diminuir muito a temperatura para que as cadeias de DNA não se voltem a juntar, para isso usam-se extremófilos para extrair enzimas.

Um primer é adicionado à mistura de amplificação em cadeia dupla.

Forwards primer: começa no codão Start (ATG) e continua a sequência restante

5' - TAC(15-25pb complementar a sense) – 3'

5' - XXXXXXXXX (restriction site) TAC (15-25pb complementar a sense) - 3'

Reverse primer: inicia com o codão Stop (TGA) e continua com a sequência anterior a esse

3' - (15-25pb complementar a antisense) TGA - 5'

5' - POTS(15-25pb complementar a antisense) - 3' (primers devem ser sempre escritos de 5' para 3')

3' - (15-25pb complementar a antisense) TGA (restriction site) XXXXXXXXX - 5'

3. Extensão: eleva-se a temperatura da reação para que a *Taq polimerase* sintetize novas cadeias de DNA, a partir dos primers.

4. Amplificação exponencial: repete-se o ciclo várias vezes.

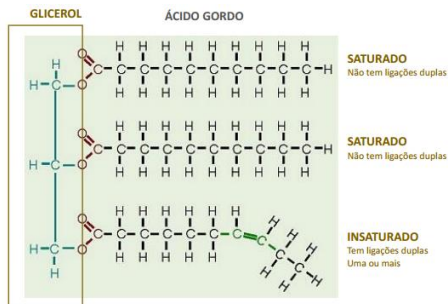
LÍPIDOS

- **Ácidos gordos:** saturados/ insaturados
- **Glicéridos:** neutros/ fosfoglicéridos
- **Não-glicéridos:** ceras/ esteróides/ esfingolípidos

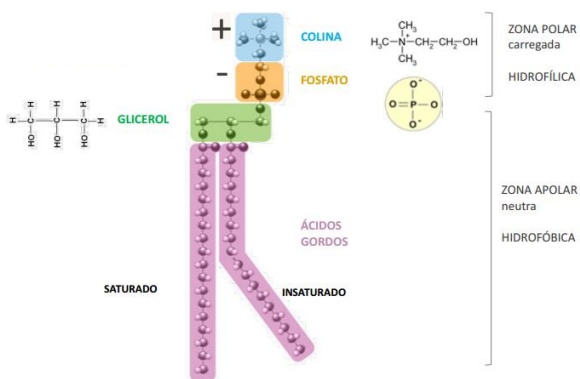
(esfingomielinas/ glicolípidos)

- **Glicéridos:** neutros/ fosfoglicéridos
- **Lípidos complexos:** lipoproteínas

GLICÉRIDOS



FOSFOLÍPIDOS



ESTERÓIDES

- Estrogénios (estradiol), Androgénios (testosterona), Progestinas (progesterona), Glucocorticóides (Cortisol), Mineralocorticóides (Aldosterona)

Coolesterol: o grupo -OH dá à molécula carácter anfipático que permite a incorporação das membranas celulares. Serve de precursor da síntese dos ácidos biliares e de outros esteróides. É transportado na corrente sanguínea associado a lipoproteínas, triglicéridos e fosfolípidos. É necessário para construir e manter as membranas celulares – regula a fluidez em diversas gamas de temperatura.

Esfingomielina: contém um grupo amina que lhe confere características muito diferentes dos outros fosfolípidos.

Ceramida/cera: esfingosina é uma das semelhanças com os fosfolípidos.

Todos os fosfolípidos diferem nos ácidos gordos. Tudo o que entra e sai de uma célula é regulado por um canal, uma proteína.

Aumento da temperatura - maior mobilidade/fluidez da membrana – passagem de substâncias que de outro modo não passariam

MEMBRANAS CELULARES

Modelo do mosaico fluido

Todas as membranas têm este tipo de organização:

- Bi-camada fosfolipídica
- Proteínas imersas (intrínsecas), ancoradas ou associadas à camada lípida (extrínsecas)
- Rafts de lípidos diversos, em número e tamanho variáveis, onde se acumulam imensas proteínas

Mesmo apresentando a mesma estrutura, quimicamente, as membranas são todas diferentes, por exemplo no número ou no tipo de fosfolípidos que a constituem, ou nas proteínas e a sua localização.

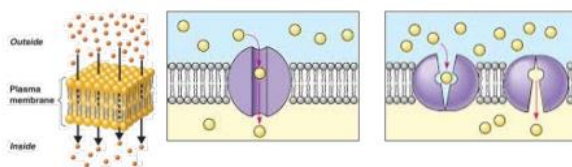
MICRODOMÍNIOS MEMBRANARES – RAFTS

Consistem em pequenos agrupamentos (10-200nm) especializados de colesterol, esfingolípido, ceramidas, glicolípido e proteínas que têm as seguintes características:

- Heterogéneos e muito dinâmicos (agrupam-se e repartem-se com muita agilidade)
- Compartimentalizam processos celulares, nomeadamente de transporte e sinalização.
- Centros de organização para moléculas sinalizadoras e interferem no tráfego de proteínas.
- Influenciam a fluidez da membrana, porque são domínios mais ordenados e empacotados que o resto da membrana que “flutuam” livremente, agregando e desagregando fosfolípidos

- Apesar de serem mais comuns na membrana plasmática, também podem ocorrer nas membranas do Golgi e dos lisossomos
- Células vegetais não possuem Rafts. Quanto mais unicelular, maior é a necessidade de controle da entrada e saída de substâncias, o que se traduz numa maior necessidade de Rafts
- Proteínas são ligadas aos Rafts através de âncoras-GPI (*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*). Algumas proteínas não estão nos Rafts, estão ancoradas a eles. Cada raft tem várias ancoras, logo têm imensas proteínas
- Radicais da parte externa da membrana interagem com o citoesqueleto

PROTEÍNAS DA MEMBRANA



A. Transportadores: são sempre específicos

1. Passagem livre: dependente da permeabilidade da membrana - lipossolubilidade. A substância vai passar de um lado para o outro até estabelecer concentrações semelhantes dos dois lados.

2. Passagem através de poros proteicos: canais seletivos criados por proteínas para moléculas com determinadas características (ex. moléculas polares ou carregadas, água ou glicerol)

B. Canais: criam passagens seletivas para moléculas com determinadas características (ex. moléculas polares ou carregadas, água ou glicerol), buracos proteicos. Canal - 1 proteína, poro - várias

1. Porina: proteína intrínseca à membrana. Uma substância não lipossolúvel tem compatibilidade com a proteína. Regula a entrada e a saída de substâncias, tendo como objetivo dois meios com a

mesma concentração.

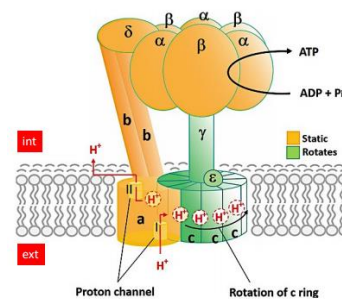
C. Bombas: criam gradientes eletroquímicos através da membrana à custa da hidrólise de ATP, permitem o trabalho de outras proteínas, não deixam passar nada

1. ATP Sintetase: síntese de ATP

Presente na membrana interna da mitocôndria.

Constituída por 2 partes:

1. Parte que permite que a estrutura fique fixa
2. Parte giratória, que roda à medida que recebe prótons (H^+), recebendo energia e permite a síntese de ATP



Força proto-motriz (p.m.f.): soma entre a diferença de concentração do ião (ΔpH) e o potencial elétrico gerado por essa diferença de concentração ($\Delta \Psi$).

Corresponde a armazenamento de energia na forma de potencial transmembranar.

Produção de ATP: existe uma maior concentração de prótons num dos meios celulares, por isso, na tentativa de estabelecer neutralidade química, eles vão migrar entre os meios. Isto vai gerar o potencial elétrico, que corresponde ao armazenamento de energia na forma de potencial transmembranar. O gradiente alimenta as ATPsintetases e promove a produção de ATP. É utilizada a força proto-motriz. Este processo está relacionado com a glicólise, TCA (Ciclo de Krebs) e à cadeia respiratória mitocondrial e fotossíntese.

2. ATP Ase: hidrólise de ATP

Estrutura semelhante à da ATPsintetase.

Presente nas membranas plasmática de bactérias e leveduras, interna das mitocôndrias, dos tilacóides dos cloroplastos, dos vacúolos

Consumo de ATP: cria o gradiente eletroquímico que o outro motor compensa. Se não existir este gradiente, não haverá produção de ATP e, conseqüentemente, a célula colapsará.

O ATP é utilizado em:

- Síntese de ácidos nucleicos, prótidos e lípidos
- Metabolismo de carboidratos
- Mobilidade
- Transporte transmembranar de H^+ (criação de gradientes iônicos; força proto-motriz)

ATP sintetase	ATP ase
Dentro da mitocôndria	Fora de mitocôndria
Produce ATP	Gera o gradiente
Consome gradiente	
Mais rápida - mais ATP do que é consumido	

D. Sensores: detetam estímulos, como a presença de uma molécula ou alterações físicas (temperatura, força mecânica, a_w), ou químicas (pH, salinidade).

Tudo o que se aproxima da célula é um sinal, um aviso, e causa uma reação de adaptação.

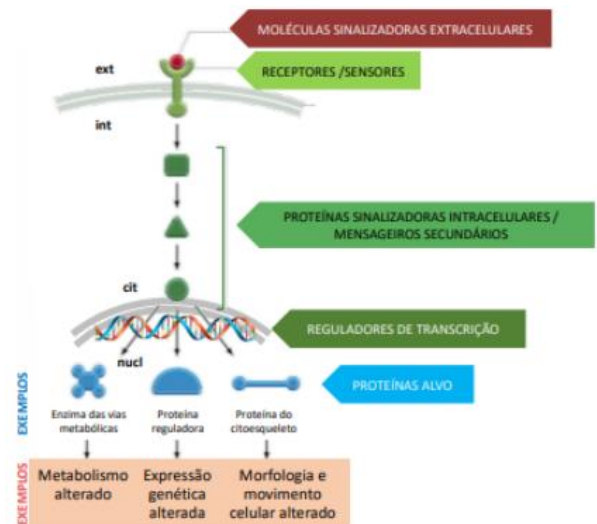
1. Moléculas sinalizadoras extracelulares: prótidos, nucleótidos, hormonas, lípidos, açúcares

2. Recetores/ Sensores: proteínas que têm domínios extra e intracelulares. O intracelular interage com outras proteínas do meio intracelular e/ou com o GTP.

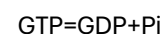
- **Associados a canais iônicos:** canais mecanosensitivos (sensível à energia mecânica, ex.: osmolaridade) e alguns elétricos. Sinalização rápida

entre células eletricamente excitáveis.

Predominam canais de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} que variam com a influência do citoesqueleto. Se o citoplasma estiver contraído, o canal fecha, se o citoplasma estiver estendido, o canal abre.



- **Associados a proteínas G:** interação sensor-proteína alvo é mediada pela proteína G - proteína trimérica composta pelas subunidades β , γ e α . A **subunidade α** tem afinidade para se ligar ao GTP e GDP. O **dímero $\beta\gamma$** tem as funções de agregar a subunidade α , impedir a libertação espontânea do GDP, e sinalizar outras proteínas quando dissociado.



Quando um ligando se liga a uma **proteína G inativa**, o sinal provoca uma alteração de conformação da parte intracelular deste, que atua como uma enzima GEF, promovendo a libertação do GDP e a sua substituição por um GTP, ativando a proteína. Assim, vai se verificar a separação do dímero $\beta\gamma$ da subunidade α , que carrega GTP. Estas duas subunidades vão ligar-se a outras proteínas, promovendo a ativação destas na produção de segundo mensageiros.

Quando um ligando se liga a uma **proteína G ativa**, a proteína GAP vai hidrolisar o GTP, promovendo a sua

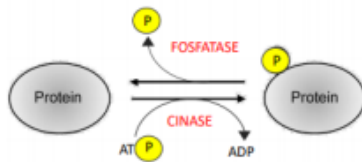
libertação e substituição por um GDP, que inativa a proteína G e inibe a via de sinalização.

GEF - agonista: ativa a sinalização (como o ligando)

GAP – antagonista: impede a sinalização

• **Associados a enzimas:** estes recetores funcionam diretamente como enzimas ou estão associados a enzimas, ativadas por eles, capazes de catalisar uma enzima – **cinase** - que transfere grupos fosfato de um dador como o ATP para aminoácidos específicos (uma tirosina cinase, por exemplo, adiciona grupos fosfato aos resíduos de tirosina)

As **fosfatases** fazem o contrário, retirando o grupo fosfato.



As cinases têm a seguinte constituição:

- Domínio de ligação ao ligando, localizado no grupo N
- Domínio transmembranar (alfa hélice) - estabiliza a proteína
- Domínio de tirosina cinase – intracelular, com atividade enzimática

Transmissão de sinal intracelular em resposta a fatores de crescimento

1. Dimerização/ Crosslink: 2 recetores recebem 2 ligandos, que povocam a sua união

2. Auto-fosforilação: autofosforilação do recetor dimerizado, fosforilações múltiplas

3. Fosforilação do recetor intracelular - downstream: transformar a ativação num sinal até ao núcleo, ou seja, este sinal é o transporte dos grupos de fosfatos até ao núcleo (por *chaperones*), ou seja, de cinase em cinase vai ser passado até ao núcleo, passando de umas para as outras através de cinases e fosfatases – **cascata de fosforilação** – e, quando o sinal chega ao núcleo, tem uma influência direta na

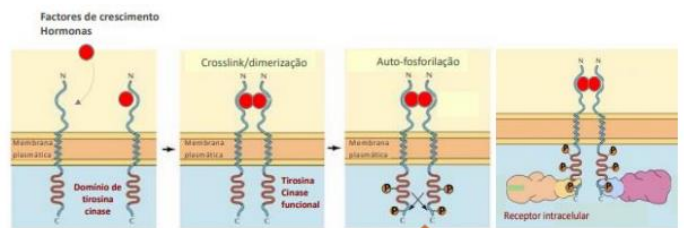
transcrição.

De acordo com o sinal exterior é ativada uma cascata específica.

3. Proteínas sinalizadoras intracelulares/ Mensageiros secundários

• **Mensageiros secundários:** funcionam como amplificadores de sinal. **EXEMPLO:** O **IP3** estimula a libertação de **Ca²⁺** para o citoplasma, que aumenta a produção de **DAG** no C. Golgi, que ativa a PKC, que controla a síntese dos componentes da parede celular.

• **Transdução de sinal:** cascatas de cinases/ fosfatases



4. Reguladores de transcrição - núcleo: importinas, exportinas, fatores da transcrição, ativadores (enhancers), inibidores

Ativam a transcrição de genes em condições particulares e pouco comuns.

EFEITOS BIOLÓGICOS DA RECEÇÃO DE SINAIS

- Síntese de macromoléculas (compostos orgânicos)
- Transporte vesicular
- Síntese de componentes do citoesqueleto
- Consumo de metabolitos: azoto e carbono

TRANSCRIÇÃO

- Polimerase de RNA depende do DNA
- No DNA dos eucariontes os genes encontram-se fragmentados (com intrões e exões)
- DNA transcrito para hmRNA
- Após o processamento (remoção de intrões) é obtido o mRNA que codificará o gene pretendido após a tradução

- Processamento ou SPLICING – processo complexo que envolve proteínas e RNA, torce o hmRNA e são retirados os intrões

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES

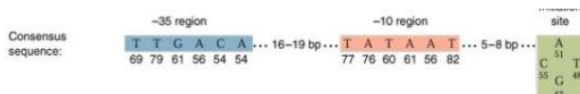
1. Genes constitutivos (House-keeping): são expressos constantemente sob condições normais de crescimento, que garantem a manutenção da célula

2. Genes ativados pelo stress: genes ativados quando a célula recebe algum tipo de estímulo

ZONAS COMUNS AOS GENES

Para que os genes sejam transcritos eles contêm certas sequências de nucleótidos que vão ser reconhecidos pelos fatores de transcrição.

Diferentes fatores de transcrição reconhecem diferentes zonas.



Região - 35: consensual apenas em genes bacterianos.

Tata box (Região -10): zona de consenso universal, todos os genes têm, a -10 nucleótidos do codão de iniciação. É através desta zona que se estabelece a ligação entre a RNA polimerase

METABOLISMO

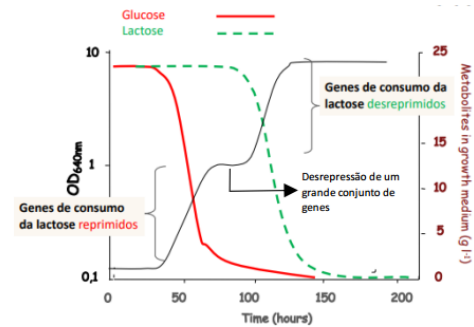
A. Catabolismo: reações metabólicas em que a célula hidrolisa polímeros, libertando energia química

B. Anabolismo: reações metabólicas que leva à síntese de polímeros, consumindo energia

EXPERIÊNCIA

Regulação da transcrição na E. Coli

- Na cultura de batch foi colocada glucose (monómero) e lactose (galactose + glucose). Observa-se uma curva de **crescimento diáuxico** – duas fases de crescimento



O **operon lac** da *E. coli* contém genes envolvidos no metabolismo da lactose; é expresso somente quando a lactose está presente e a glicose ausente.

Se a glicose estiver presente, as bactérias vão escolher digeri-la ao invés da lactose, uma vez que é uma molécula que requer menos etapas e menos energia para ser quebrada. No entanto, se a lactose for o único açúcar disponível, as *E. coli* utilizam-na.

O **repressor lac** e a **proteína ativadora de catabólito (CAP)** estão responsáveis pelo controlo da atividade do operon lac.

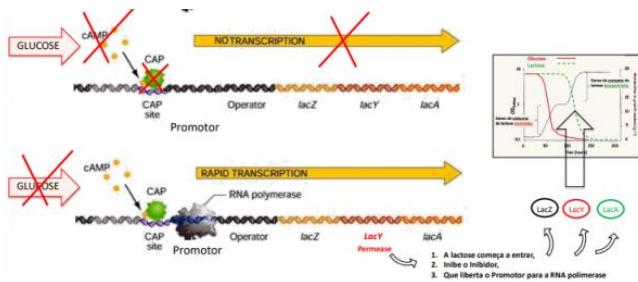
- O **repressor lac**, um gene constitutivo, reprime a transcrição do operon, até detetar a presença de lactose na célula, indiretamente, através do isómero alolactose.
- A **proteína ativadora de catabólito (CAP)** ativa a transcrição do operon, dependendo dos níveis de glicose, que deteta através da molécula "com fome de sinalizar" AMPc (AMP cíclico).

O **cAMP (AMPcíclico)** é sintetizado pela Adenilato Ciclase (AC) usando o ATP como substrato.

maior [glucose] → maior [ATP] → menor [cAMP]

Na presença de glucose, a cAMP não se liga à CAP que fica inativa. Assim não se liga ao promotor Lac e não há transcrição do gene.

Na falta de glicose, cAMP liga-se à CAP, ativando-a, e liga-se ao promotor Lac que permite a transcrição do gene.

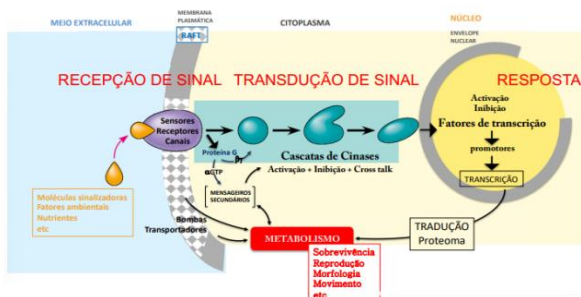


APLICAÇÃO DA EXPERIÊNCIA ANTERIOR

Clonagem

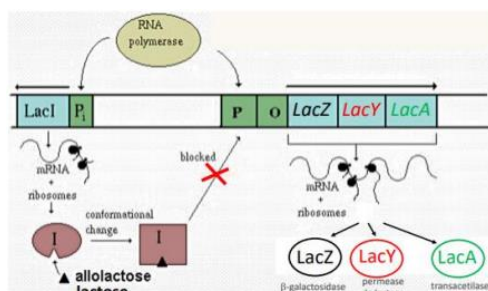
O operon lac contém três genes: **lacZ**, **lacY** e **lacA**. Esses genes são transcritos como um único mRNA, sob o controle de um promotor.

O **lacZ** codifica uma enzima – galactosidase - que quebra a lactose em monossacarídeos e confere cor azul às células, porque tem, na sua constituição molecular, corante azul.



O **lacY** codifica um transportador de membrana que ajuda a trazer a lactose para dentro da célula.

O **lacA** codifica uma enzima conhecida como transacetilase que liga um grupo químico em particular a moléculas-alvo. Não se sabe se está envolvido na hidrólise da lactose.



Na **transcrição do gene lacZ**, na presença de lactose, as células terão cor azul quando esta estiver a ser utilizada. Isto permite que, ao fazer um inserto do DNA na parte do gene lacZ, seja possível identificar as células que incorporaram o mesmo pois não irão apresentar a cor azul na presença da lactose:

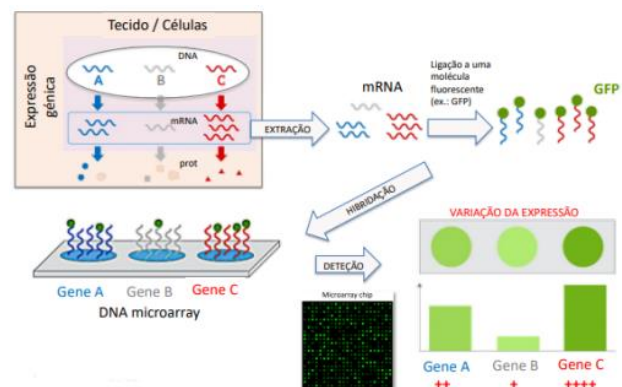
lacZ interrompido → Não há β-galactosidase → X Gal não é degradado → Não se forma corante azul → Colônias recombinantes são brancas e colônias com o plasmídeo intacto, sem inserto, são azuis

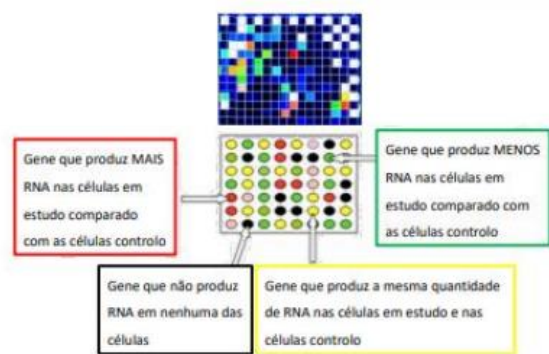
Contudo, se a **clonagem for feita mesmo no início do lacZ** poderá formar-se uma proteína híbrida que contém a β-galactosidase. Nesse caso, as colônias azuis na presença de IPTG + XGal podem conter o inserto ou não. É preciso mais outra forma de identificação da presença do inserto.

ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES

Transcriptômica: chip-microarray

Num chip-microarray está presente 100% do DNA de um tipo de células fragmentado, disponível para ser desnaturado e hibridado com moléculas de DNA ou RNA que lhe sejam complementares. Cada *spot* corresponde a uma hibridação efetiva entre um pedaço de DNA e um mRNA marcado com fluorescência. A intensidade da fluorescência deteta diretamente o grau de expressão, ou seja, a quantidade de um mesmo mRNA.





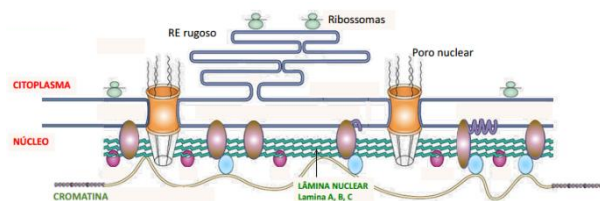
Outros processos: proteômica, interactómica, fenómica, metabolómica,

CONTINUIDADE NÚCLEO-RETÍCULO

Nucléolo: agrupado de tRNA, rRNA, proteínas e ribossomas

Lâmina nuclear – endoesqueleto do núcleo: consiste numa grande fibra proteica formada por filamentos intermediários compostos por 3 proteínas - laminas A, B e C - situadas na periferia do nucleoplasma. Está organizada de forma repetitiva, ou seja, há uma grande fibra orientada de C (grupo carboxilo) para N (grupo amina) paralela a uma orientada de N para C.

- Confere ao envelope nuclear estabilidade mecânica
- Organiza a cromatina (organização tridimensional do núcleo interfásico)
- Liga os poros nucleares
- Liga muitas proteínas e fatores de transcrição

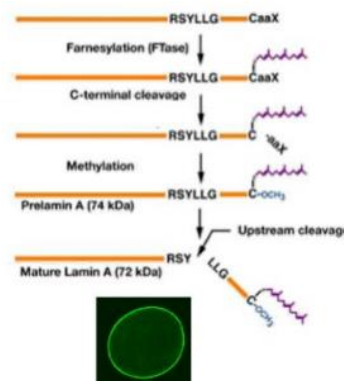


Processamento normal da pré-lamina:

1. O gene LMNA codifica a pré-lamina A e as proteínas reconhecem parte dela.
2. A pré-lamina A é farnesilada - adição de um ácido gordo a uma Cistamina

3. O terminal C é clivado e o restante terminal é metilado

4. Há uma nova clivagem na zona reconhecida em 1. que elimina a farnesilação. E a lamina A encontra-se na sua forma normal.

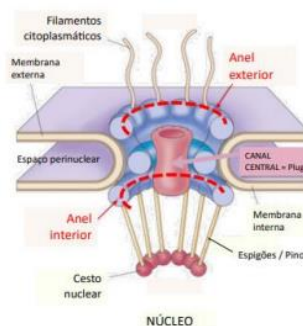


Processamento da pré-lamina numa célula com progeria:

1. Deleção de 50 aa no gene LMNA codifica a pré-lamina A
2. Pré-lamina A contém um grupo farnesil
3. O terminal C é clivado
4. O grupo farnesil continua ligado à pré-lamina A, o que resulta numa forma anormal de pré-lamina A – progerina. Progerina ancora à lâmina nuclear e o núcleo ganha forma e resistência anormais

Poros nuclear

- **Espigões:** juntamente com o plug constituem um local de grande seletividade
- **Canal central – plug:** passagem de moléculas de e para o núcleo



Para as moléculas circularem nos poros nucleares têm de estar ligadas a **chaperones**:

- **Importinas:** do citoplasma para o núcleo
- **Exportinas:** do núcleo para o citoplasma

Envelope nuclear: membrana dupla que envolve o núcleo. O espaço entre as duas denomina-se **espaço perinuclear** e consiste numa cisterna contínua entre o interior das membranas nucleares e o interior do RE.

O envelope nuclear está repleto de proteínas:

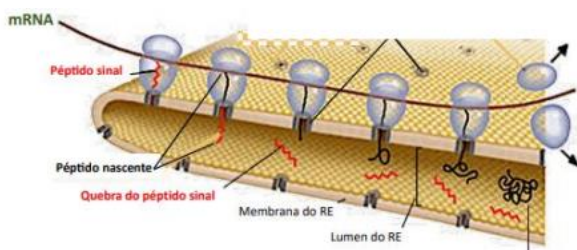
- No exterior: poros nucleares (proteína α NPC)
- No interior – proteínas organizadas em fibras que formam a lâmina nuclear (proteína α Lamin B); cromatina (DAPI)

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

A quantidade de RER e REL depende da atividade metabólica. Estes organelos variam com o tipo de células e são responsáveis pela síntese de proteínas e lípidos.

O espaço no interior das cisternas do RER e do REL – **lumen** – é contínuo em relação ao espaço perinuclear, mas é descontínuo em relação ao citoplasma. A membrana dupla perlonga-se de poros nucleares e forma cisternas, o RER.

As cisternas membranares mantêm a sua forma global através do citoesqueleto.



Translocação: poro proteico onde se ligam os ribossomos e por onde passam os péptidos nascentes, em tradução, para dentro das cisternas do RE

À membrana do RER estão ligados **ribossomas**, responsáveis pela síntese proteica, com o local de saída das proteínas que polimerizam ligado aos poros do RER. Assim, as proteínas sintetizadas encontram-se nas cisternas do RER, que por sua vez estabelece uma continuação para o REL. Isto permite a migração das proteínas para o organelo.

Quando as cisternas do REL estão cheias formam-se bolas na extremidade da cisterna que se vão dividir do REL e formar vesículas que migram para o complexo de

Golgi e se fundem com o mesmo. É só no complexo de Golgi que ocorre a maturação das proteínas que adquirem a sua tridimensionalidade e se tornam funcionais.

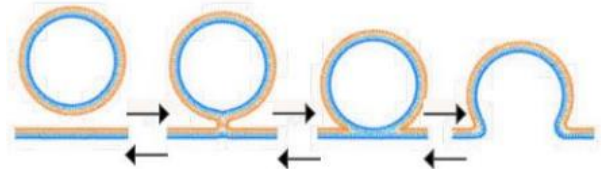
Para levar as proteínas maturadas ao seu destino vai acontecer, no complexo de Golgi, o mesmo que aconteceu no REL.

Lisossoma: destrói as macromoléculas em elementos básicos. Nas células sem lisossomas esta função é desempenhada por vacúolos.

COMPLEXO DE GOLGI

Sistema de endomembranas celulares responsáveis pelo armazenamento, processamento e distribuição de proteínas. Cada pilha de cisternas (6-20 ou 60 em protistas) é chamada **dictiossoma**, especialmente em células vegetais – 40-100 pilhas/ célula.

- Vesículas de exocitose/ secreção



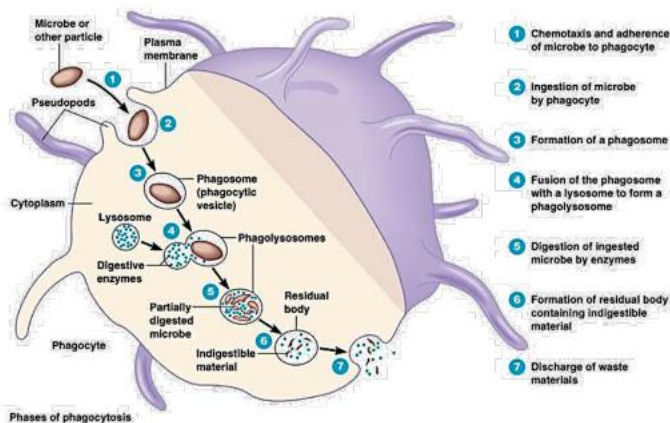
- Vesículas lisossomais

ENDOCITOSE / EXOCITOSE

Endossomas: organelos localizados entre o Complexo de Golgi e a membrana, responsáveis pelo transporte de partículas e macromoléculas até ao lisossoma para a degradação, pela reparação da membrana e pela sinalização metabólica. São responsáveis pela homeostase celular

1. Pinocitose: vesículas de pequenas dimensões. A célula ingere moléculas solúveis.

2. Fagocitose: vesículas de maiores dimensões. A célulaingere agregados insolúveis



3. Endocitose mediada: ligação de uma substância a um recetor específico da membrana, permitindo a fusão das membranas.

Constitui um mecanismo dos vírus que estão envolvidos em vesículas membranares da célula que tinham infectado previamente.

AUTOFAGIA: a célula elimina organitos envelhecidos utilizando um mecanismo que inclui a formação de vesículas com o auxílio do REL. O organito obsoleto é envolvido numa membrana derivada de REL formando-se o autofagossoma/ autolisossoma. Quando um lisossoma se liga este ocorre a digestão do organito e reciclagem dos monómeros obtidos no processo.

CITOESQUELETO

- **Microfilamentos finos (<3nm):** polímeros de F-Actina ligados a tropomiosina, troponina e feices de miosina
 - **Cofilina:** desfaz filamentos de actina
 - **Profilina:** reestruturação dos filamentos de actina
- **Filamentos intermediários (10nm):** polímeros de vimentina, queratina, lamina (suporte ao envelope nuclear)
- **Microtúbulos (23nm):** polímeros de tubulina; transporte intracelular; cílios e flagelos; fuso acromático da mitose.

É composto por vários filamentos, mais ou menos finos, formando uma estrutura tipo um cordel. É responsável pela integridade da célula.

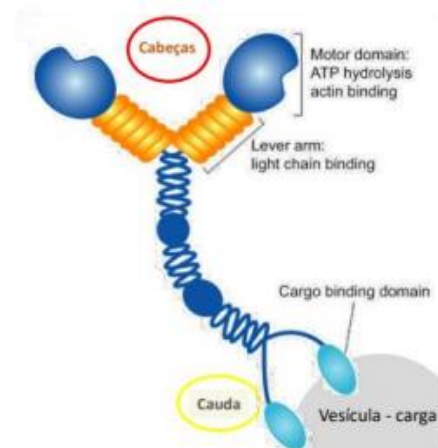
Está em constante mutação, o que permite a formação de pseudópodos (por exemplo nos macrófagos) e as invaginações da membrana.

Transporte de vesículas - motores moleculares

As cabeças ou motores são responsáveis por estabelecer ligações com os microtubos do citoesqueleto.

Como se fosse dando passos em cima do citoesqueleto, esta molécula vai fosforilar e desfosforilar ADP e ATP ao ligar-se e desprender-se das fibras.

As caudas estabelecem ligações com a vesícula que se pretende transportar até ao destino.



- A **misoina** e a **actina** são proteínas que compõem os microfibrilos que compõe as fibras musculares

Na célula não há espaço vazio!

