

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DISCIPLINA: “**IQB-475**” – **BIOLOGIA MOLECULAR**

PRÉ-REQUISITO: IQB 248 – BIOQUÍMICA EQ

CARGA HORÁRIA SEMANAL: 4h (TEORIA)

CARGA HORÁRIA TOTAL: 60(sessenta) horas

Objetivos

Fornecer aos alunos dos cursos de graduação de áreas não biológicas, mas que potencialmente poderão se engajar em trabalhos envolvendo organismos geneticamente modificados, o embasamento teórico necessário à compreensão das tecnologias que envolvem a manipulação do DNA, particularmente a construção de moléculas de DNA recombinante e a inserção destas moléculas híbridas em células hospedeiras.

Ementa

Estrutura e Replicação do DNA

O Núcleo Interfásico e a Estrutura do Cromossomo Eucarionte

Mutagenese e Mecanismos de Reparo do DNA

PCR e Seqüenciamento do DNA

Transcrição da Informação Gênica

Regulação da Transcrição Gênica em Procariontes e Eucariontes

Biossíntese e Endereçamento de Proteínas

Regulação da Meia-vida de Proteínas

Tecnologia do DNA Recombinante

Técnicas de Biologia Molecular Aplicada ao Estudo de Proteínas

PROGRAMA ANALÍTICO

Estrutura do DNA (2 horas)

Blocos construtores do DNA; bases nitrogenadas, propriedades das bases nitrogenadas, nucleosídeos, nucleotídeos, nomenclatura dos nucleotídeos e nucleosídeos, ligação fosfodiéster, modelo de Watson e Crick (DNA B); evidências experimentais que levaram a elaboração do modelo de Watson e Crick; DNA A, DNA Z, DNA triplex e DNA quadruplex; Características físico-químicas do DNA - T_m .

Núcleo Interfásico e a Estrutura do Cromossomo Eucarionte (2 horas)

Ultra-estrutura nuclear: carioteca, poros, matriz, cromatina, eucromatina, heterocromatina, associação da cromatina com o envoltório nuclear, nucléolo; proteínas associadas ao DNA (histonas, não-histonas), organização da cromatina; elementos estruturais do cromossoma eucarionte: telômeros, centrômeros e origens de replicação, regiões organizadoras do nucléolo.

Replicação do DNA (2 horas)

Replicação do DNA em procariontes: origem de replicação, início da replicação, alongamento e término; proteínas que participam da replicação do DNA; DNA girase, DNA helicase, primase, proteínas SSB, DNA polimerase I, DNA polimerase III, DNA ligase, fragmentos de Okasaki, atividade corretora das DNA polimerases, síntese semidescontínua do DNA, mecanismo de ação da DNA ligase, experimentos que comprovam a replicação semiconservativa.

Mutagênese e Mecanismos de Reparo do DNA (2 horas)

Mutações espontâneas e mutações induzidas. Alterações da estrutura do DNA provocadas por agentes químicos e físicos (agentes alquilantes, desaminantes, hidroxilantes e luz ultravioleta). Conseqüências da alteração da estrutura química do DNA na transmissão da informação genética. Mecanismos de reparo celulares: reparo no claro, reparo no escuro, recA, sistema SOS.

PCR e Seqüenciamento do DNA (2 horas)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) - montagem da reação, enzimas e desenho dos *primers*. Seqüenciamento do DNA pelo método de terminação com di-desoxinuclueotídeos, seqüenciamento manual e seqüenciamento automatizado. Aplicações do PCR na biologia molecular e na biotecnologia.

Transcrição Gênica (2 horas)

Estrutura do RNA, diferenças entre DNA e RNA, tipos de RNA: rRNA, tRNA e mRNA, RNA polimerase, sítio promotor, fator sigma, início, alongamento e término da transcrição, diferenças entre a síntese do RNA e do DNA, RNA polimerase de eucariontes e procariontes.

Regulação da Transcrição Gênica em Procariontes (2 horas)

Conceito de operon, operon lac, repressão catabólica, interação proteína-DNA, operon araBAD, operon trp, atenuação, inibidores da transcrição.

Regulação da Transcrição Gênica em Eucariontes (4 horas)

O mRNA eucarionte - modificações pós-transcricionais: adição de cap, processamento, poliadenilação. Estrutura dos promotores eucariontes, *enhancers*, o fator basal de transcrição, estrutura da RNA polimerase eucarionte, fatores transcricionais eucariontes.

Metodologias Usadas para Estudo da Expressão Gênica (2 horas)

Northen blot, sondas de DNA, marcação da sonda de DNA: marcarores radioativo e não radioativos, RT-PCR, RT-PCR de tempo real.

Biossíntese de Proteínas (4 horas)

O código genético, experimentos realizados para elucidar o código genético, tRNA - estrutura primária, secundária e terciária, aminoacil-tRNA sintetases, interação códon-anticódon, supressão, ribossomas -estrutura, iniciação alongamento e terminação da cadeia peptídica, inibidores da síntese protéica, modificações pós-traducionais.

Endereçamento protéico (2 horas)

Sistemas de organelas da célula eucarionte, seqüências sinalizadoras de compartimentalização, a seqüência sinal, PRS, ancoramento do ribossoma ao RER, peptidase sinal, glicosilação, transporte do RER ao Golgi, estrutura e função do Golgi, secreção de proteínas.

Regulação da Meia-vida de Proteínas (2 horas)

Sistemas proteolíticos intracelulares, meia-vida de proteínas, regra do N-terminal, seqüência PEST, seqüências KFERQ, sinais de proteólise condicionais, sistema de proteólise dependente de ubiquitina.

Tecnologia do DNA Recombinante (6 horas)

Vetores de clonagem - plasmídeos, fagos, cosmídeos, YACs; tipos de vetores: vetores integrativos, vetores episomais, vetores centroméricos, vetores de expressão; elementos funcionais em um vetor de clonagem: marcadores de seleção, origem de replicação, sítios múltiplos de clonagem; enzimas de restrição, sistemas de restrição e modificação, extremidades cegas, pontas coesivas, DNA ligase; construção de biblioteca genômica, construção de biblioteca de cDNA, estratégias de identificação dos clones de interesse – identificação por complementação, com o uso de sonda de DNA e com o uso de anticorpos.

Clonagem Gênica em Células Vegetais (2 horas)

Vetores usados para clonagem gênica em células vegetais, introdução do DNA em célula vegetal, plantas transgênica.

Uso da Biologia Molecular para a Identificação das Diferenças entre Organismos (4 horas)

RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), VNTR (número variável de repetições em série), identificação de cepas usando RFLP e VNTR, teste de paternidade, identificação humana.

Técnicas de Biologia Molecular Aplicada ao Estudo de proteínas (4 horas)

Mutagênese sítio-dirigida, o sistema de duplo híbrido, construção de proteínas híbridas e suas aplicações – localização celular da proteína, gene repórter e purificação de proteínas.

Estudos Orientados (8 horas)

Quatro aulas de discussão de textos sobre as diferentes aplicações modernas da biologia molecular.

Avaliações (8 horas)

Três avaliações parciais e uma avaliação final.

Bibliografia

Fundamentos da Biologia Celular – Uma Introdução a Biologia Molecular da Célula. Dennis Bray, Bruce Alberts, Alexander Johnson. 1º Edição - Editora ArtMed (1999).