

LICENCIATURA EM BIOLOGIA

DISCIPLINA
BIOQUÍMICA

Ano Lectivo de 2013/2014

Aula nº 13

02 ABR

Ricardo Boavida Ferreira

Sala 40

Introdução à Bioquímica do Metabolismo

O dogma central da biologia. Do genoma ao metaboloma. Vias metabólicas, anabolismo e catabolismo. A termodinâmica dirige a vida. A Bioenergética aplicada à Bioquímica do Metabolismo.

Material de estudo: diapositivos das aulas, bibliografia recomendada e textos de apoio.

Data: Tue, 01 Apr 2014 11:35:05 -0600

De: New Scientist <NewScientist@a.newscientist.com>

Para: rbferreira@isa.utl.pt

Responder Para: New Scientist <reply-fac710777160067e4965_HTML-52114975-6141152-800@a.newscientist.com>

Assunto: Can you answer the latest Last Word on Energy question?

Win £100 answering the latest Last Word on Energy question

Our latest Last Word on Energy question is live and ready for you to answer. The authors of the best answers will win £100 or US\$160 and see their words published in a future issue of New Scientist. Tell us:

Is there really such a thing as a food that takes more energy to digest than we can obtain from it? Could we make such a food for slimmers?

Submit your answers online at: newscientist.com/topic/energy

Please do not reply to this email - answers will only be considered if submitted as explained on newscientist.com/topic/energy, where you can also read more about The Last Word on Energy, in association with Statoil.

Good luck!

newscientist.com

You have been sent this email at rbferreira@isa.utl.pt because we thought it would be relevant and interesting to you.

[Click here](#) to unsubscribe from further emails relating to miscellaneous products, services and subscriptions from New Scientist.

Copyright Reed Business Information Ltd. 2014

Disclaimer: This message is intended only for the use of the person(s) ("Intended Recipient") to whom it is addressed. It may contain information, which is privileged and confidential. Accordingly any dissemination, distribution, copying or other use of this message or any of its content by any person other than the Intended Recipient may constitute a breach of civil or criminal law and is strictly prohibited. If you are not the Intended Recipient, please contact the sender as soon as possible.

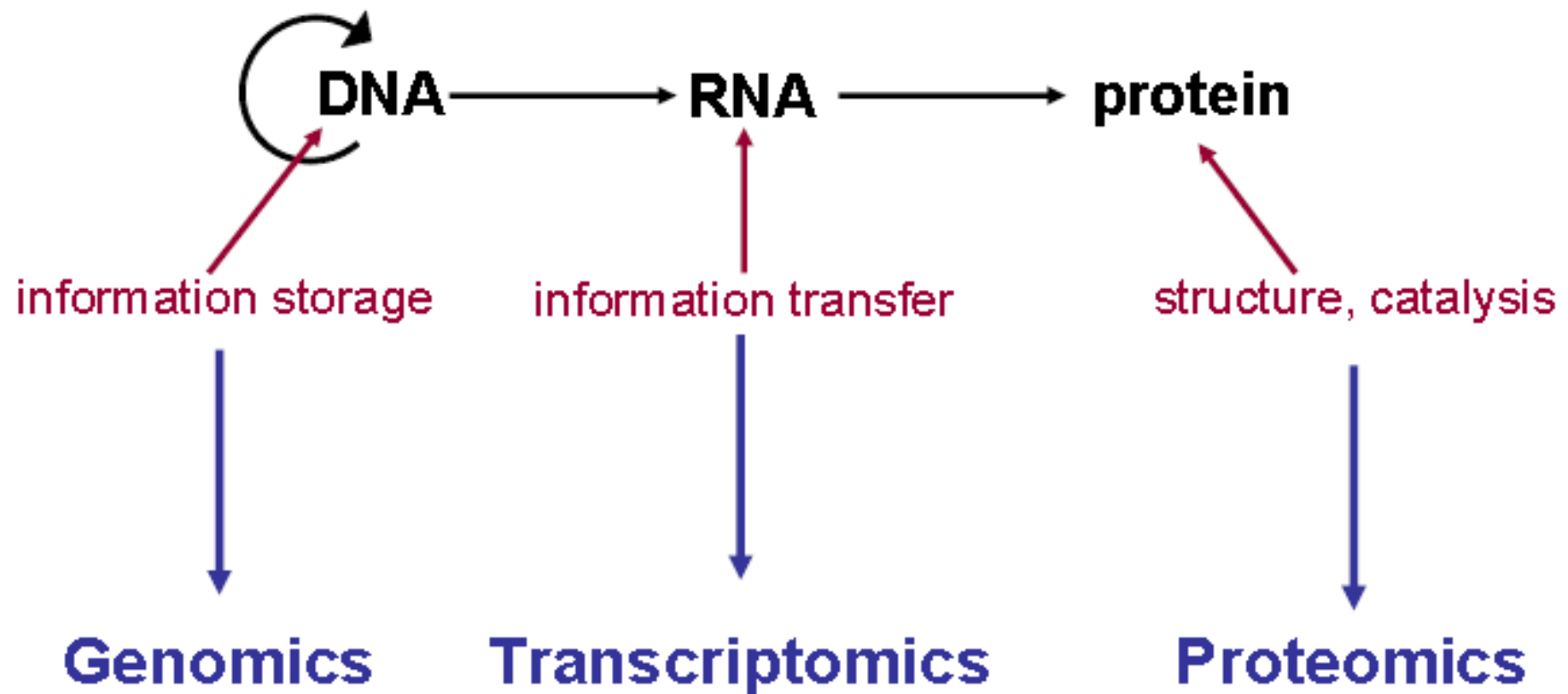
We and our third party service providers may use cookies and other web technologies in conjunction with this email. These technologies are used to understand activity with this email and on certain portions of our website. This enables us to improve our site, your experience on our site, and the offerings that we may provide to you. If you do not want these technologies placed on your device, please opt-out of receiving emails from us.

1.

O Dogma Central da Biologia Molecular

Centered in the sixties, a number of more or less rigid postulates and assumptions were made that established the solid foundations of Biochemistry at the time. However, as years have passed by, many of these foundations gradually fell by successive discoveries. Let's start with the Central Dogma for Molecular Biology, first proposed by Francis Crick in 1958.

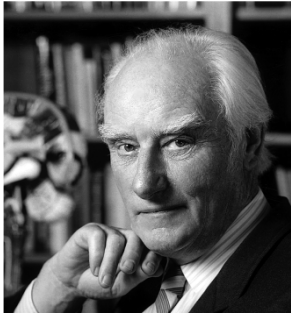
The central dogma of molecular biology



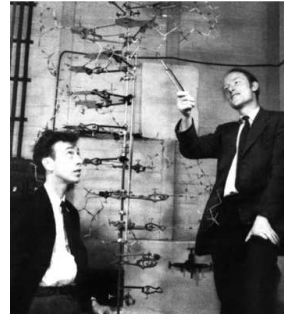
The **central dogma of molecular biology** was first articulated by Francis Crick in 1958 and re-stated in a *Nature* paper published in 1970.

The central dogma of molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that information cannot be transferred back from protein to either protein or nucleic acid. In other words, 'once information gets into protein, it can't flow back to nucleic acid.'

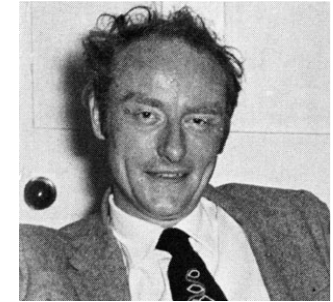
The dogma is a framework for understanding the transfer of sequence of information between sequential information-carrying biopolymers, in the most common or general case, in living organisms. There are 3 major classes of such biopolymers: DNA and RNA (both nucleic acids), and protein. There are $3 \times 3 = 9$ conceivable direct transfers of information that can occur between these. The dogma classes these into 3 groups of 3: 3 **general transfers** (believed to occur normally in most cells), 3 **special transfers** (known to occur, but only under specific conditions in case of some viruses or in a laboratory), and 3 **unknown transfers** (believed never to occur). The general transfers describe the normal flow of biological information: DNA can be copied to DNA (DNA replication), DNA information can be copied into mRNA, (transcription), and proteins can be synthesized using the information in mRNA as a template (translation).



Francis Harry Compton Crick
(UK, 1916-2004)

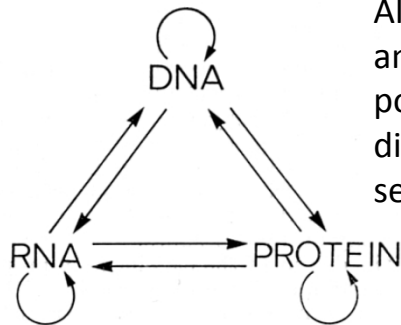


Francis Crick
in 1954



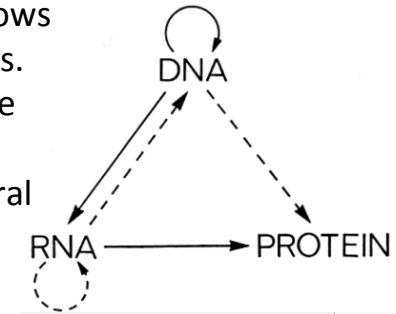
Crick, F. (1970) Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561-563.

Flow of detailed sequence information



All possible simple transfers among the three families of polymers, representing the directional flow of detailed sequence information.

Solid arrows show general transfers. Dotted arrows show special transfers. Absent arrows are the undetected transfers specified by the central dogma.



General transfers:

May occur in all cells

- DNA → DNA
- DNA → RNA
- RNA → Protein

Special transfers:

Do not occur in most cells, but may occur under special circumstances

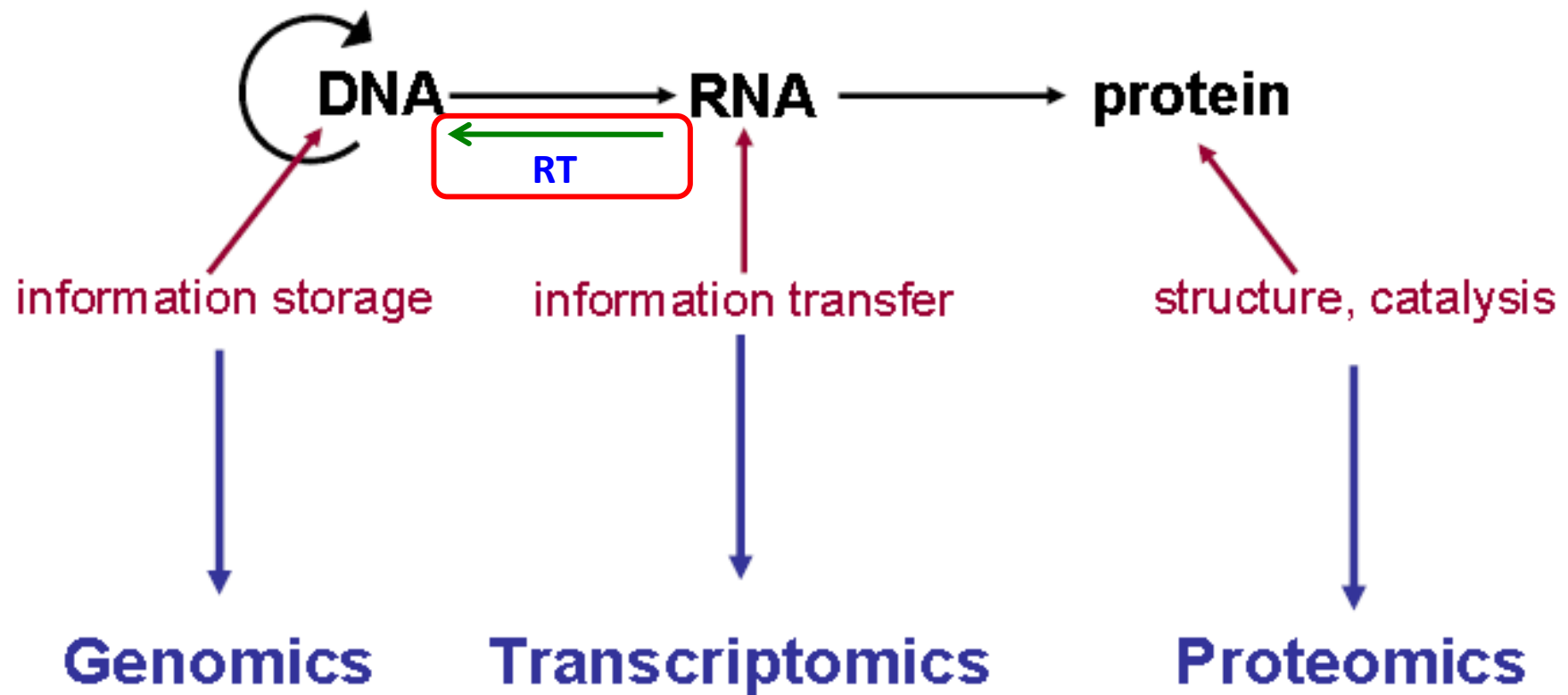
- RNA → RNA
- RNA → DNA
- DNA [?] → Protein

Unknown transfers:

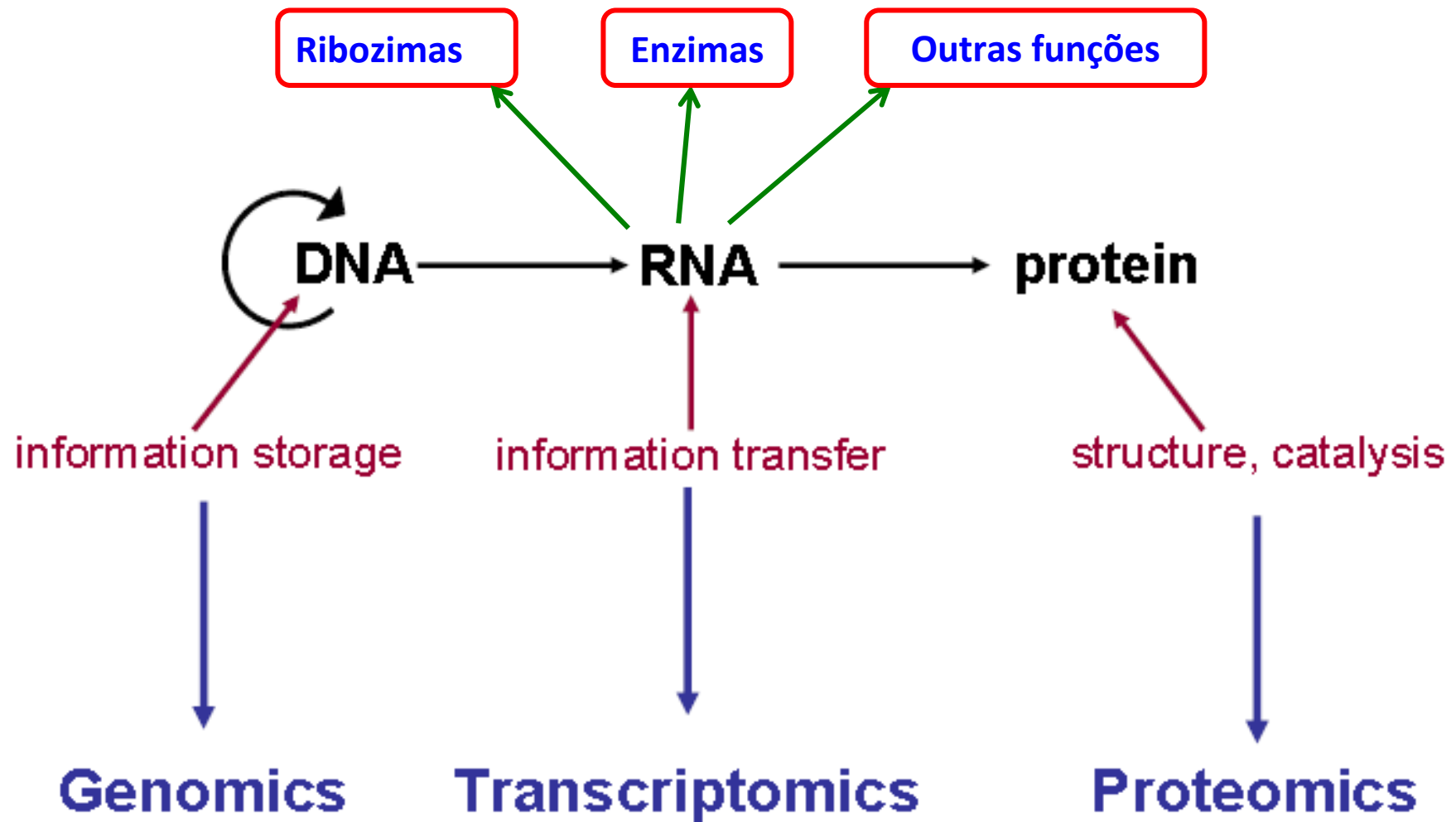
Which the Central Dogma postulates never occur

- Protein → Protein
- Protein → DNA
- Protein → RNA

The central dogma of molecular biology

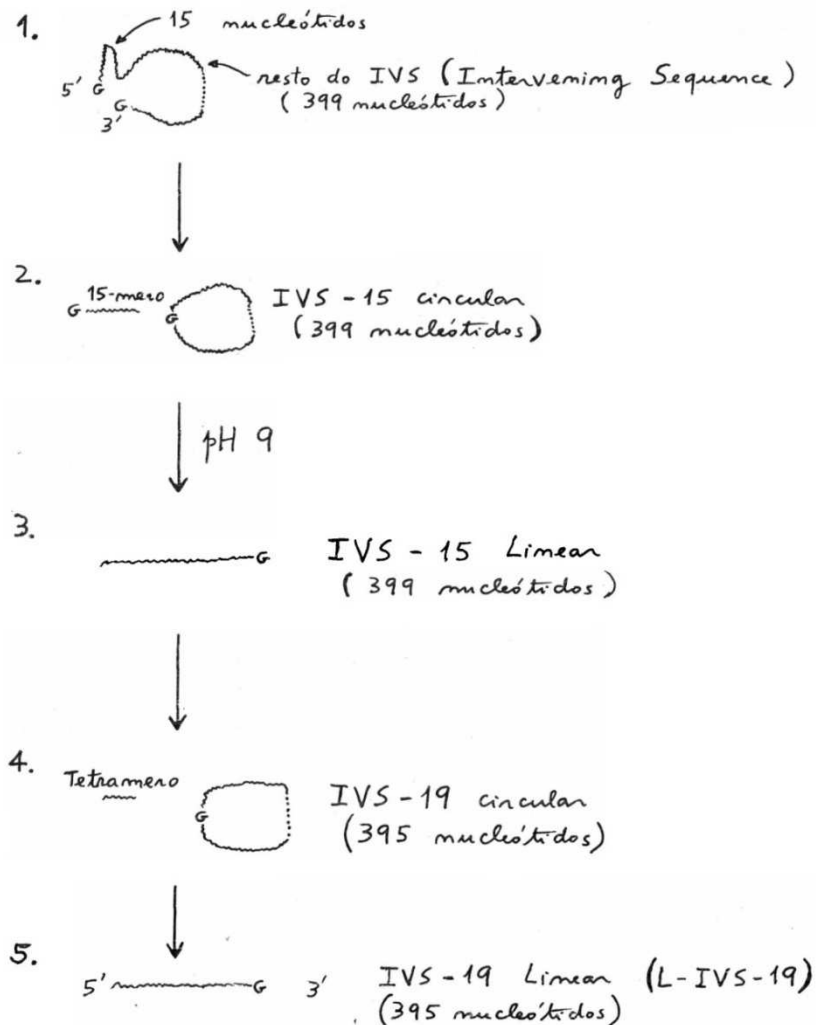


The central dogma of molecular biology



Ribozima

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA SEQUÊNCIA DE REACÇÕES QUE O RNA DE TETRAHYMENA LEVA A CABO NA SUA PRÓPRIA MOLECULA.



RNA como enzima

Há centenas de RNAs com função catalítica. Exemplos:

L- IVS-19

Ribonuclease P

Peptidil transferase é a enzima que catalisa a formação da ligação peptídica, entre o aminoacil-tRNA (aa-tRNA) ligado ao centro A do ribossoma e o peptidil-tRNA ligado ao centro P do ribossoma – a reacção mais importante da natureza?

O centro activo da peptidil transferase é composto por RNA (23 S rRNA), não se encontrando nenhuma proteína num raio de 15 Å.

Classificação dos RNAs

Os RNAs eram tradicionalmente classificados de acordo com a sua estrutura e função, em rRNA, tRNA e mRNA.

Contudo, têm sido descobertos, nos últimos anos, muitos tipos diferentes de RNA, com diferentes estruturas, funções e distribuição. Uma possível classificação para os RNAs das células é a seguinte:



RNAs involved in protein synthesis

<u>Messenger RNA</u>	mRNA	<u>Codes</u> for protein	All organisms
<u>Ribosomal RNA</u>	rRNA	<u>Translation</u>	All organisms
<u>Signal recognition particle RNA</u>	7SL RNA or SRP RNA	Membrane integration	All organisms
<u>Transfer RNA</u>	tRNA	Translation	All organisms
<u>Transfer-messenger RNA</u>	tmRNA	Rescuing stalled ribosomes	<u>Bacteria</u>

RNAs involved in post-transcriptional modification or DNA replication




Small nuclear RNA	snRNA	Splicing and other functions	Eukaryotes and archaea
Small nucleolar RNA	snoRNA	Nucleotide modification of RNAs	Eukaryotes and archaea
SmY RNA	SmY	mRNA trans-splicing	Nematodes
Small Cajal body-specific RNA	scaRNA	Type of snoRNA; Nucleotide modification of RNAs	
Guide RNA	gRNA	mRNA nucleotide modification	Kinetoplastid mitochondria
Ribonuclease P	RNase P	tRNA maturation	All organisms
Ribonuclease MRP	RNase MRP	rRNA maturation, DNA replication	Eukaryotes
Y RNA		RNA processing, DNA replication	Animals
Telomerase RNA		Telomere synthesis	Most eukaryotes

Regulatory RNAs

Antisense RNA	aRNA	Transcriptional attenuation / mRNA degradation / mRNA stabilisation / Translation block	All organisms
Cis-natural antisense transcript		Gene regulation	
CRISPR RNA	crRNA	Resistance to parasites, probably by targeting their DNA	Bacteria and archaea
Long noncoding RNA	Long ncRNA	Various	Eukaryotes
MicroRNA	miRNA	Gene regulation	Most eukaryotes
Piwi-interacting RNA	piRNA	Transposon defense, maybe other functions	Most animals
Small interfering RNA	siRNA	Gene regulation	Most eukaryotes
Trans-acting siRNA	tasiRNA	Gene regulation	Land plants
Repeat associated siRNA	rasiRNA	Type of piRNA; transposon defense	Drosophila
7SK RNA	7SK	negatively regulating CDK9/cyclin T complex	

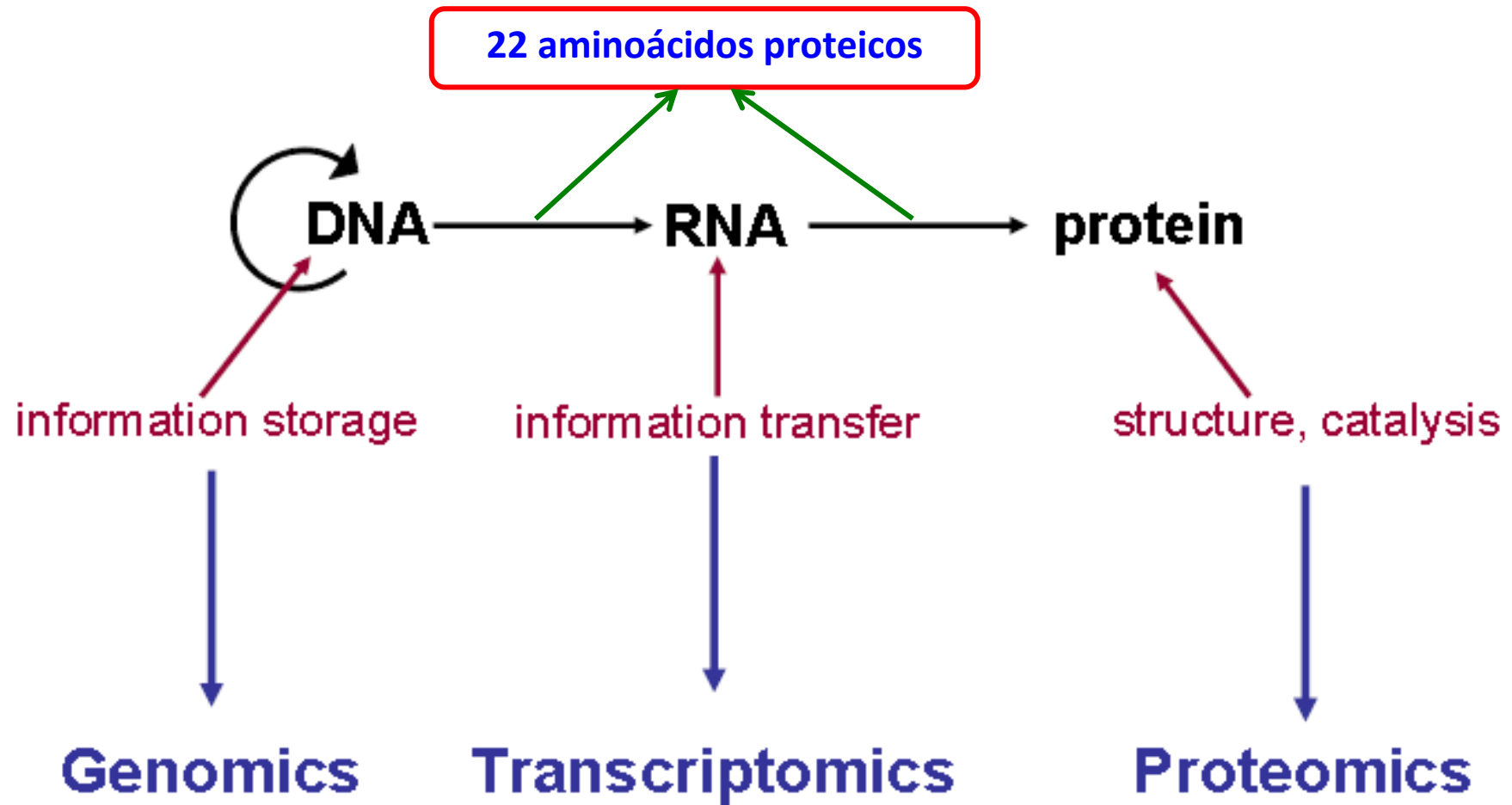
Parasitic RNAs

Retrotransposon	Self-propagating	Eukaryotes and some bacteria
Viral genome	Information carrier	Double-stranded RNA viruses , positive-sense RNA viruses , negative-sense RNA viruses , many satellite viruses and reverse transcribing viruses
 Viroid	Self-propagating	Infected plants
Satellite RNA	Self-propagating	Infected cells

Other RNAs

[Vault RNA](#) vRNA Expulsion of [xenobiotics](#), maybe

The central dogma of molecular biology

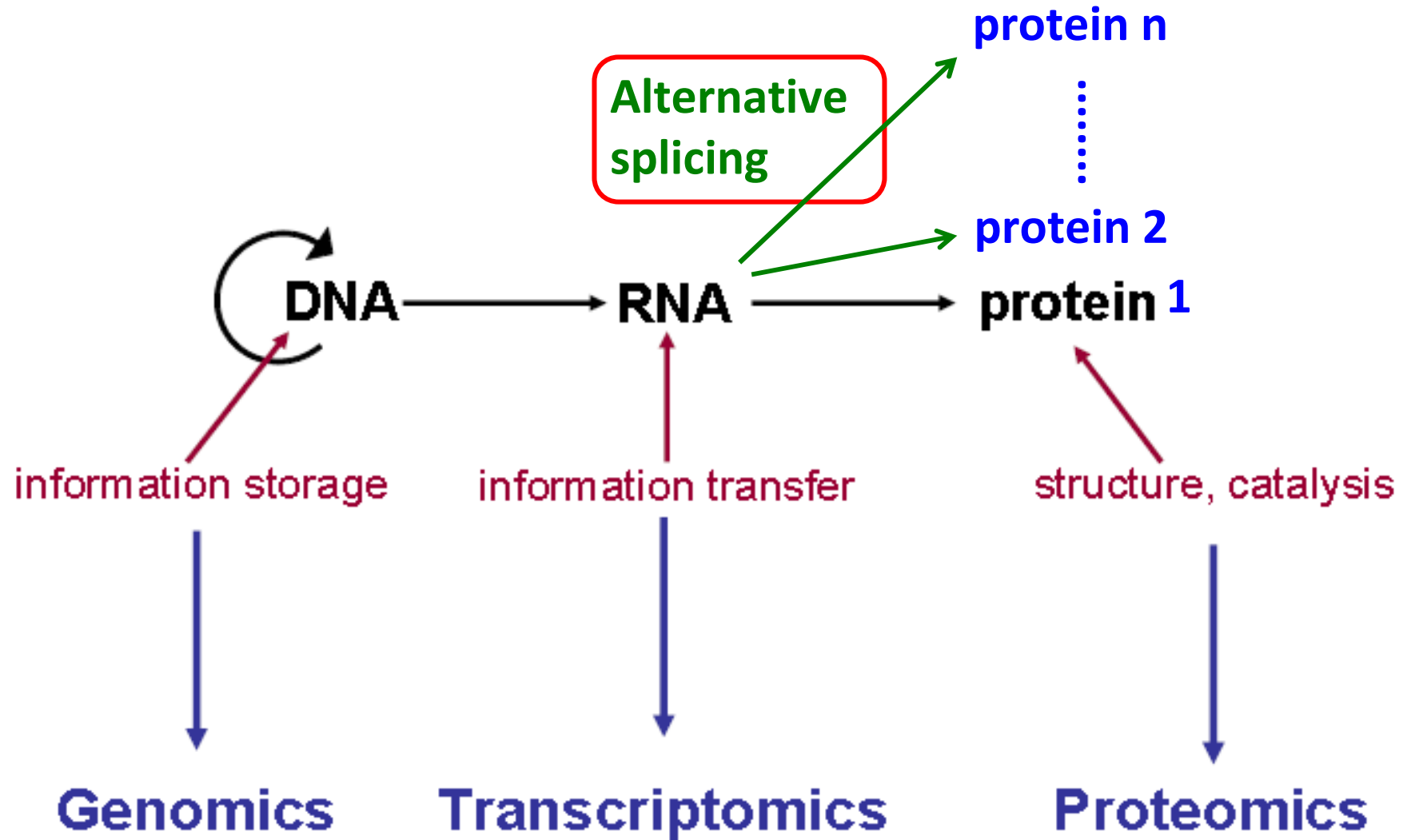


The genetic code

		Second nucleotide base						
		U	C	A	G			
First nucleotide base (5' position)	U	UUU } Phenylalanine (Phe)	UCU } Serine (Ser)	UAU } Tyrosine (Tyr)	UGU } Cysteine (Cys)	Third nucleotide base (3' position)	U C A G	
		UUC } Leucine (Leu)		UAC } STOP				UGC } Selenocysteine (SeCys)
		UUA } Leucine (Leu)		UCA } STOP*				UGA } Tryptophan (Trp)
		UUG } Methionine (Met); (fMet in prokaryotes)		UCG } Arginine (Arg)				
	C	CUU } Leucine (Leu)	CCU } Proline (Pro)	CAU } Histidine (His)	CGU } Arginine (Arg)		U C A G	
		CUC } Leucine (Leu)		CAC } Glutamine (Gln)				CGC } Arginine (Arg)
		CUA } Leucine (Leu)		CAA } Glutamine (Gln)				CGA } Arginine (Arg)
		CUG } Leucine (Leu)		CAG } Arginine (Arg)				CGG } Arginine (Arg)
	A	AUU } Isoleucine (Ile)	ACU } Threonine (Thr)	AAU } Asparagine (Asn)	AGU } Serine (Ser)		U C A G	
		AUC } Isoleucine (Ile)		AAC } Lysine (Lys)				AGC } Serine (Ser)
		AUA } Isoleucine (Ile)		AAA } Lysine (Lys)				AGA } Arginine (Arg)
		AUG } START Methionine (Met); (fMet in prokaryotes)		AAG } Lysine (Lys)				AGG } Arginine (Arg)
	G	GUU } Valine (Val)	GCU } Alanine (Ala)	GAU } Aspartic acid (Asp)	GGU } Glycine (Gly)		U C A G	
		GUC } Valine (Val)		GAC } Glutamic acid (Glu)				GGC } Glycine (Gly)
		GUA } Valine (Val)		GAA } Glutamic acid (Glu)				GGA } Glycine (Gly)
		GUG } Valine (Val)		GAG } Glutamic acid (Glu)				GGG } Glycine (Gly)

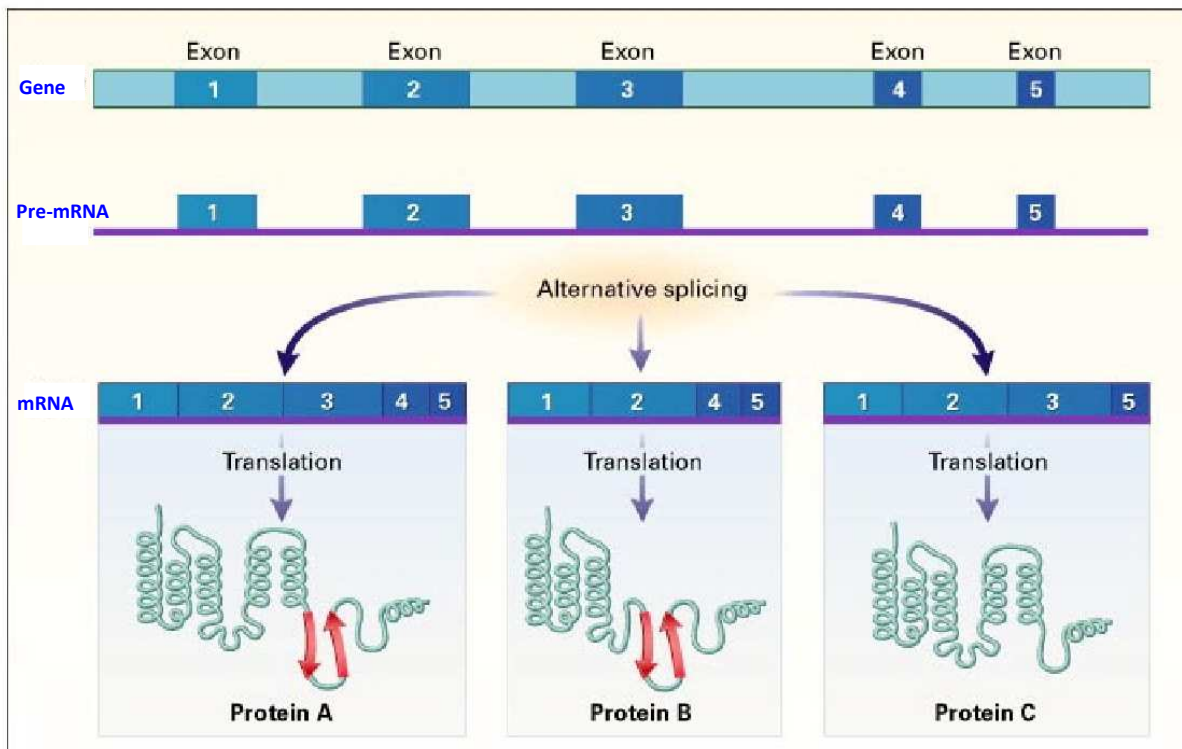
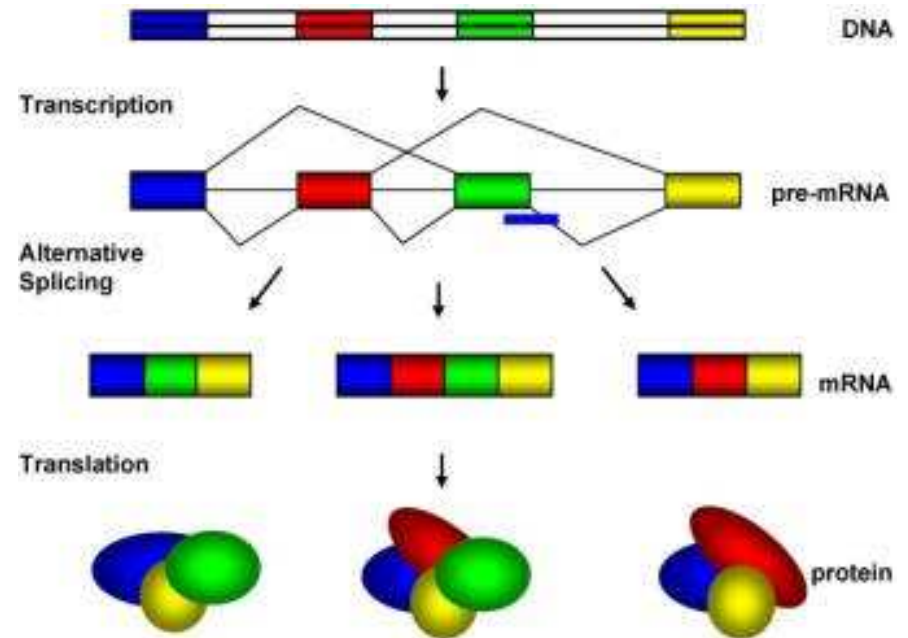
*also codes for a 22nd amino acid, pyrrolysine, in some prokaryotes.

The central dogma of molecular biology



Alternative Splicing

- A single gene can contain numerous exons and introns, and the exons can be spliced together in different ways.
- Thus, a single gene can produce multiple related proteins, or isoforms, by means of alternative splicing. The "record-holder" for alternative splicing is actually a *Drosophila* gene called *Dscam*, which has 38,000 splice variants.
- There are cases in which RNA copies of different genes are spliced together, vastly multiply the potential number of different proteins.

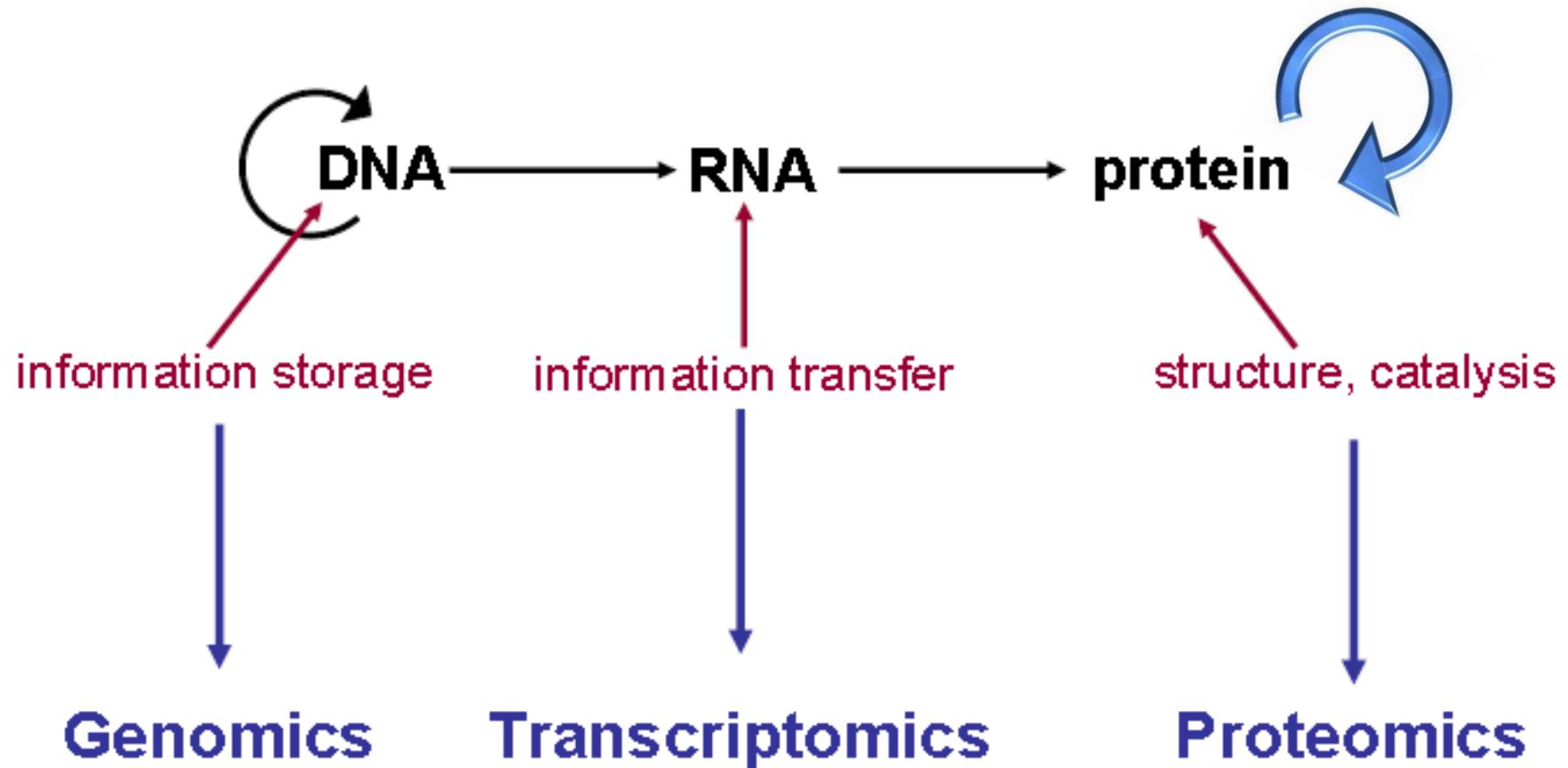


• **Invalidates** the old theory of one DNA sequence coding for one polypeptide (**the "one-gene-one-protein" hypothesis**). External information is needed in order to decide which polypeptide is produced, given a DNA sequence and pre-mRNA. (This does not necessarily negate the central dogma of molecular biology which is about the flow of information from genes to proteins).

Alternative splicing – possible functions

- It has been proposed that for eukaryotes it was a very important step towards higher efficiency, because information can be stored much more economically. Several proteins can be encoded in a DNA sequence whose length would only be enough for two proteins in the prokaryote way of coding.
- Others have noted that it is unnecessary to change the DNA of a gene for the evolution of a new protein. Instead, a new way of regulation could lead to the same effect, but leaving the code for the established proteins unharmed.
- Another speculation is that new proteins could be allowed to evolve much faster than in prokaryotes. Furthermore, they are based on hitherto functional amino acid subchains. This may allow for a higher probability for a functional new protein. Therefore the adaptation to new environments can be much faster - with fewer generations - than in prokaryotes. This might have been one very important step for multicellular organisms with a longer life cycle.

The central dogma of molecular biology



Protein-protein interactions often involve what may be considered as information transfer:

- 1 – Cristian Anfinsen – Molecular chaperones
- 2 – Prions
- 3 – Protein aggregates

Protein-protein interactions often involve what may be considered as information transfer:

1 – Cristian Anfinsen – Molecular chaperones

2 – Prions

3 – Protein aggregates



Christian Boehmer Anfinsen, Jr. (1916–1995) was an American biochemist. He was awarded the 1972 Nobel prize for his work on ribonuclease. In 1961 he showed that ribonuclease could be refolded after denaturation while preserving enzyme activity, thereby suggesting that all the information required by protein to adopt its final conformation is encoded in its primary structure.

Como a estrutura de nível primário está codificada no gene, então poder-se-ia concluir que a conformação biologicamente activa da proteína já se encontra determinada no gene.

Mais recentemente, observou-se que muitas proteínas requerem, para assumirem a conformação biologicamente activa, outras proteínas, por isso denominadas **chaperones moleculares**. São exemplos os proteassomas 20 S e 26 S e a ribulose bisfosfato carboxilase (Rubisco).

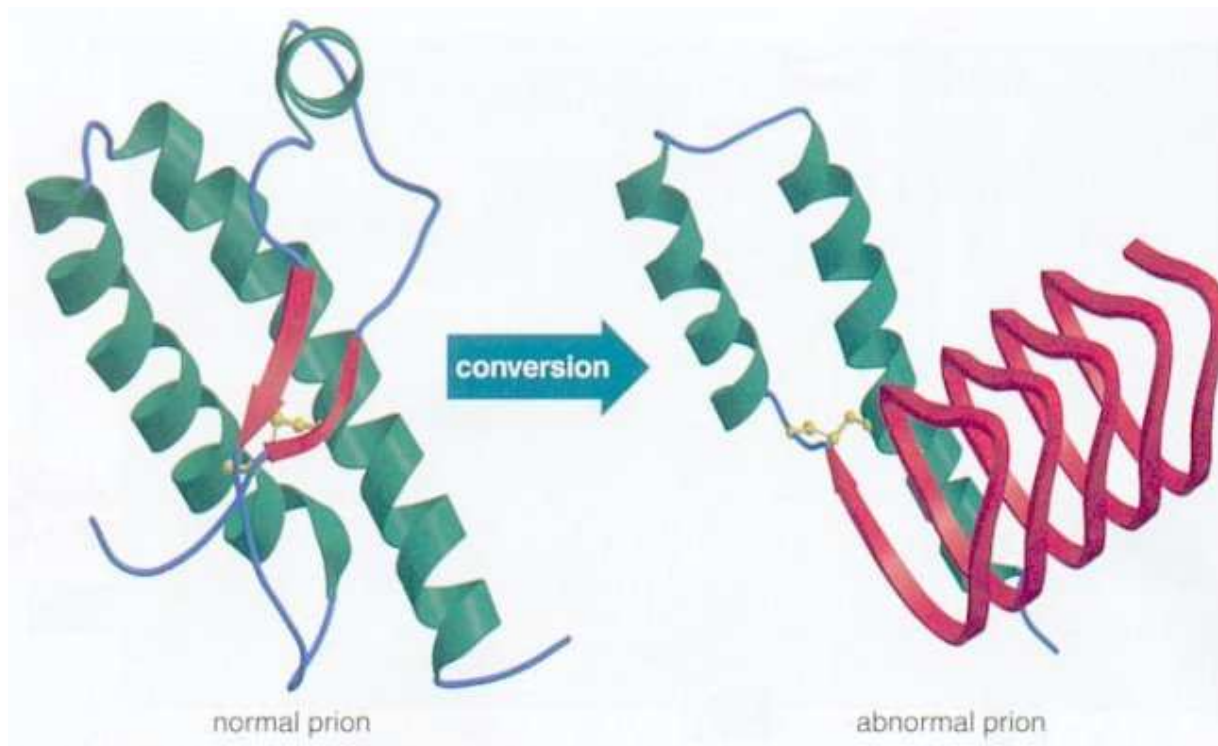
Nestes casos, a estrutura de nível terciário depende não só de informação contida no gene da proteína, como também nos genes das outras proteínas que participam no seu processamento.

Protein-protein interactions often involve what may be considered as information transfer:

1 – Cristian Anfinsen – Molecular chaperones – Rubisco activase RuBP! - Estranho; CA1-P – estranho!

2 – Prions

3 – Protein aggregates

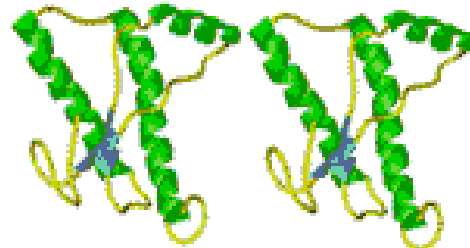
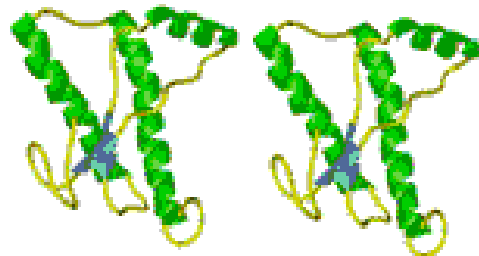
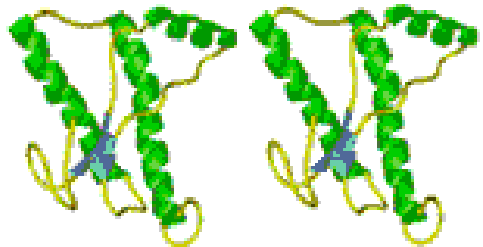
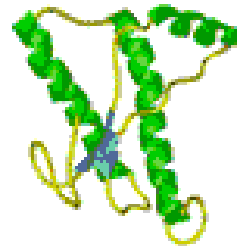
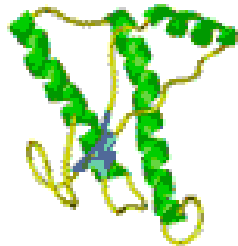
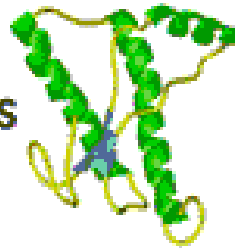


Prions:

- Creutzfeldt-Jacob disease in humans
- Bovine spongiform encephalitis (BSE, mad cow disease)
- Scrapie in sheep

The notion that the only way for diseases to pass from one organism to another is by genetic information has been an undisputed postulate until recently. Even viruses, although not technically alive, still possess genetic information in the form of DNA or RNA.

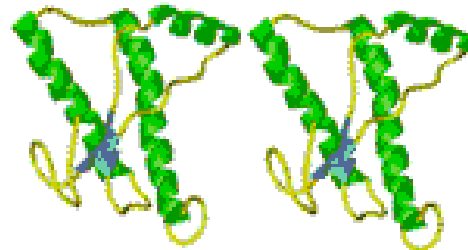
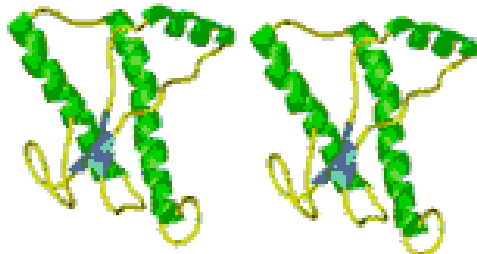
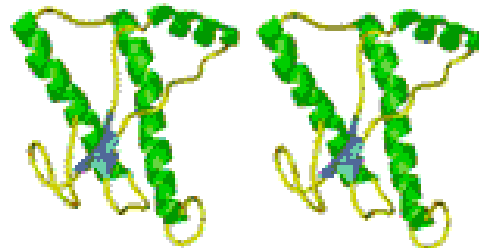
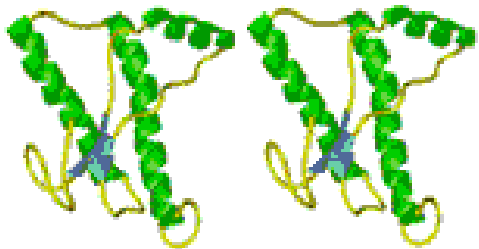
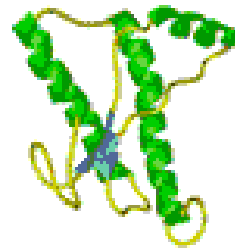
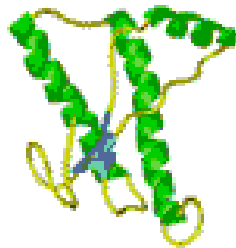
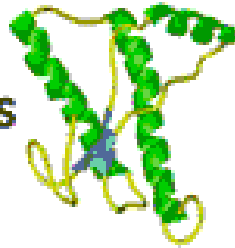
Cellular PrPS



According to the **prion model**, the disease progresses when a misfolded PrP^{Sc} molecule comes in contact with cellular form PrP^C of this protein and converts them. The appearance of a misfolded molecule can be either **spontaneous**, or caused by **feeding an animal with food containing the meat of diseased animals**. Both modes of infection have exhaustive experimental confirmation.

The problem with the spontaneous appearance of prions stems from the fact that the **formation of the infectious form of the prion is thermodynamically unfavorable**. If forming one molecule is unfavorable, then how can this one molecule survive in the body without reverting back into a 'good' cellular form, let alone convert other molecules against the 'thermodynamic gradient'?

Cellular PrPS



A '**nucleation**' theory, one of several, offers the answer to this question by suggesting that the process is very slow at first, with only a handful of molecules undergoing conversion. The misfolded molecules stabilize each other when they aggregate. After a very long time, the aggregate reaches a certain number 'n', at which point it is called a nucleus, thus the name for this theory. The nucleus is very stable and can quickly convert the rest of the 'good' molecules in their misfolded PrP^{Sc} forms. The presence of plaque-like clusters of the protein in infected cells supports this hypothesis.

protein



Protein-protein interactions often involve what may be considered as information transfer:

1 – Cristian Anfinsen – Molecular chaperones – Rubisco activase RuBP! - Estranho; CA1-P – estranho!

2 – Prions

3 – Protein aggregates

From a structural (and thus thermodynamic) point of view, abnormal proteins are most often potentially toxic to cells not because they are incapable of performing their biological function, but most often because they are incorrectly folded, frequently exposing hydrophobic surfaces to the external hydrophilic cellular milieu, instead of being buried inside the hydrophobic core that characterizes the protein native conformation.

Such exposed hydrophobic surfaces constitute aggregation nuclei, to which partial unfolded proteins may be successively added, resulting in the build-up of large macromolecular protein aggregates. Reactive oxygen species (ROS), thermal mobility and polypeptide movements resulting from the expression of the protein biological activity further complicate this scenario.

Large protein aggregates are immune to proteolytic attack. In the aggregates, the proteins may be held together by

- Hydrophobic interactions;
- Electrostatic interactions;
- Covalent bonds.

Formação da coalhada no fabrico do queijo - Interações hidrofóbicas

No leite, as caseínas ocorrem conjuntamente com o fosfato de cálcio, na forma de complexos esféricos fortemente hidratados denominados micelas. Estes complexos apresentam um tamanho variável, com diâmetros a variarem entre 20 e 600 nm e massas moleculares médias da ordem dos 100 MDa. O leite possui

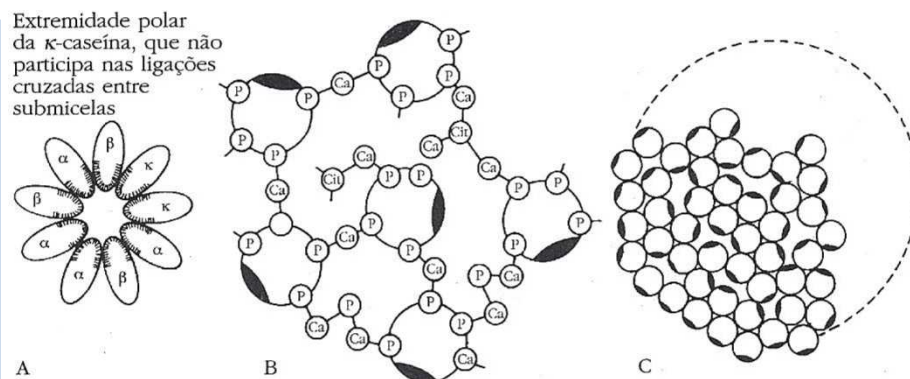
c. 10^{15} micelas por litro. Uma micela típica contém qualquer coisa como 2×10^4 moléculas de caseína.

Cada micela é um agregado de subunidades, cada uma das quais consiste de 25 a 30 moléculas de α -, β -, e κ -caseína em proporções semelhantes às que ocorrem no leite. A γ -caseína é um artefacto, na medida em que é um fragmento da β -caseína, que resulta de proteólise limitada por acção de proteases presentes no leite. Cada tipo de caseína apresenta uma forma alongada, do tipo de bola de *rugby*.

Cada uma das suas moléculas possui uma extremidade com uma predominância de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a outra extremidade com uma predominância de resíduos de aminoácidos polares. As extremidades hidrófobas ficam viradas para o interior, longe do contacto com a água, e as extremidades polares para o meio hidrofílico do exterior.

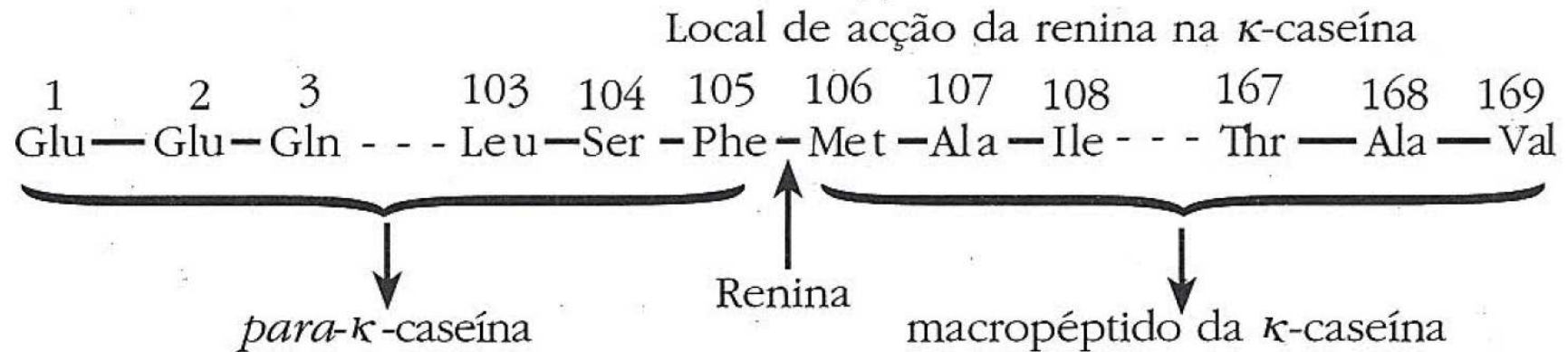
A extremidade polar da α -caseína possui 8 resíduos de serina com grupos fosfato esterificados. A extremidade polar da β -caseína contém 4 destes resíduos de fosfoserina. Finalmente, a extremidade polar da κ -caseína não apresenta resíduos fosfato, mas 1 ou + dos seus resíduos de treonina contêm cadeias oligossacarídicas. Os grupos fosfato das caseínas α e β reagem com Ca^{2+} para ligar as submicelas entre si, quer directamente quer em cadeias que envolvem a participação de mais grupos fosfato ou de citrato. Nas zonas onde ocorre a κ -caseína não se observa ligação cruzada entre as submicelas, devido à incapacidade da extremidade polar desta proteína em ligar o cálcio. Na formação das micelas, à medida que o número de submicelas que se associam vai aumentando, a tendência é para as zonas polares da κ -caseína, que não participam na associação das submicelas, dominarem a superfície exterior da micela, o que impede o seu crescimento indefinido.

Estrutura proposta para a micela de caseína. **(A)** Estrutura de uma submicela típica, ilustrando a associação entre os três tipos de moléculas de caseína envolvidas. As zonas predominantemente hidrofóbicas encontram-se sombreadas. **(B)** Estabelecimento de ligações cruzadas entre as submicelas de caseína. As regiões que não ligam cálcio, correspondentes às extremidades polares das moléculas de κ -caseína, estão representadas a negro: P - fosfato; Ca - cálcio; Cit - citrato. **(C)** Formação de uma micela. À medida que a curvatura da micela diminui, com o aumento do seu tamanho, menor oportunidade há para a ligação entre submicelas.



O fabrico do queijo envolve a adição de enzimas proteolíticas ao leite para formar a coalhada. As enzimas mais utilizadas são a quimosina (EC 3.4.23.4), também denominada renina, obtida do quarto estômago dos animais ruminantes, algumas proteases de fungos (essencialmente de espécies de *Mucor*), a pepsina de porco e as cardosinas da flor do cardo.

A renina catalisa especificamente a hidrólise de uma única ligação peptídica na κ -caseína, a ligação que une os resíduos 105 e 106:



Esta reacção corta a κ -caseína em dois fragmentos polipeptídicos:

- a) O segmento C-terminal da κ -caseína, que representa um terço da sua molécula, é denominado macropéptido da κ -caseína e fica no soro. É fortemente aniónico e contém as cadeias oligossacarídicas.
- b) Os restantes dois terços da molécula, a para- κ -caseína, são fortemente hidrófobos e permanecem na constituição da submicela. A perda dos resíduos oligossacarídicos na κ -caseína significa que se podem agora estabelecer ligações cruzadas fortes entre as submicelas, com o conseqüente crescimento indefinido das micelas e a resultante formação rápida da coalhada. A coalhada deve ser mantida durante várias horas, durante as quais aumenta a acidificação produzida por microrganismos, o que confere uma firmeza apropriada à coalhada.

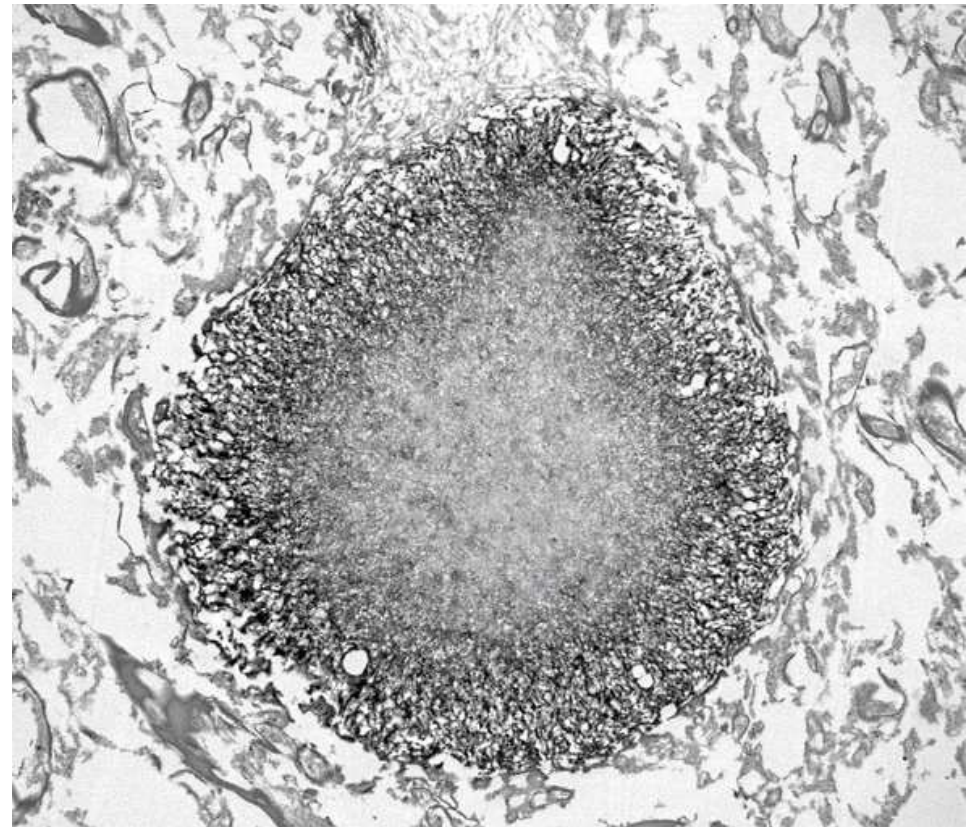
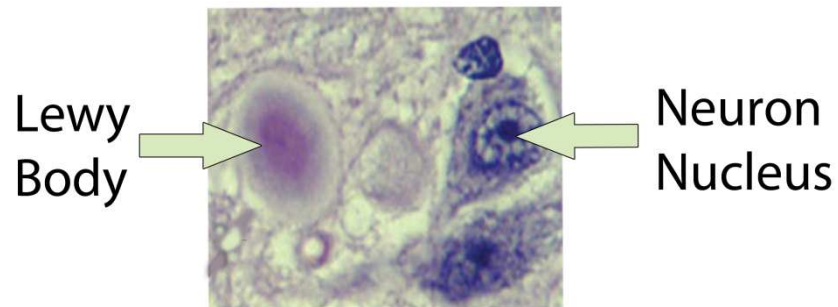
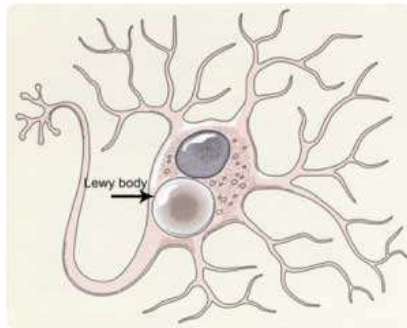
Packaging of the seed storage proteins inside the legume protein storage vacuoles - Electrostatic interactions

The Ca and/or Mg induced self-aggregation of soybean seed storage proteins with Nigari® (calcium and magnesium carbonates) leading to TOFU.

Proposed mechanism for the release of the storage proteins during germination.

Lewy bodies (Parkinson's Disease) - Covalent bonds

Covalent aggregates between α -synuclein and ubiquitin, a characteristic biochemical hallmark of Parkinson's disease in neuronal cells.

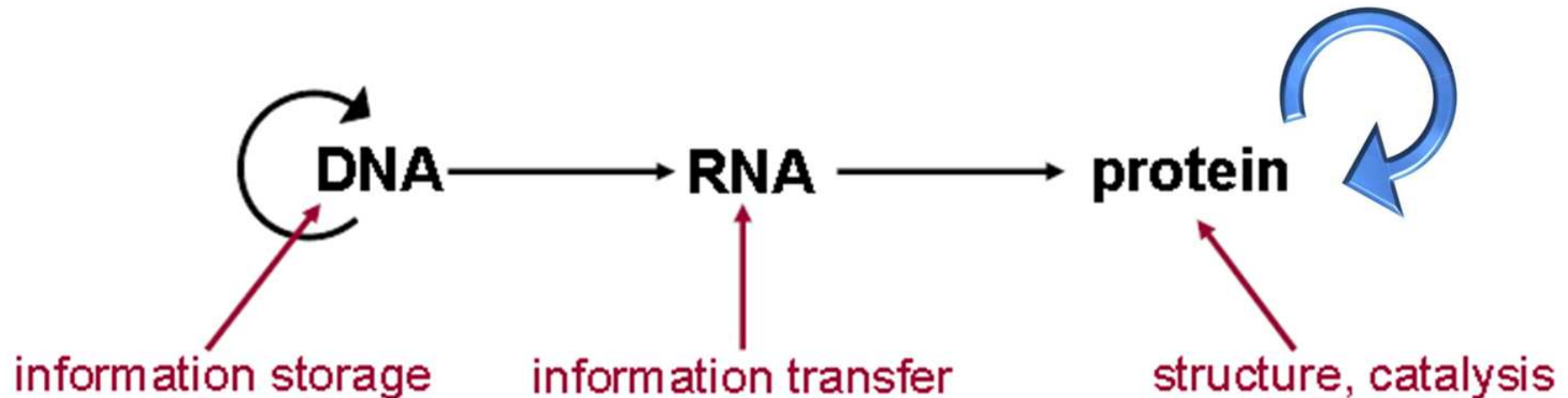


Transmission electron micrograph of a pathological inclusion, Lewy body, from the brain of a Parkinson disease patient. Prepared from a formalin fixed paraffin section. (Kunihiro Uryu and John Trojanowski of the University of Pennsylvania)

For all these reasons, cells are under permanent surveillance by the proteolytic systems

In eukaryotic cells, the ubiquitin-proteasome pathway assumes a primordial importance.

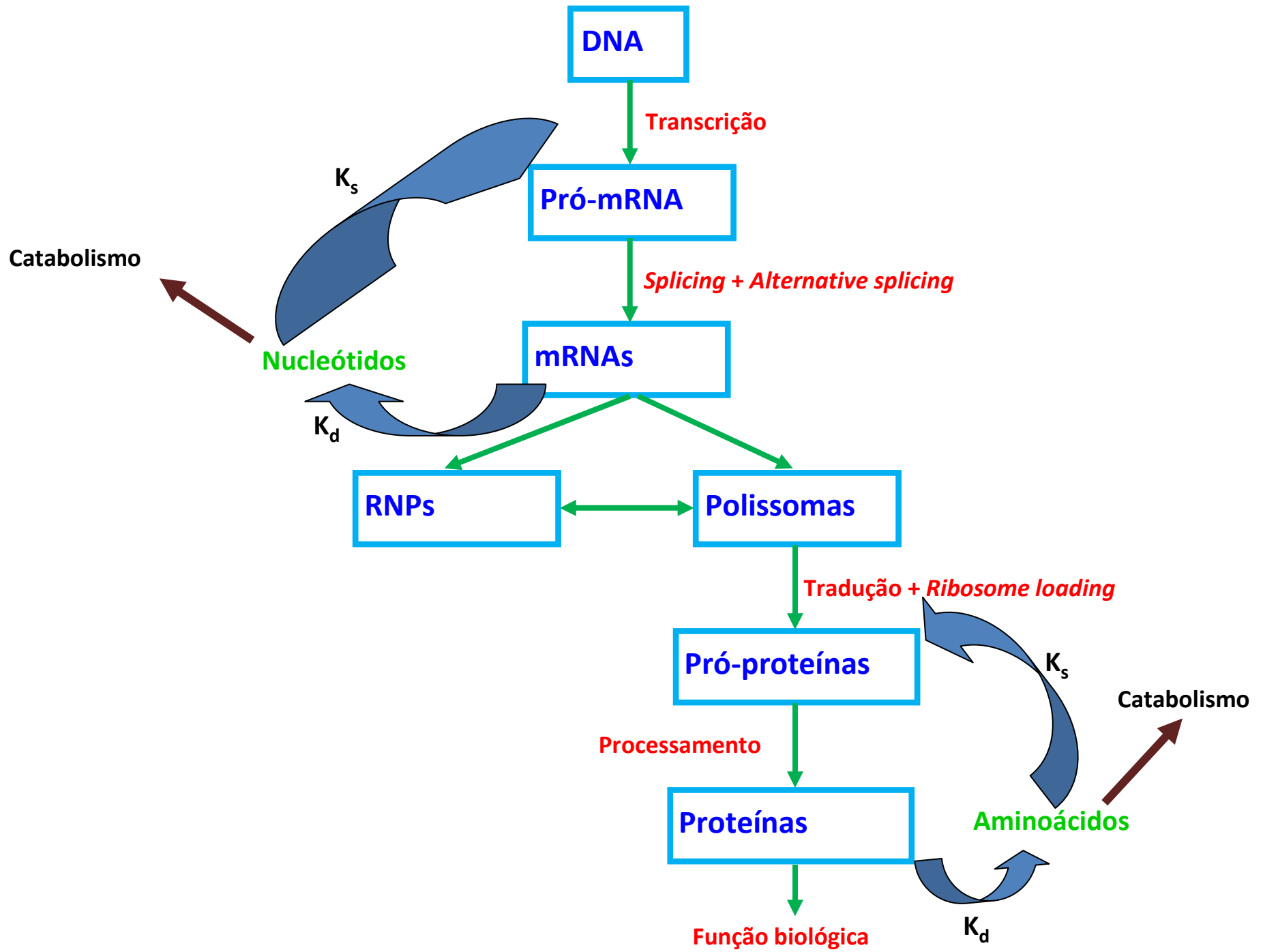
Ultimately, these processes may be regarded as information passed on between proteins.



Do prions and other protein aggregation processes invalidate the Central Dogma for Molecular Biology?

2.

Do Genoma ao Metaboloma



O **genoma** é a sequência completa de DNA de um organismo.

A palavra genoma foi formada por analogia com cromossoma, a qual deriva das palavras Gregas cor + corpo (na realidade, se esta palavra tivesse sido bem formado, teria sido cromatossoma).

Devido ao enorme sucesso dos projectos biológicos quantitativos de larga escala, tais como a sequenciação de genomas, o sufixo “-oma” tem sido utilizado num número crescente de outros contextos.

A **genómica** é o estudo das funções e interacções dos genes de um genoma.

Temos, assim:

gene	genoma	genómica
transcrito	transcritoma	transcritómica
proteína	proteoma	proteómica
lectina	lectinoma	lectinómica
interacções proteína-proteína	interactoma	interactómica
metabolito	metaboloma	metabolómica
glícidos	glicoma	glicómica
resíduos oligossacarídicos constituintes de glicoproteínas e de glicolípidos exteriores à membrana celular	exoglicoma	exoglicómica

O **transcritoma** é o conjunto total de todos os mRNAs da célula que são transcritos sob uma determinada condição fisiológica e ambiental, tendo em consideração a abundância de cada um e, idealmente, incorporando os resultados do *splicing*. Corresponde ao conjunto dos produtos que resultam da transcrição, em dado momento, das sequências codificantes do genoma.

O **proteoma** é o conjunto de proteínas expressas por um determinado tipo de célula ou organismo, num dado estado fisiológico. Não toma em consideração a abundância de cada uma. A **proteômica** é o estudo das proteínas expressas pelo genoma. O genoma e o proteoma estão intimamente interligados pelos mecanismos complexos da transcrição e da tradução, o que inclui o processamento do mRNA (*splicing* alternativo) e o enrolamento e as modificações pós-tradução das proteínas para aquisição da sua estrutura nativa.

O **translatoma** é o conjunto total das proteínas da célula expressas num dado momento, tendo em consideração a abundância de cada uma.

O **metaboloma** refere-se ao conjunto completo de metabolitos (sejam eles **metabolitos primários** ou **metabolitos secundários**) que se encontram numa amostra biológica, como, por exemplo, um organismo.

Ao contrário do genoma (sequências de nucleótidos), transcritoma (mRNAs) e proteoma (proteínas), não é possível estudar o conjunto completo de metabolitos, dada a enorme diversidade das suas naturezas químicas. Recorre-se muitas vezes, por isso, a um estudo comparativo entre os perfis de determinados metabolitos de uma célula, tecido, órgão ou organismo sujeito a duas condições distintas – a **metabonômica**.

O conceito de genoma é estático, enquanto que os de transcritoma, proteoma, translatoma e metaboloma são dinâmicos, mudando continuamente em resposta a estímulos internos e externos e, no caso dos organismos pluricelulares, com o tecido considerado.

One Genome – Two Proteomes



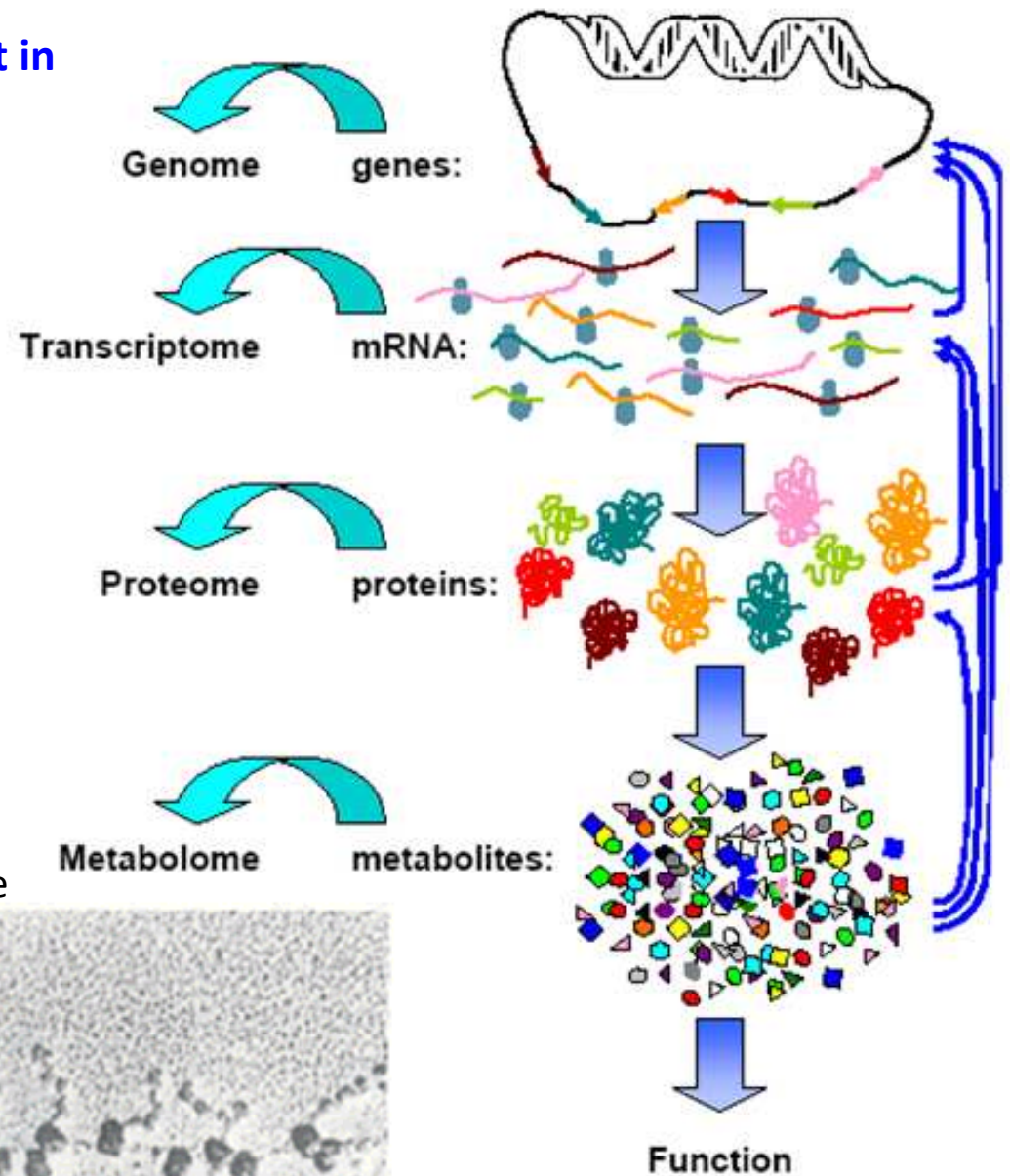
Genome *versus* Proteome

Same genome, different transcriptomes, proteomes and metabolomes

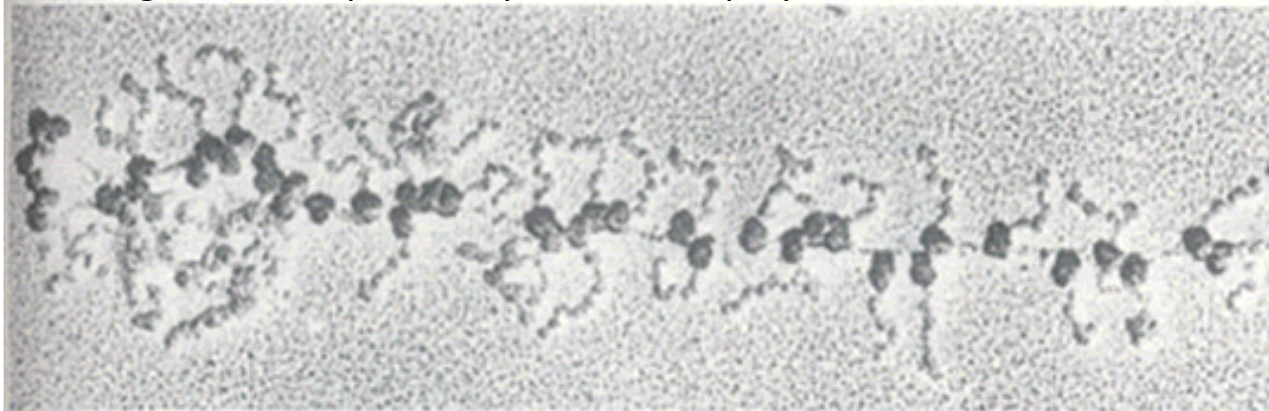


Any active interaction between cells or between a molecule and a cell will result in an “-omics” alteration

- Genomics;
- Transcriptomics;
- Proteomics;
- Interactomics;
- Lectinomics;
- Metabolomics/Metabonomics;
- Glycomics;
- Exoglycomics.



EM image of active protein synthesis in a polysome



Protein Modifications

More than 500 different amino acid side chain modifications which may be involved in important functions of the cell

- Phosphorylation

- Glycosylation

- N-terminal modifications (e.g. Acetylation)

- Disulphide bonds

- Lipid anchors

- Other side chain modifications

- Synthetic modifications

- Changes in rigid 3D-protein structure

=> These modifications may cause differences in protein isolation and separation

“Degrees of Freedom” for Protein Variability

Covalent Modifications in Proteins

- **Post-translational modifications (e.g., phosphorylation, glycosylation, etc.)**
 - more than 200 such modifications are known, and they can occur at multiple sites in a single protein
- **Alternative splicing of a primary transcript**
 - in extreme cases, a single gene can produce tens of thousands of different mRNAs!
- **Proteolytic processing**
- **Protein aging**

Thus, there are probably many *millions* of different proteins in our bodies!!

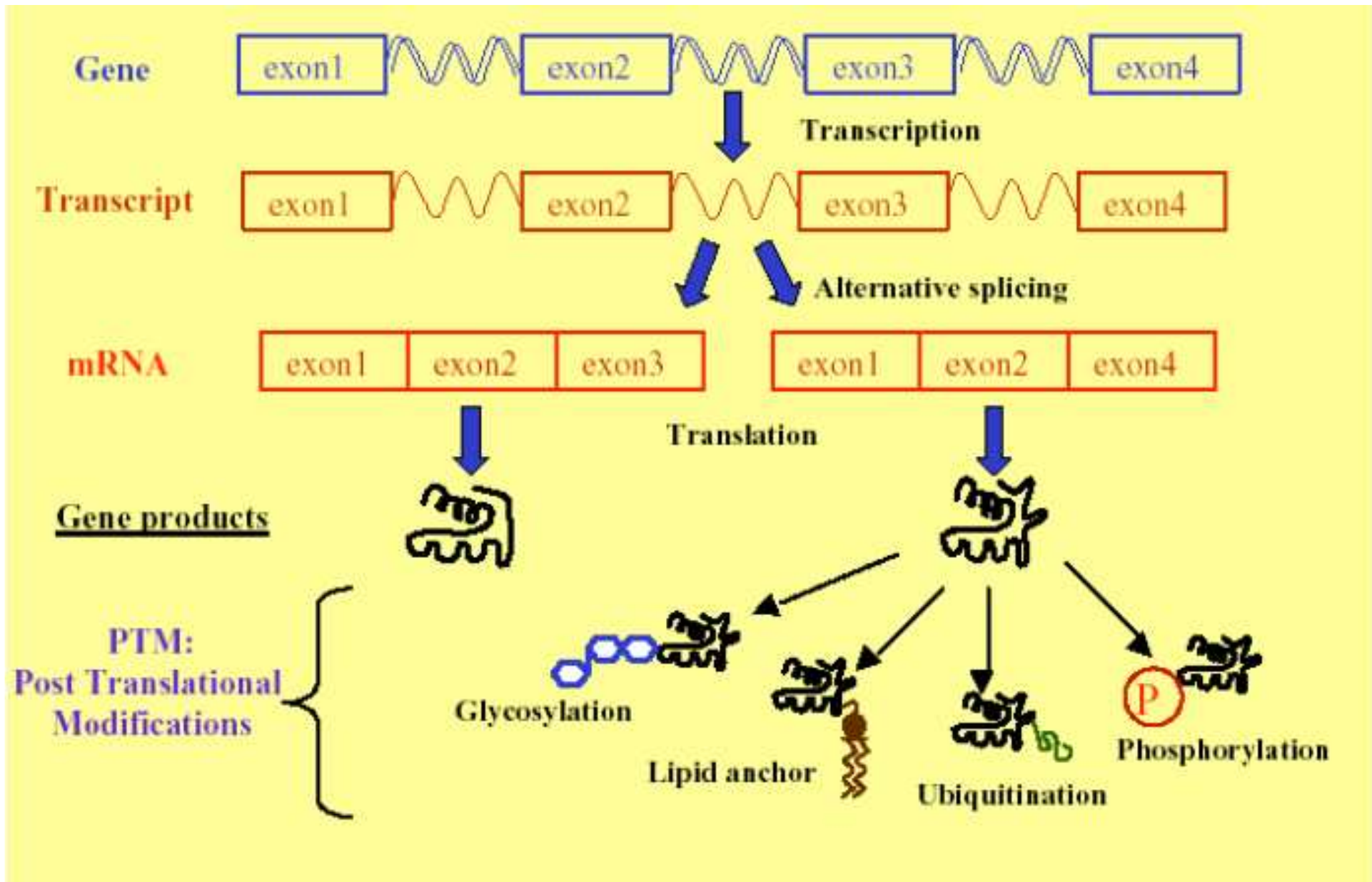
More Reality for Proteins

- **They have “personalities”**: each behaves differently
- **They exist in different concentrations, ranging over a million-fold**
- **It will be extremely difficult to even identify them all (see previous slide)**

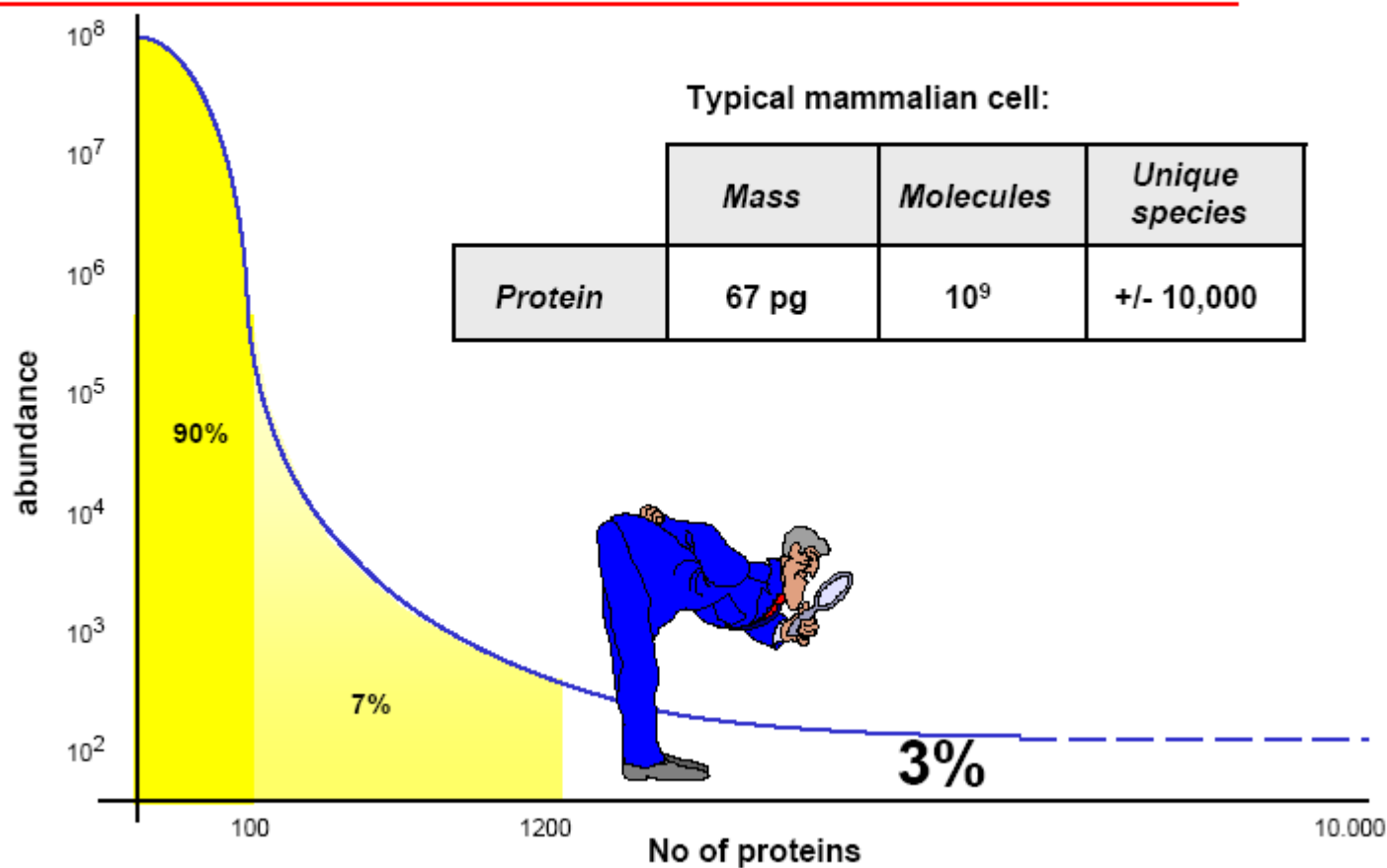
Take-home message:

Proteomics presents challenges that are orders-of-magnitude more difficult than those presented by genomics!

Genome *versus* Proteome



Protein Abundance - the real challenge



3.

Vias metabólicas.

Anabolismo e Catabolismo

Conceitos fundamentais sobre Bioquímica do Metabolismo

- O que é a Bioquímica do Metabolismo (*versus* Bioquímica Estrutural)?
- Metabolismo:
 - Metabolismo primário e metabolismo secundário;
 - Metabolitos primários e metabolitos secundários;
 - Anabolismo e catabolismo.
- Vias metabólicas
 - Anabólicas, catabólicas e anfibólicas;
 - Lineares, cíclicas, em espiral, ramificadas divergentes e ramificadas convergentes;
 - Funções: metabolitos intermediários.

What is meant by OXIDATION and REDUCTION?

These two concepts often give students a great deal of trouble. Oxidation and reduction reactions (also known as REDOX reactions) are always coupled in biological systems.

Put quite simply, **oxidation reactions release energy**.

De acordo com esta teoria, a molécula de água libertaria energia ao ser oxidada, ao contrário do que se verifica nas reacções fotoquímicas da fotossíntese! – ver slides da aula nº 11.

Compounds that contain the greatest amount of stored chemical energy are hydrocarbons such as fats and lipids. In biological systems, oxidation typically involves:

- the loss of hydrogen atoms (equivalent to protons) from a substrate;
- loss of hydrogen atoms are known as dehydrogenation reactions;
- electrons are typically lost together with hydrogen atoms;
- the addition of oxygen is also termed oxidation.

An "**oxidized**" molecule has given up energy. For example, the energy carrier molecule NAD^+ , is an energy-deficient form of an electron carrier as it has given up a hydrogen and two electrons.

Reduction reactions harness chemical energy

Reduction involves:

- the gain of electrons and hydrogen atoms by a substrate. This is what confuses people; how can a gain of something be termed "reduction?" The answer is that: the loss of oxygen is also termed reduction;
- a "reduced" molecule is energy rich. For example, NAD⁺ picks up 2 energetic electrons and a hydrogen atom.

These reactions are always coupled since the electrons lost from an oxidized molecule have to be transferred to another molecule. A source of electrons, or electron donor, is referred to as a **reducing agent**, while the electron acceptor is the **oxidizing agent** as it oxidizes some other molecule and becomes reduced in so doing.

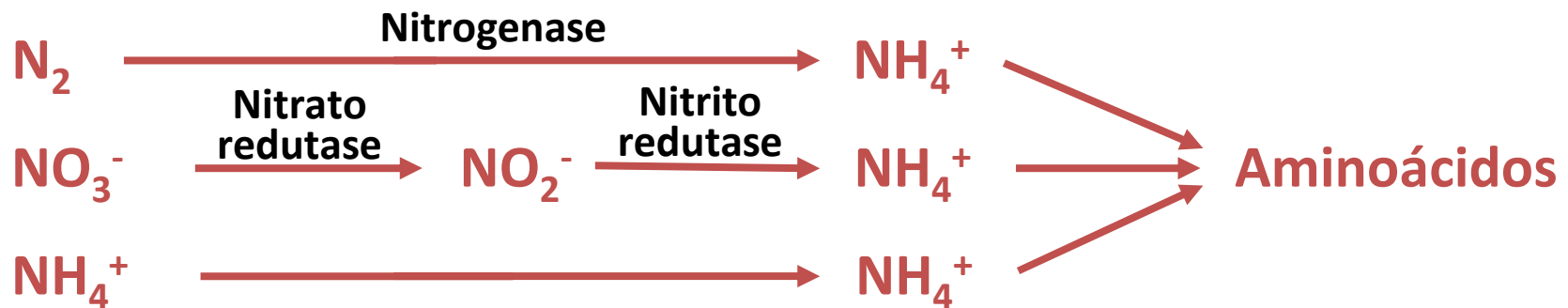
De acordo com esta teoria, a molécula de água, resultante da redução do oxigénio, deveria ser rica em energia! – ver slides da aula nº 11.

Assimilação do carbono, do azoto e do enxofre

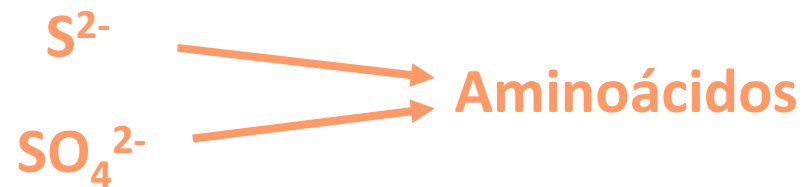
- Definição
- Quem é responsável?
- Assimilação do carbono:

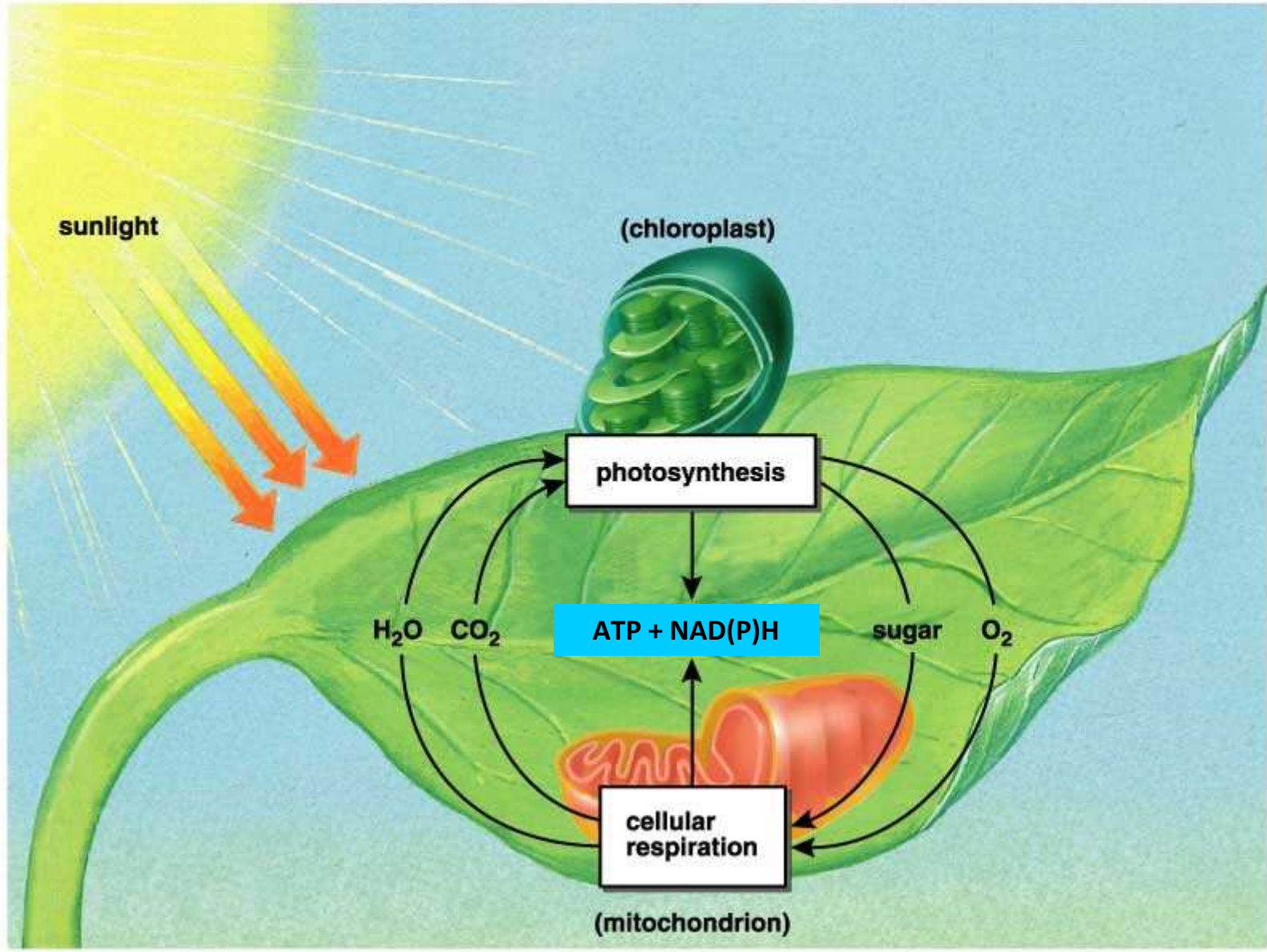


- Assimilação do azoto:

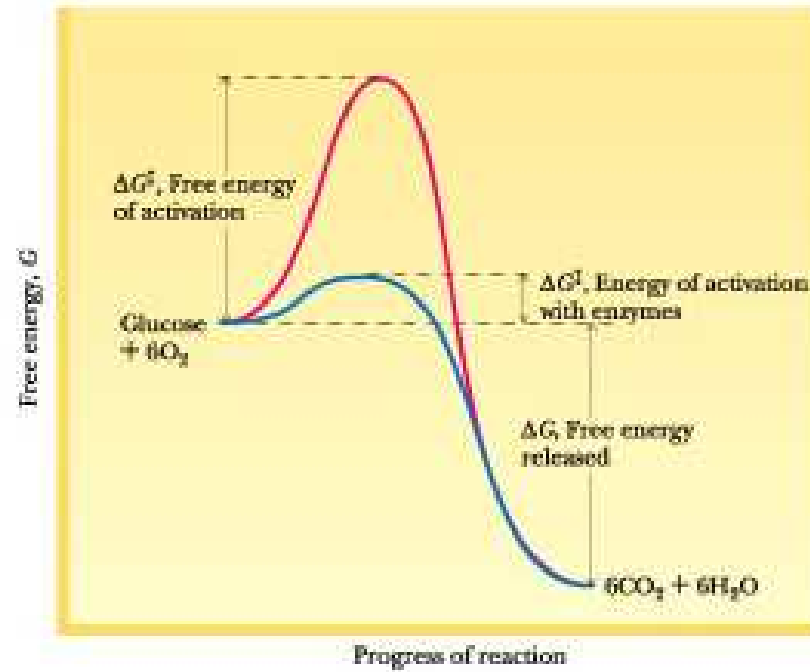


- Assimilação do enxofre:





Respiration \longleftrightarrow Photosynthesis



ORGANISMOS FOTOSSINTÉTICOS (em geral, autotróficos)

Fotossintetizam para quê?

Para obterem os materiais de que necessitam para crescer:

PRINCIPAIS FUNÇÕES DA FOTOSSÍNTESE:

- I - Obter energia (ATP) a partir da luz do Sol;
- II - Obter potencial redutor (NADPH) a partir da água e da luz do Sol;
- III - Obter esqueletos carbonados (hidratos de carbono) sintetizados a partir do CO_2 atmosférico e do ATP e NADPH produzidos na fotossíntese.

ORGANISMOS NÃO-FOTOSSINTÉTICOS (em geral, heterotróficos)

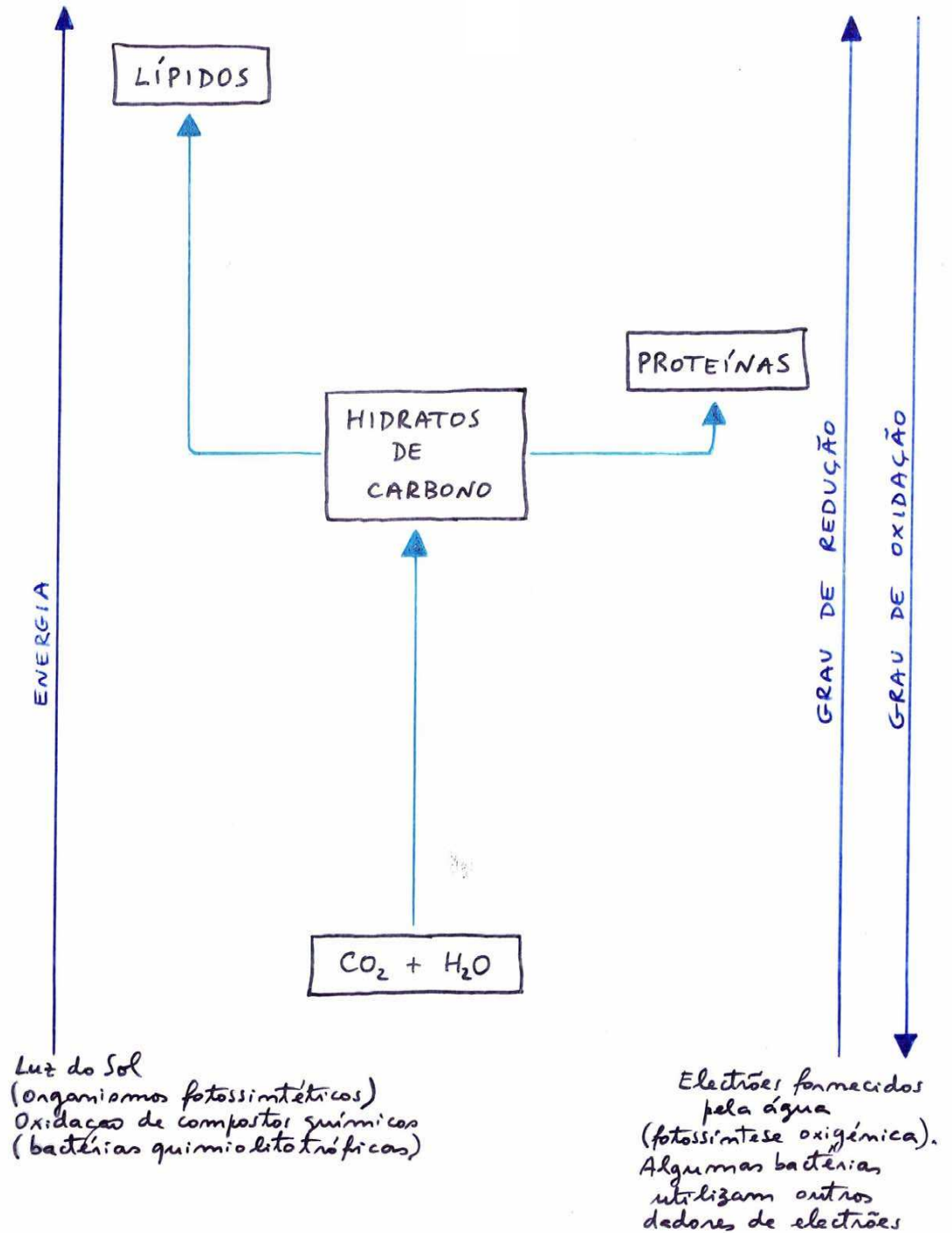
Obtêm os hidratos de carbono directa ou indirectamente da ingestão de organismos fotossintéticos

Respiram para quê?

Para obterem os materiais de que necessitam para crescer:
PRINCIPAIS FUNÇÕES DA RESPIRAÇÃO

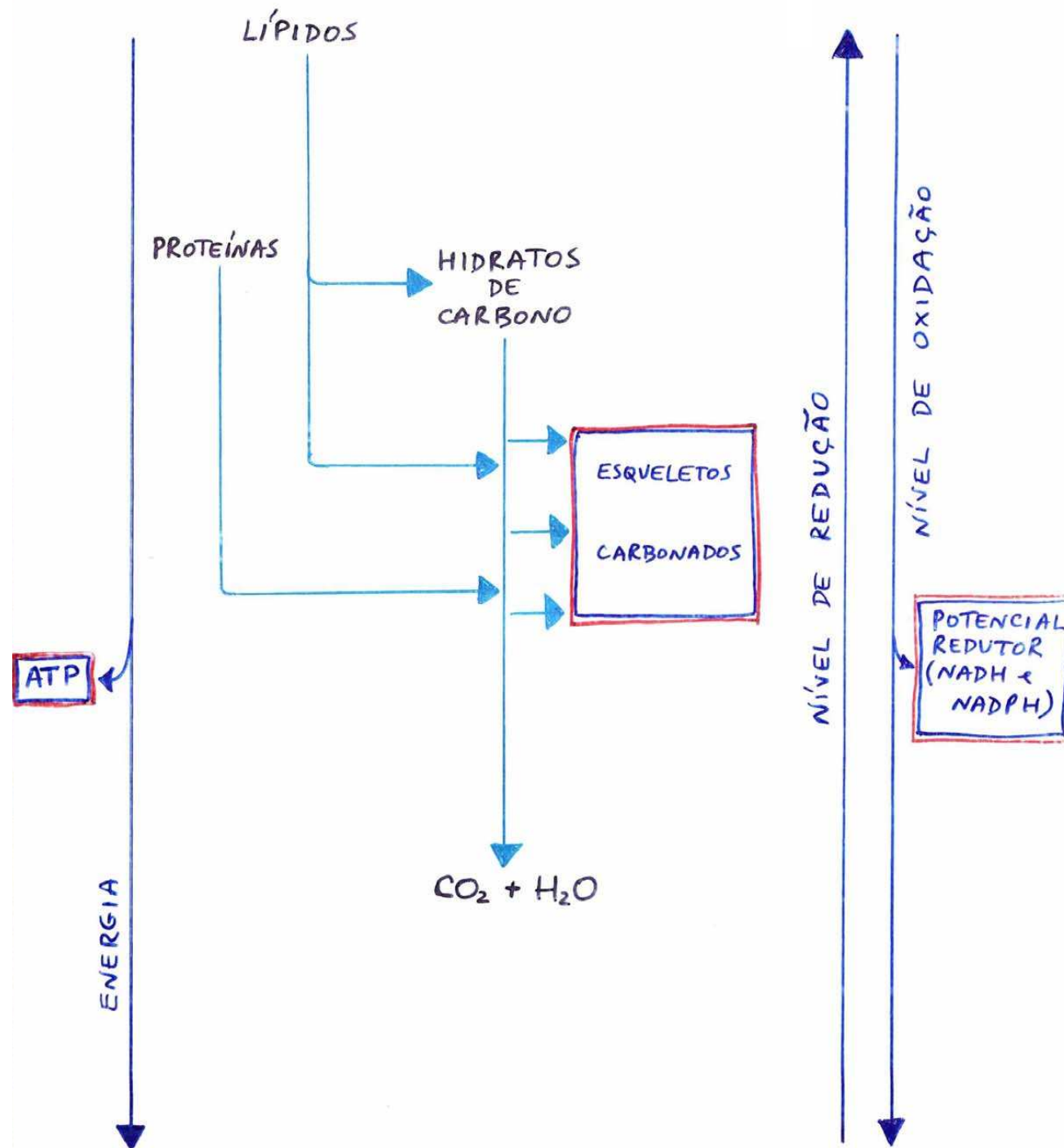
- I - Obtenção de energia (ATP);
- II - Obtenção de potencial redutor (NADH);
- III - Obtenção de esqueletos carbonados.

Vias Redutivas: Fotossíntese e Quimiossíntese





Vias Oxidativas: Respiração



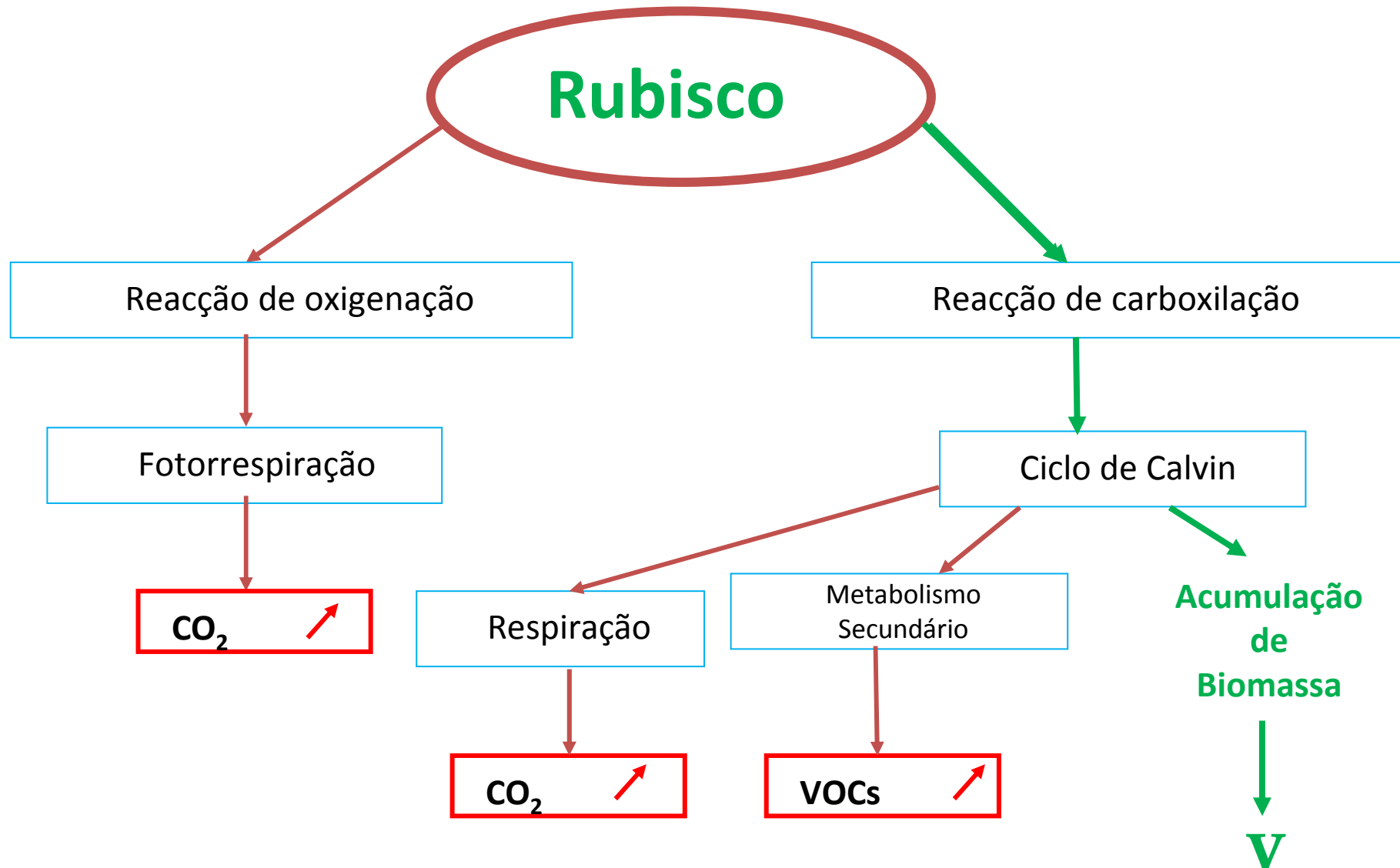
Organisms may be organized into groups based upon their nutritional and metabolic needs which are extremely diverse. Traditionally, these groupings have been based on two main criteria:

- The nature of the energy source;
- The nature of the carbon source used for building organic, biological macromolecules.

<p>Chemoheterotrophs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carbon source: from organic compounds made by other organisms • Energy source: from oxidation of organic compounds • Examples: most bacteria, protozoa, all fungi and animals •
<p>Chemoautotrophs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carbon source: CO₂ • Energy source: oxidize inorganic compounds which are used to fix CO₂ • Examples: nitrifying, hydrogen, sulfur and iron-utilizing bacteria. Archaea which live among hydrothermal ocean vents
<p>Photoheterotrophs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carbon source: from organic compounds made by other organisms • Energy source: light • Examples: green and purple nonsulfur bacteria
<p>Photoautotrophs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carbon source: CO₂ • Energy source: light • Examples: cyanobacteria, green and purple sulfur bacteria, algae, plants.

Acumulação de biomassa no planeta

Actividade catalítica da Rubisco versus acumulação de biomassa



4.

**A Termodinâmica
Dirige a Vida**

A importância da bioenergética

O funcionamento de uma célula é um processo essencialmente termodinâmico. **Reacções químicas e outros processos celulares ocorrem espontaneamente apenas se se processarem com um decréscimo de energia livre, isto é, com $\Delta G < 0$.**

São exemplos:

- A glucose é o monossacárido mais abundante da natureza;
- O isómero *trans* predomina nas ligações peptídicas;
- A conformação que uma molécula de glucose assume em solução;
- O enrolamento de um polipéptido para a conformação biologicamente activa de uma proteína;
- O funcionamento de uma enzima, com a sua extraordinária taxa de catálise. Por exemplo, uma só molécula de catalase consegue ligar-se a duas moléculas de peróxido de hidrogénio, fazê-las reagir, convertendo-as em água e oxigénio, e libertar os produtos, vários milhões de vezes em cada segundo:
$$\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$
- O funcionamento das vias metabólicas, como a glicólise, o ciclo de Krebs, a via dos fosfatos de pentose e a oxidação β dos ácidos gordos.
- O movimento dos electrões, de transportador em transportador, ao longo das cadeias de transporte de electrões do mitocôndrio e do cloroplasto.

Reacções químicas e outros processos celulares ocorrem espontaneamente apenas se se processarem com um decréscimo de energia livre, isto é, com $\Delta G < 0$ (exergónico).

Pode então perguntar-se como é que uma célula consegue levar a cabo um processo que ocorre com gasto de energia, isto é, com $\Delta G > 0$ (endergónico)?

BIOENERGÉTICA

A Termodinâmica dirige a Química e a Física que caracterizam todos os processos de todos os sistemas biológicos.

All biochemical reactions involve energy changes; thus the term 'bioenergetics' could validly be applied to the whole of life sciences.

Bioenergetics as a discipline rose to prominence in the 1950s as a highly directed search for the solution to the mechanism by which energy made available by the oxidation of substrates, or the absorption of light, could be coupled to 'uphill' reactions such as the synthesis of ATP from ADP and P_i , or the accumulation of ions across a membrane.

A espontaneidade que caracteriza a ocorrência de qualquer reacção ou processo biológico implica que este decorra com $\Delta G < 0$.

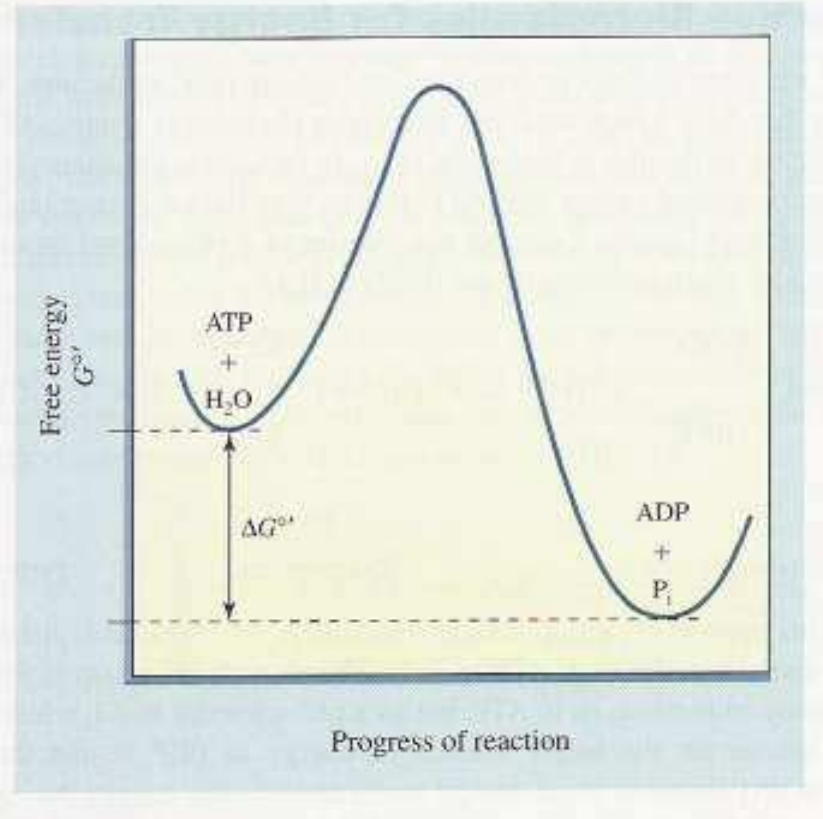
Consideremos o exemplo da reacção de hidrólise do ATP:



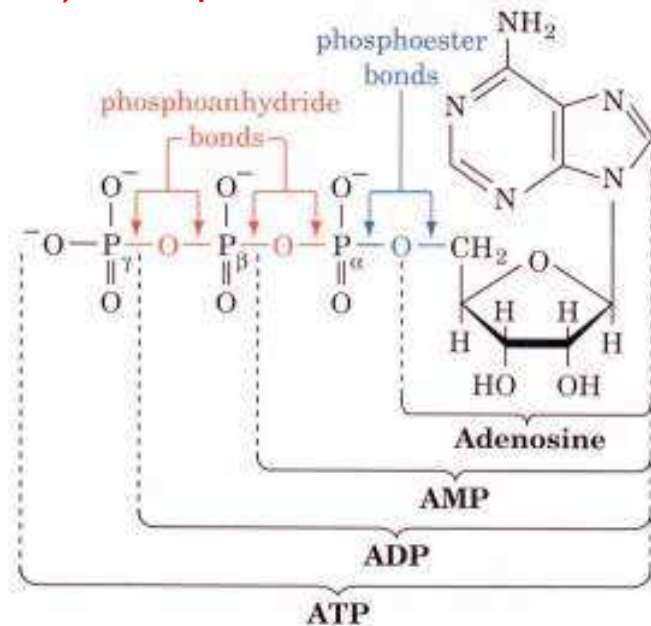
Reacção de hidrólise do ATP

Figure 14.12

Energy diagram for the reaction $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$. The $\Delta G^{\circ'}$ (standard free energy change) is a measure of the amount of energy that is released. That value is -30.5 kJ/mol . ATP is at a higher energy level than $\text{ADP} + \text{P}_i$; therefore, energy is released when the phosphoryl group is transferred in this case to H_2O .



$\Delta G^{\circ'} = 7,3 \text{ kcal/mol}$



- Reacção exergónica
- Energia livre de activação (hidrólise espontânea do ATP!)
- Catalisadores (efeito de proximidade e orientação)

Como é que as células conseguem sintetizar compostos mais ricos em energia do que aqueles que lhes dão origem?

Consideremos o caso da 1ª reacção da glicólise, a conversão da D-glucose em D-glucose-6-fosfato:



Questões:

- 1 – Qual o composto mais rico em energia, glucose ou glucose-6-fosfato?
- 2 – O valor da constante de equilíbrio (K_{eq}) é igual a 1 ou muito maior, maior, menor ou muito menor do que 1?
- 3 – O valor da variação de energia livre padrão (ΔG°) é igual a zero ou muito maior, maior, menor ou muito menor do que zero?

Respostas das questões do slide anterior:

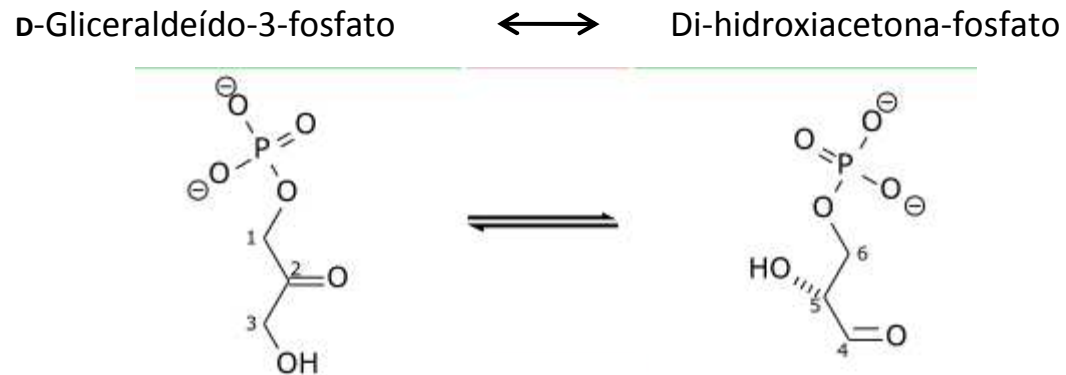
1 – A glucose-6-fosfato

2 – É muito menor do que 1; $K_{eq} = 10^{-5,65} = 2,24 \times 10^{-6}$

3 - $\Delta G^{0'} = +14 \text{ kJ/mol} = 3,3 \text{ kcal/mol}^*$

*A caloria é a quantidade de energia necessária para elevar a temperatura de 1 g de água de 14 para 15 °C. Varia, por isso, com a temperatura da água. Por este motivo, é preferível a utilização do Joule (J), a unidade do Sistema Internacional (SI). Considera-se que, em termos médios, 1 cal = 4,184 J

Consideremos agora o caso da reacção de interconversão de dois compostos com o mesmo nível de redução, isto é, com sensivelmente o mesmo conteúdo em energia, os ésteres fosfóricos dos dois açúcares mais simples, os dois fosfatos de triose:



Questões:

1 – Espera que o valor da constante de equilíbrio (K_{eq}) seja igual a 1 ou muito maior, maior, menor ou muito menor do que 1?

2 – E o valor da variação de energia livre padrão, $\Delta G^{0'}$, será próximo de zero ou muito maior, maior, menor ou muito menor do que zero?

Sabendo que, no equilíbrio, a proporção de di-hidroxiacetona-fosfato para D-gliceraldeído-3-fosfato é de 96% para 4%, calcule

3 – O valor da constante de equilíbrio (K_{eq})?

4 – Qual o composto mais rico em energia, o D-gliceraldeído-3-fosfato ou a di-hidroxiacetona-fosfato?

Respostas das questões do slide anterior:

- 1 – Próximo de 1.
- 2 – Não muito diferente de zero.
- 3 – 24.
- 4 – O D-gliceraldeído-3-fosfato.

É aqui que assumem um papel fundamental as **enzimas**, catalisadores biológicos que têm a capacidade de acoplar mais do que uma reacção química.

Isto é, as enzimas têm a capacidade de catalisar uma reacção exergónica (isto é, com $\Delta G^{0'}_1 < 0$) e conseguem transferir parte* desta energia para “fazer funcionar” uma reacção endergónica (isto é, com $\Delta G^{0'}_2 > 0$), desde que

$$|\Delta G^{0'}_1| > |\Delta G^{0'}_2| \quad \text{ou} \quad \Delta G^{0'}_1 + \Delta G^{0'}_2 < 0$$

* Não há processos com eficiência energética de 1! Parte da energia é inevitavelmente libertada sob a forma de calor e/ou para aumentar a entropia do sistema.

Assim, no caso particular da hexocinase, a enzima que catalisa a 1ª reacção da glicólise:

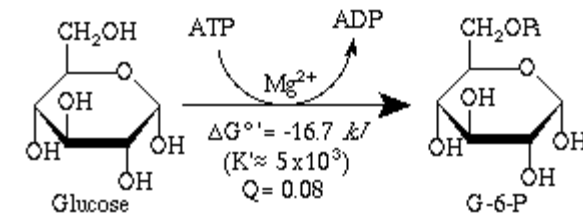
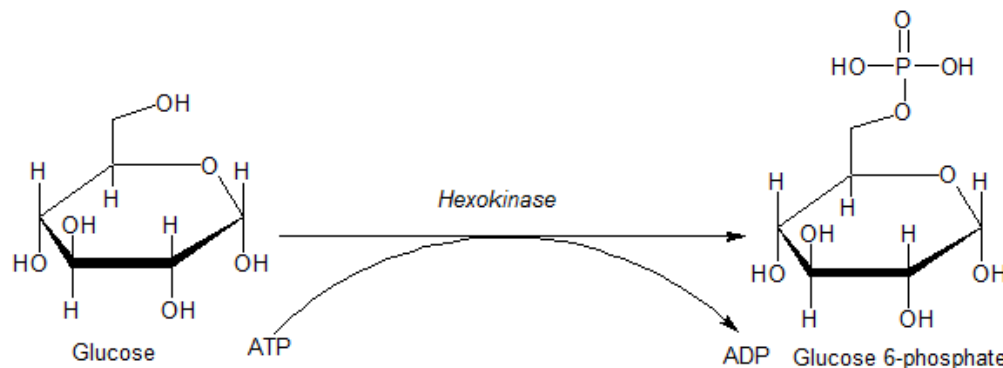
For example, in the reaction catalyzed by the Glycolysis enzyme **Hexokinase**, the half-reactions are:



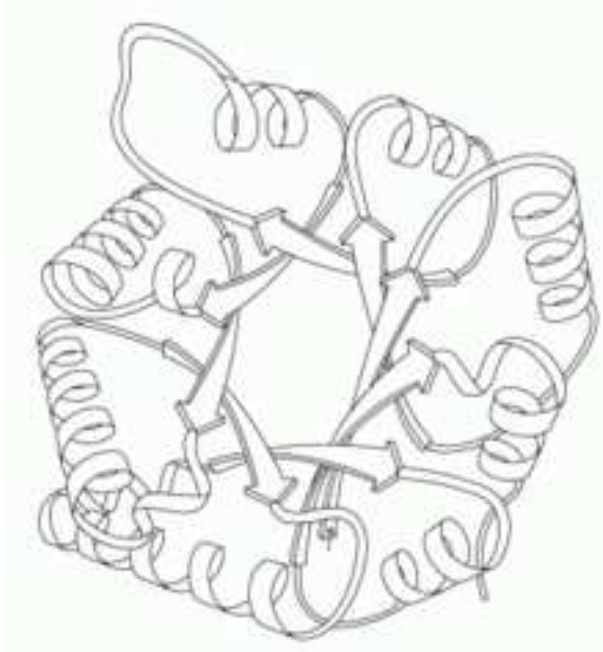
Coupled reaction:



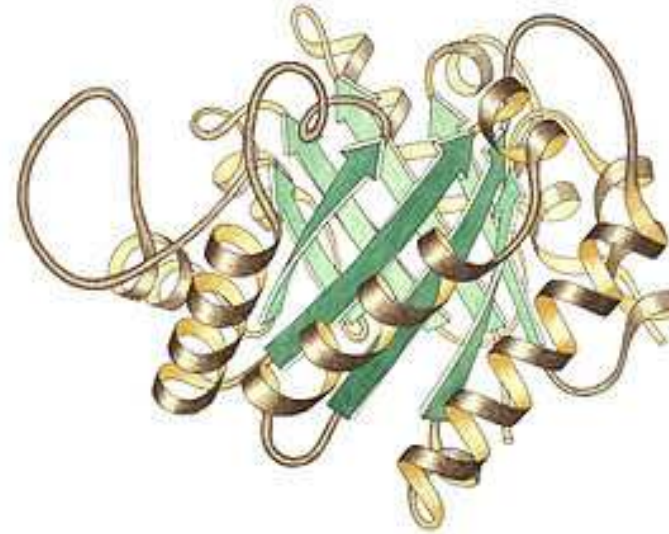
The structure of the enzyme active site, from which H_2O is excluded, prevents the individual hydrolytic reactions, while favoring the coupled reaction.



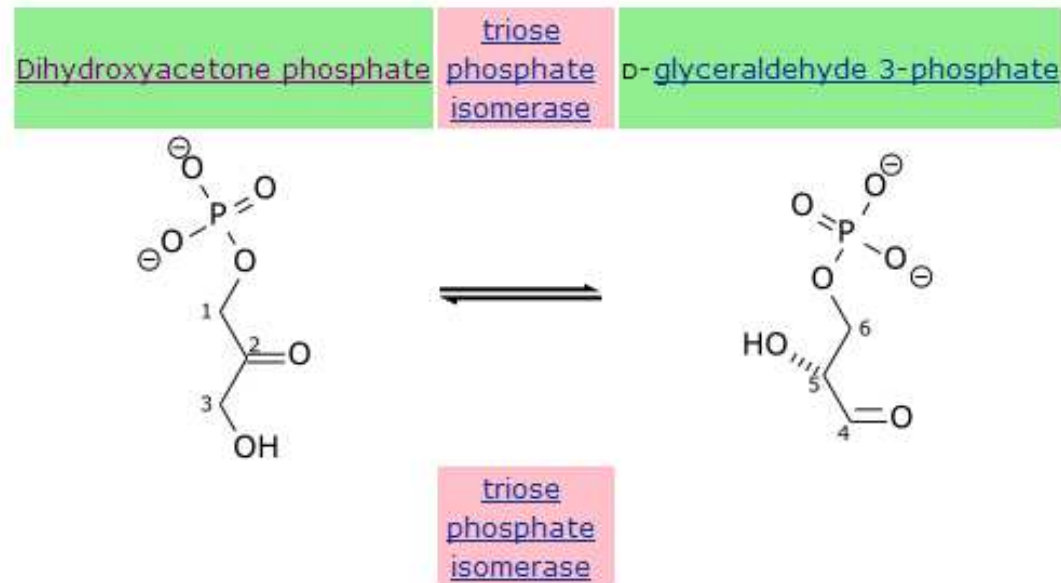
O caso da triose-fosfate isomerase (TPI or TIM; E.C.5.3.1.1), a enzima que catalisa a interconversão reversível entre os dois isómeros funcionais, as duas trioses-fosfato, o D-gliceraldeído-3-fosfato e a di-hidroxiacetona-fosfato.



The structure of human TPI. Top view of triosephosphate isomerase monomer, active site at top center.



The structure of human TPI. Side view of triosephosphate isomerase monomer, active site at top center.



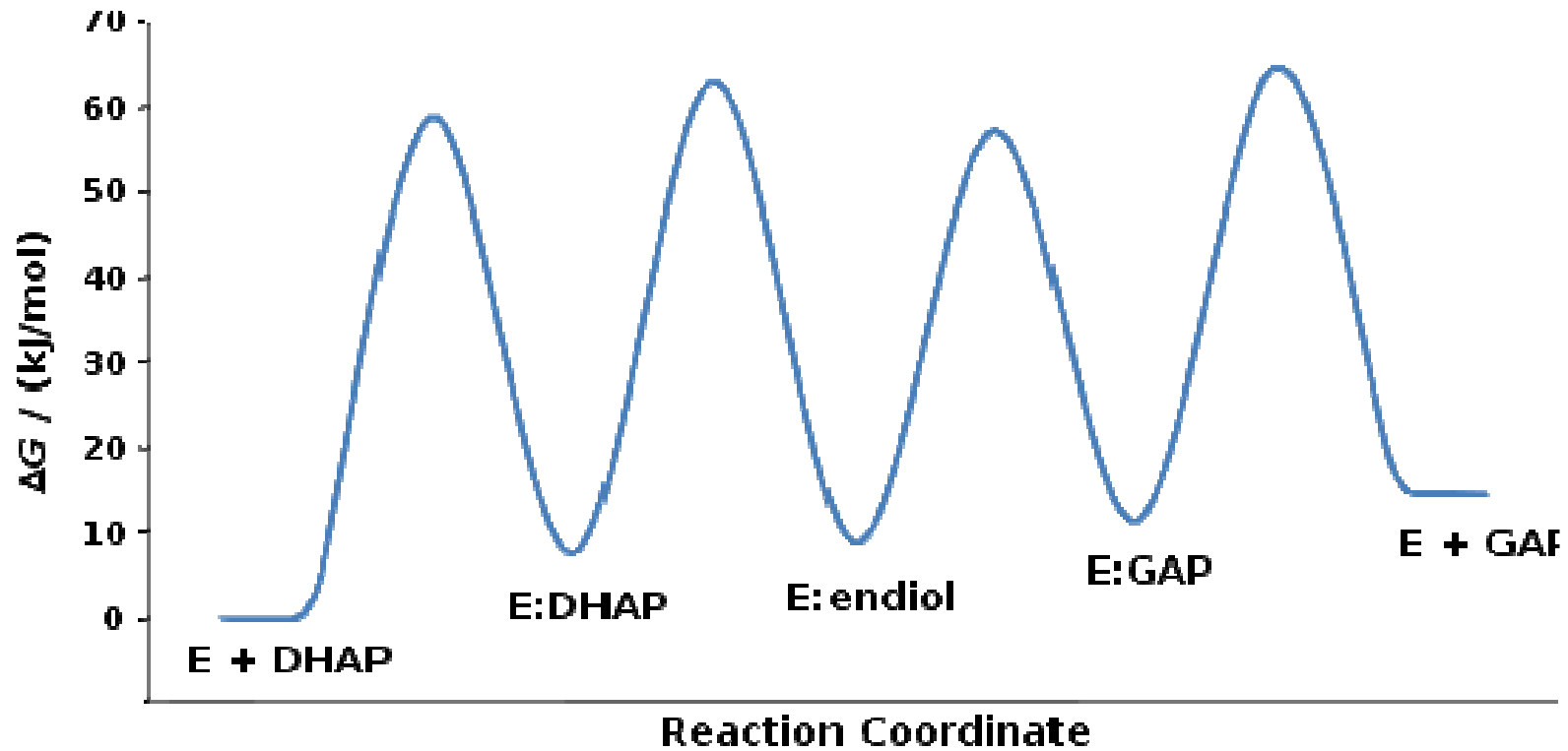
TPI plays an important role in glycolysis and is essential for efficient energy production. TPI has been found in nearly every organism searched for the enzyme, including animals such as mammals and insects, as well as in fungi, plants and bacteria. However, some bacteria that do not perform glycolysis, like ureaplasmas, lack TPI.

In humans, deficiencies in TPI are associated with a progressive, severe neurological disorder called triose phosphate isomerase deficiency.

Triose phosphate isomerase is a highly efficient enzyme, performing the reaction billions of times faster than it would occur naturally in solution. **The reaction is so efficient that it is said to be catalytically perfect:** it is limited only by the rate the substrate can diffuse into the enzyme's active site.

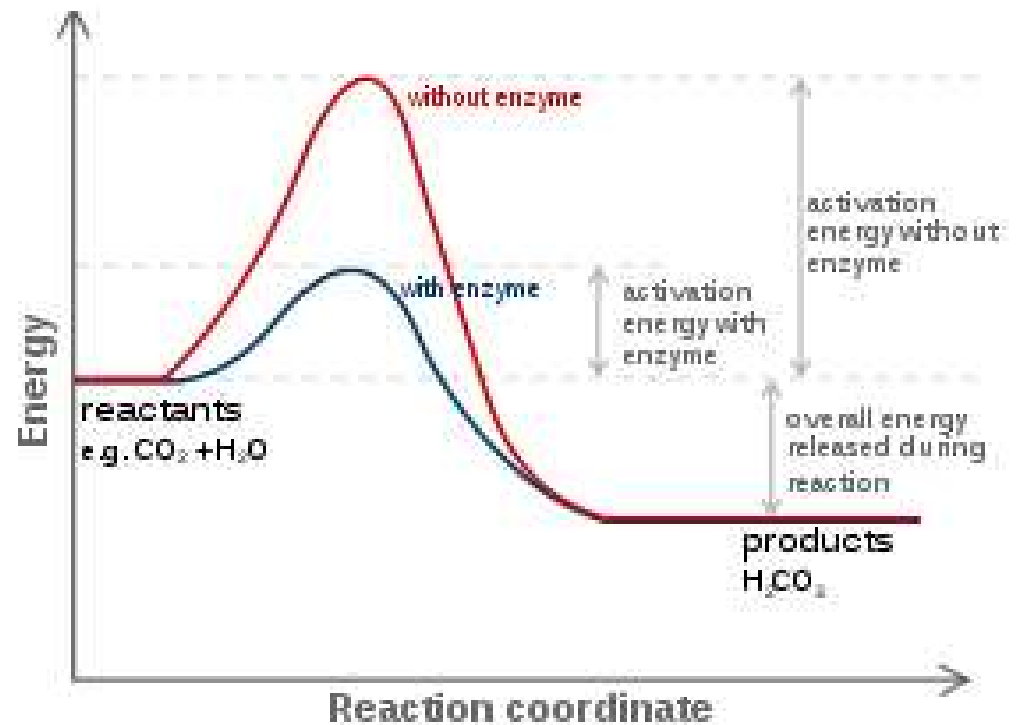
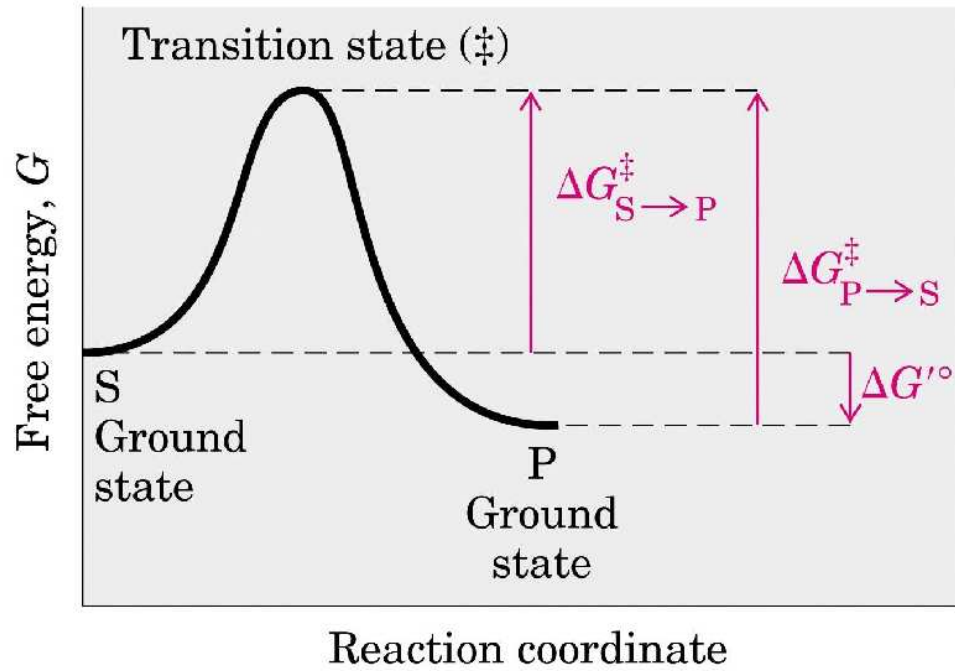
Mechanism

The mechanism involves the intermediate formation of an "enediol". The changes in free energy for each step, including the transition states, have been calculated, and are displayed in the figure.



Energy coupling

- ◆ A spontaneous reaction may drive a non-spontaneous reaction.
 - ◆ **Free energy changes** of coupled reactions are **additive**.
- A.** Some enzyme-catalyzed reactions are interpretable as **two coupled half-reactions**, one spontaneous and the other non-spontaneous.
- ◆ At the enzyme active site, the coupled reaction is kinetically facilitated, while individual half-reactions are prevented.
 - ◆ Free energy changes of half reactions may be summed, to yield the free energy of the coupled reaction.



As quatro equações fundamentais da Bioenergética

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

Comentar:

- O grau de entropia das moléculas de água na água pura
- A sensação de frio que se sente ao sair da água
- O enrolamento de uma cadeia polipeptídica para a sua conformação nativa ou seja, a que possui actividade biológica

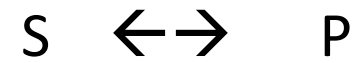
Seja uma reacção química do tipo $S \leftrightarrow P$

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + R T \ln [P] / [S] \quad (2)$$

Comentar:

- O conceito de ΔG
- O conceito de $\Delta G^{0'}$ e sua relação com K_{eq}

No ponto de equilíbrio de uma reacção química do tipo



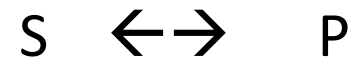
vem que

$$\Delta G = ?$$

e

$$[P] / [S] = ?$$

No ponto de equilíbrio de uma reacção química do tipo



vem que

$$\Delta G = 0$$

e

$$[P] / [S] = K_{eq}$$

de onde se tira que

$$\Delta G^{0'} = - R T \ln K_{eq} \quad (3)$$

Ou seja, uma vez que R , T e K_{eq} podem ser consideradas constantes se forem mantidas determinadas condições experimentais, $\Delta G^{0'}$ e K_{eq} são constantes, matematicamente interconvertíveis, de cada reacção química:

Tabela – Relação entre K_{eq} e ΔG^0

K_{eq}	$\log_{10} K_{eq}$	$\Delta G^0 = - 1363 \log_{10} K_{eq}$ (cal)
0,001	-3	4089
0,01	-2	2726
0,1	-1	1363
1,0	0	0
10	1	-1363
100	2	-2726
1000	3	-4089

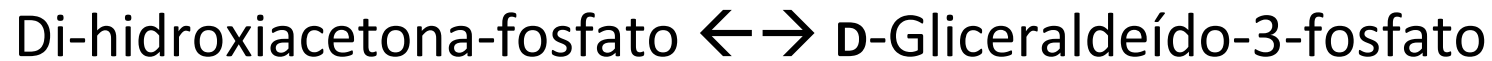
Voltando à reacção química do tipo $S \leftrightarrow P$

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + R T \ln [P] / [S] \quad (2)$$

Comentar:

- O que determina a ocorrência espontânea de uma reacção é $\Delta G < 0$, o que depende da soma algébrica de duas parcelas, $\Delta G^{0'}$ e $R T \ln [P] / [S]$
- estas parcelas podem assumir qualquer valor, desde que a sua soma seja negativa.

Considere-se o caso da reacção reversível da glicólise catalisada pela enzima triose fosfato isomerase (TIM):



No equilíbrio, as concentrações relativas de di-hidroxiacetona-fosfato e de gliceraldeído-3-fosfato são de 96% e de 4%, respectivamente.

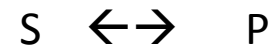
Por outras palavras, se partirmos de concentrações idênticas destes dois metabolitos, a reacção desloca-se da direita para a esquerda,

Ou seja, tem uma $K_{eq} \ll 1$

e um valor de $\Delta G^{0'} \gg 0$

Como é, então, possível para a glicólise continuar espontaneamente, sabendo que a reacção seguinte utiliza o gliceraldeído-3-fosfato?

Consideremos o exemplo da seguinte reacção reversível



Com um valor de $K_{eq} = 0,1$, a que corresponde um valor positivo de ΔG°

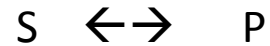
Tal como no caso anterior, se partirmos de 110 partes de S e de 110 partes de P,

- Em que direcção se processa a reacção ?

- Até que concentrações de S e P ?

.

Consideremos o exemplo da seguinte reacção reversível



Com um valor de $K_{eq} = 0,1$, a que corresponde um valor positivo de ΔG^0

Tal como no caso anterior, se partirmos de 110 partes de S e de 110 partes de P,

- Em que direcção se processa a reacção: **de P para S**

- Até que concentrações de S e P: **até S = 200 e P = 20, ou seja, até $K_{eq} = 0,1$**

Conclusão: O valor de ΔG , que determina o sentido em que se processa espontaneamente toda e qualquer reacção química, depende do valor da soma algébrica de uma constante da reacção (ΔG^0) com outra parcela, que é definida pelas concentrações actuais (i.e., nesse momento) dos reagentes e dos produtos da reacção.

Considere-se o caso da reacção reversível da glicólise catalisada pela enzima triose fosfato isomerase (TIM):



No equilíbrio, as concentrações relativas de di-hidroxiacetona-fosfato e de gliceraldeído-3-fosfato são de 96% e de 4%, respectivamente.

Por outras palavras, se partirmos de concentrações idênticas destes dois metabolitos, a reacção desloca-se da direita para a esquerda,

Ou seja, tem uma $K_{eq} \ll 1$

e um valor de $\Delta G^{0'} \gg 0$

Como é, então, possível para a glicólise continuar espontaneamente, sabendo que a reacção seguinte utiliza o gliceraldeído-3-fosfato.

De volta à reacção catalisada pela TIM, percebe-se agora como a glicólise pode continuar a operar espontaneamente. Admitindo que a reacção está em equilíbrio, como a reacção seguinte está continuamente a retirar o gliceraldeído-3-fosfato do meio, está a desfazer o equilíbrio, obrigando a reacção a deslocar-se no sentido da esquerda para a direita, ou seja, aquele a que corresponde um valor de $\Delta G^{0'} \gg 0$.

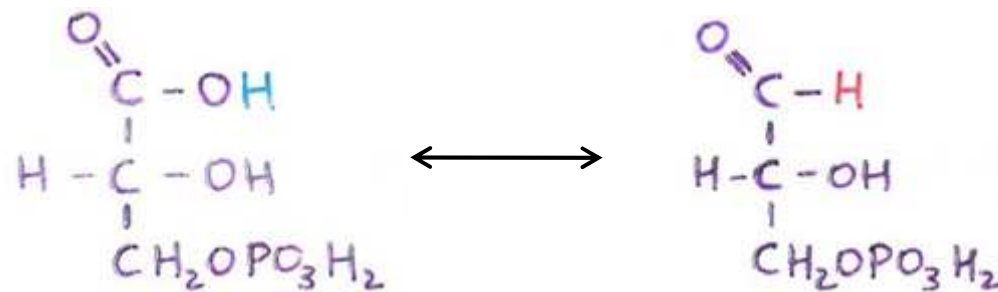
Deste modo, pela simples observação da estrutura do reagente e do produto de uma reacção, é possível saber qual dos dois é mais rico em energia e, assim, identificar se a essa reacção correspondem valores de K_{eq} e de $\Delta G^{0'}$ próximos de 1 ou 0, respectivamente, muito altos ou muito baixos.

Questões:

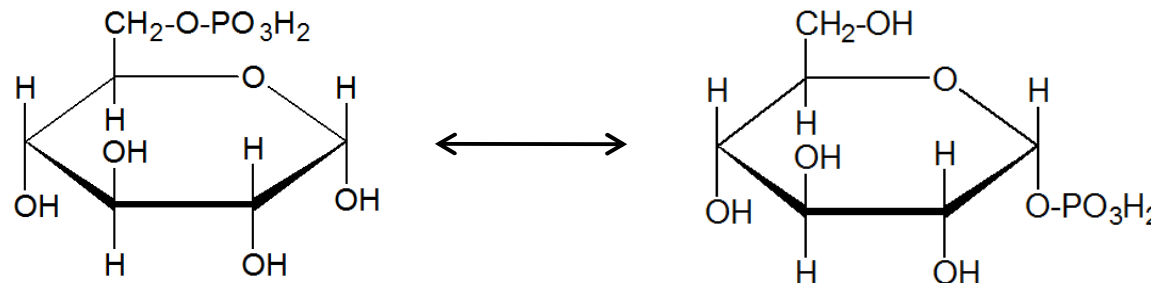
1 – É possível fazer a mesma estimativa para o valor de ΔG ? Porquê?

Indique, justificando, se às seguintes reacções correspondem valores de K_{eq} e de $\Delta G^{0'}$ próximos de 1 ou 0, respectivamente, muito altos ou muito baixos.

2 – Conversão do ácido 3-fosfoglicérico em D-gliceraldeído-3-fosfato no ciclo de Calvin, catalisada pelas enzimas fosfoglicerato cinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase:



3 – Conversão da D-glucose-6-fosfato em D-glucose-1-fosfato durante a síntese do amido:



A última das equações permite determinar a variação de energia livre que ocorre em reacções/processos de transferência de electrões, isto é, reacções redox:

$$\Delta G^{0'} = - n F \Delta E^{0'} \quad (4)$$

em que:

n é o número de electrões transferidos na reacção;

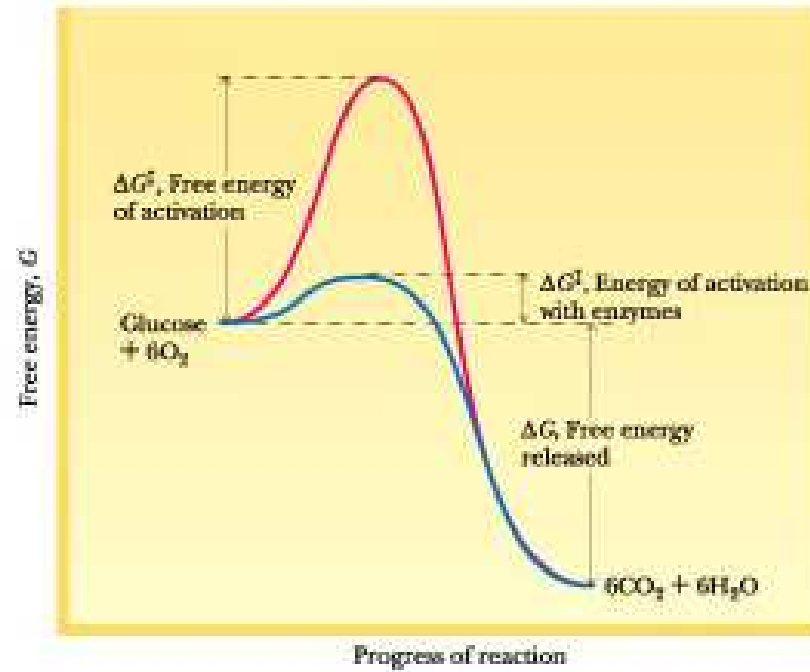
F é a constante de Faraday ($23063 \text{ cal.V}^{-1}.\text{equiv}^{-1}$);

$\Delta E^{0'}$ é a diferença de potencial de redução entre os agentes oxidante e redutor em condições padrão, i.e.,

$\Delta E^{0'} = (E^{0'} \text{ da semi-reacção que contém o agente oxidante}) - (E^{0'} \text{ da semi-reacção que contém o agente redutor}).$

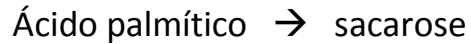
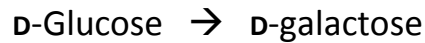
Nota: Explicar a termodinâmica da transferência espontânea, com síntese de ATP, dos electrões do NADH para o O_2 no mitocôndrio e da água para o $NADP^+$ no cloroplasto.

Respiration \longleftrightarrow Photosynthesis



Questões:

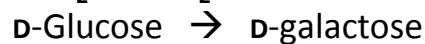
1. Considere as seguintes reacções químicas hipotéticas (nota: as reacções não estão estequiometricamente certas):



a) Indique as que ocorrem com um valor de ΔG° muito menor, muito maior ou próximo de zero.

b) Indique as que ocorrem com uma K_{eq} muito menor, muito maior ou próximo da unidade.

2. Considere as seguintes reacções químicas hipotéticas (nota: as reacções não estão estequiometricamente certas):



a) Indique as que ocorrem com um valor de ΔG° muito menor, muito maior ou próximo de zero.

b) Indique as que ocorrem com uma K_{eq} muito menor, muito maior ou próximo da unidade.

FIM

