



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

Int. Güiraldes 2620
Ciudad Universitaria - Pab. II, 4° Piso
CP:1428 Nuñez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires
Argentina
http://www.bg.fcen.uba.ar

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 05
Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas	Código de la carrera: 55
	Código de la materia: 7-

BIOLOGIA MOLECULAR DE EUCARIOTAS INFERIORES

CARÁCTER:	[SI / NO]	PUNTAJE:
Curso obligatorio de licenciatura (plan)	NO	
Curso optativo de licenciatura (plan 84)	SI	
Curso de postgrado	NO	

Duración de la materia: 14 semanas.	Cuatrimestre en que se dicta: 1ro
Frecuencia en que se dicta: 1 vez por año	

Horas de clases:	Hs.
Teóricas	84
Problemas	
Laboratorios	56
Seminarios	42
Carga horaria semanal:	13
Carga horaria total cuatrimestral:	182

Asignaturas correlativas:	Ciclo básico completo
	Microbiología e Inmunología o Biología comparada de protistas

Profesor/a a cargo:	Mariano J. Levin
Firma:	
Aclaración:	Fecha: 29/12/1999

Dr. ALBERTO R. KORNBLIHT
DIRECTOR
DPTO. CS. BIOLÓGICAS

**NUEVO MODELO DE PROGRAMA A REGIR A PARTIR
DEL 2do CUATRIMESTRE DE 1993**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.- UBA.

1. DEPARTAMENTO/INSTITUTO de Ciencias Biológicas.....
2. CARRERA de: a) Licenciatura en Cs. Biológicas Orientación: Genética Molecular y Biotec.
 b) Doctorado y/o Postgrado en:.....
 c) Profesorado en:.....
 d) Cursos Teóricos en Meteorología:.....
 e) Cursos de Idiomas:
3. 1er. CUATRIMESTRE/ 2do. CUATRIMESTRE AÑO: 1er Cuatrimestre.....
4. N° CODIGO DE CARRERA: 05.....
5. MATERIA: B.M.E.I...... N° DE CODIGO: 7.....
6. PUNTAJE PROPUESTO (en caso de tratarse de materias optativas para la Licenciatura o de Doctorado y/o Post-Grado).....
7. PLAN DE ESTUDIOS AÑO: 1984.....
8. CARÁCTER DE LA MATERIA (obligatoria u optativa)..... optativa.....
9. DURACION: (anual, cuatrimestral, bimestral u otra)..... cuatrimestral.....
10. HORAS DE CLASE SEMANAL: 13

- | | |
|--------------------------------------|---|
| a) Teóricas..... <u>6</u>hs | d) Seminarios..... <u>3</u>hs |
| b) Problemas.....hs | e) Teórico-Problemas.....hs |
| c) Laboratorio..... <u>4</u>hs | f) Teórico-prácticas.....hs |
| | g) Totales Horas..... <u>13</u>hs |

11. CARGA HORARIA TOTAL.....182.....hs.
12. ASIGNATURAS CORRELATIVAS Ciclo básico completo. Inmunología y Micro I ó
13. FORMA DE EVALUACION.....3 exámenes parciales y examen final...... Biología comparada de protistas
14. PROGRAMA ANALITICO (adjuntarlo).
15. BIBLIOGRAFIA (indicar título del libro, autor, editorial y año de publicación).


- I. _____
- II. _____
- III. _____

FECHA: 29.12.99

FIRMA PROFESOR:  FIRMA DIRECTOR: _____
 Aclaración firma: _____ Sello Aclaratorio: _____

NOTA: Para la validez de la información presentada se solicita que todas las páginas estén inicialadas y Firmadas al final por el Señor Director del Departamento/Instituto/Carrera o Responsable del área correspondiente y debidamente selladas y fechadas.-

OTRA: Se recuerda que los objetivos y los contenidos mínimos están incluidos en el Plan de Estudio respectivo y sólo son modificables por Resolución del Consejo Superior de la Universidad de Buenos Aires.-


F. ALBERTO R. KORNBLIHTT
 DIRECTOR
 DPTO. CS. BIOLÓGICAS

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Nombre de la materia: Biología molecular de eucariotas inferiores

Área: Genética Molecular y Biotecnología

Profesor: Dr. Mariano J. Levin

Programa de la materia

Programa teórico y de seminarios

- 1) Teorías sobre el origen de los eucariontes. Ubicación filogenética y taxonómica de los organismos que se estudiarán durante la materia. Vida libre vs. parasitismo. Respuesta inmune contra protozoarios parásitos.
- 2) Phylum Mastigophora:
 - 2a) Parabasalia (Ej. *Trichomonas vaginalis*) y Diplomonadida (Ej. *Giardia spp*):
 - Ubicación filogenética y morfología. Ciclos de vida. Importancia sanitaria.
 - Hidrogenosomas, estructura y función. Transporte de proteínas del citosol a hidrogenosomas. Hipótesis para explicar el origen de los hidrogenosomas.
 - Mecanismos de formación de quistes en *Giardia lamblia*.
 - Transcripción y regulación de la expresión génica.
 - Genes VSP (Variant-specific Surface Protein) en *Giardia* y variación antigénica.
 - Mecanismo de resistencia a metronidazol mediado por ferredoxina
 - Inmunidad contra estos protozoarios. Mecanismos de evasión del sistema inmune.
 - 2b) Kinetoplastida (Ej. *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp*):
 - Ubicación filogenética y morfología. Ciclos de vida, importancia sanitaria.
 - Estructura del flagelo y del cuerpo basal.
 - El glicosoma: origen, estructura y función. Metabolismo energético, cadena respiratoria. Transporte de proteínas al glicosoma.
 - Glicoproteínas de superficie: anclas de fosfatidil inositol, síntesis y tráfico intracelular. Moléculas relacionadas con la adhesión e invasión a la célula hospedadora: transialidasa y mucinas de *T. cruzi*. *Leishmania spp*: proteasas, factores de virulencia y sobrevida en lisosomas (tripanotiona, lipofosfoglicano-LPG y gp63).
 - El kinetoplasto: maxicírculos y minicírculos. Organización genómica y replicación.
 - ADN nuclear, cromosomas: tamaños, cariotipo, polimorfismo cromosómico. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE). Telómeros y telomerasas. Histonas y genes de histonas.
 - Minicromosomas: estructura y segregación durante la mitosis.

- Expresión génica: RNA polimerasas. Promotores. Secuencias regulatorias. Cis y trans-splicing. RNA editing: origen, mecanismos y evolución. Transcripción policistrónica: genes de la VSG (Variant Surface Glycoprotein) de *T. brucei*, regulación de la expresión relacionada con la variación antigénica.
- Manipulación genética de tripanosomátidos: transfección transitoria y estable. Desarrollo de vectores: promotores y marcadores de selección. Cromosomas artificiales, "knock out" de genes, clonado por complementación.
- Identificación y validación de blancos para el desarrollo de drogas en tripanosomátidos. Mecanismos de resistencia a drogas.
- Inmunidad contra estos microorganismos. Mecanismos de evasión del sistema inmune.
- Desarrollo de vacunas contra Leishmaniasis.

2c) Euglenida (Ej. *Euglena gracilis*):

- Ubicación filogenética y morfología. Ciclo de vida.
- El cloroplasto. Transporte de proteínas al cloroplasto.
- Genoma del cloroplasto y genoma mitocondrial. Evidencias moleculares que relacionan estrechamente a estos protozoarios con los tripanosomátidos.
- Mecanismos de splicing y splicing alternativo. Intrones y "twintrones".

3) Phylum Rhizopoda (Ej. *Entamoeba spp*):

- Ubicación filogenética y morfología. Ciclo de vida. Importancia sanitaria.
- Quistes: estructura y composición de la pared. Mecanismos de formación de quistes: posibles blancos para drogas.
- Proteínas formadoras de poros.
- Expresión génica y virulencia.
- Plásmidos de rADN.
- Desarrollo de drogas y mecanismos de resistencia a drogas.
- Inmunidad contra *Entamoeba histolytica* y mecanismos de evasión del sistema inmune.

4) Phylum Sporozoa (Apicomplexa: *Plasmodium spp* y *Toxoplasma gondii*):

- Ubicación filogenética y morfología. Ciclos de vida, importancia sanitaria.
- Vacuola parasitófora y vacuola digestiva. Organelas relacionadas con la invasión: micronemas, roptrías y gránulos densos.
- Fase hepática de la malaria: infección y moléculas asociadas con la invasión.
- Infección de glóbulos rojos por *Plasmodium spp*. Cultivo in vitro. Transporte, tráfico y secreción de macromoléculas en glóbulos rojos infectados. Moléculas asociadas con la invasión.
- Manipulación genética de *Plasmodium spp* y *Toxoplasma gondii*: transfección transitoria y estable. Vectores, promotores y marcadores de selección. Ejemplos de knock out de genes en *Plasmodium spp*: proteína rica en histidinas asociada a knobs (KAHRP), proteína del "circunsporozoito" (CSP) y proteína del esporozoito relacionada con trombospondina (TRAP). Ejemplos de knock out de genes en *Toxoplasma gondii*: genes de las proteínas ROP1 y SAG1.
- Cromosomas: tamaños y polimorfismo cromosómico. Telómeros y telomerasas.

- Organización genómica y expresión: promotores y polimerasas. Intrones y splicing.
- La mitocondria y el apicoplasto. ADN mitocondrial y ADN plástido. Origen, replicación transcripción y procesamiento del RNA.
- Genes rADN en *Plasmodium spp*: número de copias, distribución en el genoma, variabilidad genética y regulación de la expresión de isoformas propias de cada estadio.
- Mecanismos de variación antigénica: variación antigénica (Ej. PfEMP), polimorfismo alélico (Ej. PfMSP1).
- Inmunidad contra *Plasmodium spp*. Mecanismos de evasión. Knobs y citoadherencia a células endoteliales. Malaria cerebral y citoquinas.
- Virulencia de *Toxoplasma gondii*: papel de las citoquinas, óxido nítrico y proteínas del choque térmico.
- Desarrollo de vacunas anti-maláricas.
- Drogas contra *Plasmodium spp* y *Toxoplasma gondii*: modo de acción y mecanismos de resistencia. Resistencia a cloroquina, pirimetamina y sulfonamida. Apicoplastos y microtúbulos como blancos para el desarrollo de drogas.

5) Phylum Ciliata (Ej. *Paramecium* y *Tetrahymena spp*):

- Ubicación filogenética y morfología. Ciclos de vida.
- Micro y macronúcleo. Origen del ADN del macronúcleo. Reordenamiento programado del ADN. Escisión de los elementos IES (internal eliminated sequences).
- Particularidades del código genético.
- Regulación de la transcripción relacionada con la variación antigénica.
- Transfección de *Paramecium tetraurelia*: métodos y vectores.
- Self-splicing y ribozimas en *Tetrahymena spp*.

6) Transducción de señales y homeostasis del calcio en eucariontes inferiores.

- Quinasas de proteínas: clasificación y regulación.
- El calcio como segundo mensajero.
- Homeostasis del calcio. Organelas de almacenamiento: acidocalcisomas.

7) Proyectos genoma:

- Técnicas de estudio: bibliotecas genómicas en cósmidos, fósmodos, YACs, BACs, PACs. Screening, filtros de alta densidad, automatización.
- Concepto de EST: bibliotecas de cADN normalizadas, ESTs.
- Análisis de secuencias en bases de datos. Análisis filogenético basado en la comparación de genomas.
- Grado de avance de los proyectos genoma de los organismos tratados en la materia.

8) Aplicaciones de la metodología de ADN recombinante al diagnóstico de las enfermedades causadas por algunos de estos organismos:

- Detección de parásitos en vectores y hospedadores mamíferos por PCR: diferentes tipos de PCR. Detección en fluidos y tejidos. PCR in situ. PCR cuantitativa. La reacción de PCR como método de diagnóstico.
- Antígenos parasitarios como reactivos de diagnóstico. Búsqueda y caracterización. Expresión de antígenos como proteínas recombinantes. Empleo de proteínas recombinantes en métodos serológicos.
- Comparación de los métodos de detección de parásitos con métodos serológicos. Validación de los métodos. Ensayos de campo. Conceptos de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

Programa de Trabajos prácticos:

Módulo 1: Uso de PFGE y analisis de cariotipos

- I. PFGE de cromosomas de distintos eucariontes inferiores (T.cruzi, Leptomonas, Crithidia, Toxoplasma, Euglena, Levaduras). Puesta a punto de condiciones de corrida.
- II. PFGE bidimensional de T.cruzi e hibridación con sondas de telomeros y SIRE para mapeo de bandas cromosomales. CHEF primera dimensión, Digestión del strip de agarosa con Not I, FIGE segunda dimensión. Transferencia e hibridación.

Módulo 2: Análisis de secuencias requeridas para trans-splicing en tripanosomas

- I. Explicación de SOEing PCR para introducir mutaciones puntuales.
- II. Transfección de T.cruzi usando electroporador.
- III. Ensayos CAT
- IV. Efecto de distintas mutaciones sobre trans-splicing

Módulo 3: Uso de GFP (Green Fluorescence Protein) en eucariontes inferiores.

- I. Localización sub-celular, fusiones a GFP. Visualización en microscopio de fluorescencia.
- II. Cuantificación de expresión genética. Uso del fluorometro. Ventajas y desventajas respecto de otros genes reporter.

Módulo 4: Técnicas moleculares de diagnóstico de parásitos protozoarios.

- I. Ensayos de PCR. Sensibilidad de distintos primers (minicirculo o SIRE).
- II. Uso de kits diagnóstico de antígenos recombinantes.

Bibliografía de teóricas y seminarios:

Libros:

1. Human Parasitology, Bogitsh, B.J., Cheng, T.C., Editorial. Academic Press, San Diego, California, USA. 1998.
2. Methods in Microbiology, Vol. 25: Immunology of infection, Editores: Kaufmann, S.H.E. & Kabelitz, D. Editorial: Academic Press, San Diego, California, USA, 1998.
3. Medical Microbiology, Segunda Edición, Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R. Editorial: Mosby, London, 1998.
4. Genes V. Lewin B. Editor: Oxford University Press, 1994
5. Methods in Molecular Biology, Vol 21: Protocols in molecular parasitology, Editor: Hyde, J. Editorial: Humana Press, New Jersey, USA, 1993.
6. Symbiosis in cell evolution. Microbial communities in the Archean and Proterozoic eons. Margulis L., segunda edición, Editorial: WH Freeman and Company, New York, USA, 1993.

Revisiones y artículos científicos:

1. Pimpler E, Bradley PJ, Johnson PJ. Implications of protein import on the origin of hydrogenosomes. **Protist** **149**, 303-311, 1998.
2. Embley TM, Horner DA, Hirt RP. Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? **TREE** **12**: 437-441, 1997.
3. Clayton C, Hausler T, Blattner J. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. **Microbiol. Rev.** **59**, 325-344, 1995.
4. Fichera and Roos,. A plastid organelle as drug target in apicomplexan parasites. **Nature** **390**, 407-409, 1997.
5. Lang-Unnasch N and Murphy AD.. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. **Ann. Rev. Microbiol.** **52**, 561-590, 1998.
6. Morisaki JH, Heuser JE and Sibley LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **J. Cell Sci.** **108**, 2457-2464, 1995.

7. Carlton JMR, Galinski M, Barnwell JW and Dame JB.. Karyotype and synteny among the chromosomes of all four species of human malaria. **Mol. Biochem. Parasitol.** **101**, 23-32, 1999.
8. Hallik RB, Hong L, Drager RG, Favreau MR, Monfort A, Orsat B, Spielman A and Stutz E.. Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. **Nucleic Acids Res.** **21**, 3537-3544, 1993.
9. Prescott DM.. Origin, evolution and excision of internal elimination segments in germline genes of ciliates. **Curr Opin. Genet. Dev.** **7**, 807-813, 1997.
10. Sulli C and Schwartzbach SD. A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor. **Plant Cell** **8**, 43-53, 1996.
11. Verdun RE, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, Frasch ACC and Sanchez DO. Gene discovery through expressed sequence tag sequencing in *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** **66**, 5393-5398, 1998.
12. Kelly JM. Genetic transformation of parasitic protozoa. **Adv. Parasitol.** **39**, 227-270, 1997.
13. Vanhamme L and Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. **Microbiol. Rev.** **59**, 223-240, 1995.
14. López-García P and Moreira D.. Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. **TIBS** **24**, 88-93, 1999.
15. Katz LA. Changing perspectives on the origin of eukaryotes. **TREE** **13**, 493-497, 1998.
16. Guillen, N. Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. **Trends in Microbiol.** **4**, 191-197, 1996.
17. Sinnis, P., Sim, K.L. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. **Trends in Microbiol.** **5**, 52-58, 1997.
18. Naula, C., Seebeck T. Cyclic AMP signaling in Trypanosomatids. **Parasitol. Today** **16**, 35-38, 2000.
19. Ginsburg, H., Ward, S.A., Bray, P.G. An integral model of chloroquine action. **Parasitol. Today** **15**, 357-363, 1999.
20. Gull, K., Alsford, S., Ersfeld, K. Segregation of minichromosomes in trypanosomes: implications for mitotic mechanisms. **Trends in Microbiol.** **6**, 319-323, 1998.
21. Schettters, T.P.M., Eling, W.M.C. Can Babesia infections be used as a model for cerebral Malaria?. **Parasitol. Today** **15**, 492-497, 1999.

22. Liston, D.R., Johnson, P.J. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. **Parasitol. Today 14**, 261-265, 1998.
23. Bhattacharya, S., Som, I., Battacharya, A. The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. **Parasitol. Today 14**, 181-185, 1998.
24. Engers, H.D., Godal, T. Malaria vaccine development: current status. **Parasitol. Today 14**, 56-64, 1998.
25. Galanti, N., Galindo, M., Savaj, V., Espinoza, I., Toro, G.C. Histone genes in Trypanosomatids. **Parasitol. Today**, 64-70, 1998.
26. Wisner, M.F., Lanners, H.N., Bafford, R.A. Export of Plasmodium proteins via a novel secretory pathway. **Parasitol. Today 15**, 194-198, 1999.
27. Krauth-Siegel, R.L., Coombs, G.H. Enzymes of parasites thiol metabolism as drug targets. **Parasitol. Today 15**, 404-409, 1999.
28. Bogdan, C., Röllinghoff, M., How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol. Today 15**, 22-28, 1999.
29. Barret, M., Mottram, J., Coombs, G. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. **Trends in Microbiol. 7**, 82-88, 1999.
30. Craig, A.G., Waters, A.P., Ridley, R.G. Malaria genome project task force: a post genomic agenda for functional analysis. **Parasitol. Today 15**, 211-213, 1999.
31. Ivens, A.C., Blackwell, J.M. The Leishmania genome comes of age. **Parasitol. Today 15**, 225-231, 1999.
32. Dubremetz, J.F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends in Microbiol. 6**, 27-30, 1998.
33. Beverly, S.M., Turco, S. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends in Microbiol. 6**, 35-40, 1998.
34. Docampo, R. Moreno, S.N.J. Acidocalcisome: a novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol. Today 15**, 443-448, 1999.
35. Kappes, B., Doering, C.D., Graeser, R., An overview of Plasmodium protein kinases. **Parasitol. Today 15**, 449-454, 1999.
36. Saul, A. The role of variant surface antigens on Malaria-infected red blood cells. **Parasitol. Today 15**, 455-457, 1999.
37. Luján, H.D., Mowat, M.R., Nash, T.E. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. **Parasitol. Today 14**, 446-450, 1998.

38. Naitza, S., Spano, F., Robson, K.J.H., Crisanti, A. The thrombospondin-related protein family of apicomplexan parasites: The gears of the cell invasion machinery. **Parasitol. Today** **14**, 479-484, 1998.
39. McFadden, G.I., Roos, D.S. Apicomplexan plastids as drug targets. **Trends in Microbiol.** **7**, 328-333, 1999.
40. Ersfeld, K., Melville, S.E., Gull, K. Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today** **15**, 58-63, 1999.

Bibliografía de Trabajos Prácticos:

Libros:

1. Green Fluorescent Protein (GFP). Properties, Applications, and Protocols. Editores: M. Chalfie and S. Kain. Editorial: Wiley-Liss, inc., New York, USA, 1998
2. Tschudi, C. Transcription and RNA processing in *Trypanosoma brucei*. In Molecular approaches to parasitology, 255-268. Editores: J. Boothroyd, R. Komuniecki. Editorial: Wiley-Liss, inc., New York, USA, 1995.
3. Methods in Molecular Biology, Vol 21: Protocols in molecular parasitology, Editor: Hyde, J. Editorial: Humana Press, New Jersey, USA, 1993.

Artículos científicos:

1. Hernandez-Rivas, R., Scherf, A. Separation and Mapping of chromosomes of parasitic protozoa. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **Vol 92 (6)**, 815-819, 1997.
2. Vazquez, M, Levin, M.J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **GENE** **239**, 217-225, 1999.

